UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

Detección molecular de *Leishmania spp* en lesiones cutáneas del personal del Ejército Nacional de Colombia expuesto en zonas endémicas

SANDRA JIMENA JOJOA JOJOA

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias, Maestría en Microbiología

Bogotá, D.C., Colombia

2012

Detección molecular de *Leishmania spp* en lesiones cutáneas del personal del Ejército Nacional de Colombia expuesto en zonas endémicas

SANDRA JIMENA JOJOA JOJOA

Tesis presentada como requisito para optar el título de:
Magíster en Microbiología

Directora
Claudia Marcela Castro Osorio, Ms
Codirector
Profesor José Manuel Lozano Moreno, DrSc

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias, Maestría en Microbiología
Bogotá, D.C., Colombia
2012

DEDICATORIA

Primero dar Gracias a Dios por permitirme haber terminado con este eslabón más, a pesar de las dificultades.

Dedico este pequeño triunfo más de mi vida a mis padres Jorge y Zoila Luz, mis hermanos Mary, Fernando y Ruby, que me ayudaron en las circunstancias buenas y malas de este proceso, y a Juan Carlos por su apoyo incondicional.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco primero a Dios que me dio mucha fortaleza para realizar y alcanzar esta nueva meta de mi vida.
A todas las personas que me han dado el apoyo, enseñanza, y confianza en el proceso de mi formación como lo son los profes de la Universidad Nacional de Colombia, a la Profesora Martha Fontanilla; una madre y una amiga, a Socorrito que sufre con cada uno de nosotros, a mis compañeros y amigos de la UN.

Al Laboratorio de Referencia en Enfermedades Tropicales del Ejercito, donde me permitieron realizar este trabajo, a la Mayor Claudia Méndez que desde que me conoció me dio su confianza y apoyo en todos los procesos del proyecto, a las compañeras del Laboratorio, en especial a Johana Hernández por su apoyo incondicional.

Y un agradecimiento especial a Claudia Castro Osorio que a pesar de las dificultades de la vida, me comprendió y apoyó, aunque muchas veces sentí que decaía ella con su buen humor me levanto, ella no solo fue mi "Directora de tesis" sino una guía, una amiga, que creyó en mí y de quien aprendí mucho y me enseño como afrontar las dificultades que se presentan al hacer un estudio de investigación. Al Dr. José Manuel Lozano, quien con su mano fuerte y su conocimiento me guio en este proceso.

A Ronal Pelaez una persona incondicional, que me colaboró en el desarrollo de la identificación de las especies de *Leishmania*.

A todas las personas que hicieron posible este proceso y a quienes no alcanzo a nombrar en estos reglones y no me queda más que expresarles mi gratitud.

NOTA DE ACEPTACIÓN

La presente tesis fue sustentada y aprobada para optar el grado de maestría en Microbiología, el 20 de abril de 2012.

En constancia firman:

Jurado: Dra. Martha Stella Ayala Sotelo
Departamento de Ciencias Básicas
Fundación Universitaria del Área Andina
Coordinadora Grupo Parasitología, INS.

Jurado: Dra. Myriam Lucia Navarrete Jiménez
Departamento de Microbiología
Universidad Nacional de Colombia

Director de Tesis: Dra. Claudia Marcela Castro Osorio
Instituto Nacional de Salud
Dirección de Sanidad Ejercito Nacional (R)

Codirector de Tesis: Dr. José Manuel Lozano Moreno
Universidad Nacional de Colombia

Resumen

Las leishmaniasis es un grupo de enfermedades parasitarias producidas por protozoos del género *Leishmania*. Anualmente se reportan 2 millones de casos nuevos en el mundo; en Colombia la incidencia aumentó notoriamente desde el año 2005 ante el gran número de casos reportados por las fuerzas militares, los cuales en muchos casos, tienen dificultades para el diagnóstico temprano de la enfermedad siendo necesario el establecimiento de herramientas más específicas y sensibles que puedan ayudarlos a solucionar este impase. Siendo el Ejército Nacional uno de los más afectados por la enfermedad, no tenían establecido un Laboratorio con metodologías, para el aislamiento e identificación del parásito y metodologías alternativas como la PCR; anteriormente el diagnóstico solo se realizaba por frotis directo y en casos especiales por biopsia de la lesión.

El objetivo fue determinar la utilidad de la PCR en el diagnóstico de leishmaniasis cutánea en personal del Ejército Nacional de Colombia expuesto en zonas endémicas.

Se incluyeron 346 pacientes con lesiones presuntivas de leishmaniasis cutánea previo consentimiento informado, se recolectaron datos demográficos y epidemiológicos de los pacientes y se realizó frotis directo, cultivo y PCR específica para el género *Leishmania* amplificando una región conservada del cinetoplasto y se realizó identificación de especie mediante el uso de la PCR-RFLP del gen cisteín proteasa tipo B (CPB). El 43.9% de los pacientes habían presentado más de un episodio anterior de la enfermedad y el 47.0% tenían un tiempo de evolución de 30 días. La positividad de las metodologías fue del 97.6% (338/346) mediante PCR, el 7.2% (25/346) por cultivo y el 47.0% (162/346) mediante frotis directo. Mediante PCR-RFLP se caracterizó las 25 cepas de *Leishmania* recuperadas de los pacientes por cultivo, donde 17 (68.0%) presentaron perfiles para *Leishmania braziliensis* y 8 (32.0 %) perfiles para *Leishmania panamensis/Leishmania guyanensis*. Con la misma metodología se caracterizó la especie a partir de muestra directa, donde se tipificaron 104 muestras de pacientes donde el 47 (45%) para perfiles de *Leishmania panamensis/Leishmania guyanensis* y 43 (42%) para *Leishmania braziliensis* y 14 (13%) no dio ningún perfil de identificación. Se mostró la gran utilidad de la PCR en el diagnóstico de la enfermedad y la importancia de la tipificación de las cepas para orientar el tratamiento ante los fracasos terapéuticos y la resistencia al tratamiento observada en nuestros pacientes, sin embargo debe mejorarse la metodología para la identificación desde la muestra.

Palabras clave: Leishmaniasis cutánea, PCR, PCR-RFLP, Ejercito Nacional de Colombia.

Abstract

Leishmaniasis are a parasitics diseases caused by protozoans of the *Leishmania* genus. This disease annually reported 2 million new cases in the world. In Colombia the incidence of leishmaniasis has increased markedly since 2005, accounting to the present a large number of cases reported mainly by the military forces in spite of all operational difficulties for the early diagnosis of this disease for which an increasing need of establishing more and specific sensitive molecular tools has to be solved. We determined the usefulness of PCR in the diagnosis of cutaneous leishmaniasis in personnel from the Colombian military forces exposed in endemic areas. 346 patients having cutaneous leishmaniasis lesions were included all agreed to signed informed consent; we also collected demographic and epidemiological data from patients from whom direct smears were performed and cell culturing led the *Leishmania* gender-specific. PCR tests amplified a conserved kinetoplast region of Leishmania and species identification was performed by using the PCR-RFLP cysteine protease gene type B (CPB). The 43.9% of the analyzed patients had had more than one prior episode of the disease and 47.0% had disease duration of 30 days. The positivity of the methods was 97.6% (338/346) by PCR, 7.2% (25/346) by cell culturing and 47.0% (162/346) by direct smear. 25 strains of Leishmania were recovered from patients by cell culturing and PCR- RFLP characterized, where 17 (68.0%) had profiles for *Leishmania braziliensis* and 8 (32.0%) profiles for *Leishmania panamensis.* Using the same methodology most species were characterized from direct sample, where 104 samples were typified. From subject samples, 47 patients (45%) had a *Leishmania panamensis* profile, 43 (42%) for *Leishmania braziliensis* and 14 (13%) did not meet a parasite profile ID. Sample processing and produced data showed the great utility of PCR for leishmaniasis diagnosis as well as the importance of strain typifying in order to guiding a therapy for treatment of previous therapy fail and resistance observed in our patients. However, this methodology should be improved for a proper *Leishmania* type identity from all analyzed samples.

Keywords: Cutaneous leishmaniasis, PCR, PCR-RFLP, National Military Forces.

Tabla de contenido

1. MARCO TEORICO 21

1.1. Antecedentes 22

1.2. Filogenia y taxonomía 22

1.3. Morfología 24

1.3.1. Forma libre, extracelular o promastigote 24

1.3.2. Forma aflagelada, intracelular o amastigote 25

1.4. Ciclo de vida de la Leishmania 27

1.5. Epidemiología 29

1.6. Características clínicas 32

1.6.1. Leishmaniasis cutánea 32

1.6.2. Leishmaniasis mucocutánea 33

1.6.3. Leishmaniasis visceral 34

1.6.4. Leishmaniasis cutánea post-kala-azar (LDPK) 35

1.7. Genoma de Leishmania 36

1.7.1. Genoma nuclear 36

1.7.2. ADN Cinetoplasto 38

1.8. Diagnóstico 39

1.8.1. Examen directo 39

1.8.2. Biopsia de piel 40

1.8.3. Cultivos *in vitro* 40

1.8.4. Pruebas serológicas 41

1.8.5. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) 41

1.9. Caracterización de especies de Leishmania 42

1.9.1. Técnicas fenotípicas de caracterización 42

1.9.2. Técnicas genotípicas de caracterización 43

1.10. Tratamiento 44

2. OBJETIVOS 30
2.1. Objetivo general 31
2.2. Objetivos específicos 31
3. MATERIALES Y MÉTODOS 32
3.1. Tipo y Diseño de Estudio 33
3.2. Población de estudio 33
3.3. Tamaño de muestra 33
3.4. Recepción e ingreso del paciente 34
3.5. Criterios de inclusión 34
3.6. Criterios de exclusión 35
3.7. Toma de muestras 35
3.7.1. Toma de muestras para frotis directo 35
3.7.2. Toma de muestra para cultivo 36
3.7.3 Toma de muestras para PCR 37
3.7.4. Diagnóstico parasitológico 37
3.7.5. Cepas de Referencia y especímenes clínicos utilizadas 37
3.8. Estandarización de la metodología 38
3.8.1. Cultivo de parásitos 38
3.8.2. Extracción de ADN de *Leishmania* 39
3.9. Estandarización de la PCR-kADN para género Leishmania 39
3.9.1. Análisis bioinformático 39
3.9.3. Visualización de los productos amplificados 40
3.9.4. Especificidad analítica 41
3.9.5 Sensibilidad analítica 41
3.9.6. Límite de detección 41
3.10. Identificación de especie por PCR-RFLP (Cisteín Proteasa tipo B) 41
3.10.1. Análisis bioinformático PCR- RFLP 41
3.10.2. Condiciones de la PCR-RFLP 42
3.10.3. Visualización de los productos amplificados 42

3.11. Análisis de restricción enzimática con Kpn1 para identificación de especies Subgénero Viannia. 43

3.11.1. Análisis bioinformático 43

3.11.2. Condiciones de la digestión 43

3.12. Análisis de datos 43

4. RESULTADOS 44

4.1. Descripción de la población a estudio 45

4.2. Estandarización de metodologías 47

4.2.1. Cultivo de parásitos 47

4.2.2. Extracción de ADN de *Leishmania* 48

4.3. Estandarización de PCR-kADN amplificando la región del 53

minicírculo del cinetoplasto 53

4.4. Especificidad y sensibilidad analítica 55

4.5. Límite de detección 57

4.6. Estandarización e implementación de la PCR-RFLP para identificación de especie 58

4.6.1. Identificación de especie a partir de cultivo 61

4.6.2. Identificación de especie a partir de muestra directa 64

5. DISCUSION 69

6. CONCLUSIONES 76

7. RECOMENDACIONES 79

8. REFERENCIAS 80

9. DIVULGACIÓN DEL CONOCIMIENTO GENERADO 91

10. ANEXOS 95

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Taxonomía del género *Leishmania.*.....23
Figura 2. Promastigotes de *Leishmania*.....24
Figura 3. Amastigotes de *Leishmania*. 25
Figura 4. Ciclo biológico del género *Leishmania.* www.who.int/es.....28
Figura 5. Distribución mundial de leishmaniasis cutánea, 2009. www.who.int/es.....29
Figura 6. Distribución mundial de leishmaniasis visceral, 2009. www.who.int/es.....30
Figura 7. Reporte casos leishmaniasis cutánea Ejercito Nacional de Colombia. Salud Operacional Sanidad 2009.....31
Figura 8. Dinámica de reporte de casos de Leishmaniasis a nivel Nacional y Ejército Nacional 2005-2010. 32
Figura 9. Lesión de leishmaniasis cutánea. Paciente del Ejercito Nacional.....33
Figura 10. Lesión de leishmaniasis mucocutánea. www.who.int/es.....34
Figura 11. Leishmaniasis visceral en niños. www.who.int/es 35
Figura 12. Leishmaniasis cutánea post-kala-azar. www.who.int/es 36
Figura 13. ADN de kinetoplasto (kADN) de *Leishmania*.....39
Figura 14. Lesión característica de leishmaniasis cutánea en personal del Ejército. 35
Figura 15. Toma de muestra para frotis directo 36
Figura 16. Inoculación del exudado en medio de cultivo, toma en campo. 36
Figura 17. Frecuencia de edad. 45
Figura 18. Tratamiento previo.....45
Figura 19. Frecuencia de tiempo de evolución de la enfermedad. 46
Figura 20. Lesiones de leishmaniasis cutánea sobreinfectadas en Personal del Ejército Nacional. 46
Figura 21. Frecuencia de sitios de lesión. 47
Figura 22. Técnica de microcultivo.....47
Figura 23. Técnica de minicultivo. 48
Figura 24. Curva de crecimiento de *L. panamensis*, recuento de parásitos.....49
Figura 25. Curva de crecimiento de *L. guyanensis*, recuento de parásitos.....49
Figura 26. Curva de crecimiento de *L. braziliensis*, recuento de parásitos. 50
Figura 27. Resultado de la PCR-OL con extracción de ADN con kit Promega.....51
Figura 28. Resultado de la PCR-OL por método de extracción de ADN por método de fenol-cloroformo. 52
Figura 29. Gel. 1. Producto resultante de la PCR-kADN, amplificando una región del kinetoplasto de 120 pb 54

Figura 30. Gel. 2. Producto resultante de la PCR-OL, amplificando una región del kinetoplasto de 120 pb.....54
Figura 31. Gel. 3. Producto resultante de la PCR-OL, amplificando una región del kinetoplasto de 120 pb.....55
Figura 32. Especificidad de la PCR OL, con cepas de referencia del Género *Leishmania,* especies del Género *Mycobacterium* y *T. cruzi*. 56
Figura 33. Límite de detección de la PCR-OL.....58
Figura 34. Estandarización de la PCR amplificando gen CPB de 1326 pb..... 59

Figura 35. Especificidad de la PCR amplificando gen CPB de 1326 pb.....59
Figura 36. Estandarización de la PCR-RFLP con primers CBP 1 y 2 con cepas de referencia de *Leishmania*..... 60

Figura 37. Cortes realizados por la enzima Kpn1 analizado en el programa New England Biolabs Neb Cutter……..……60

Figura 38. Gel de electroforesis después de la digestión con la enzima Kpn…… ……61

Figura 39. Resultado de la identificación de especie mediante PCR-RFLP gen CPB……62

Figura 40. RFLP de las 25 muestras incluidas en el estudio, utilizando la enzima KpnI. 62

Figura 41. Gel 1. Amplificación del producto de PCR de 1326 pb, a partir de muestras directas. 64

Figura 42. Gel 2. Amplificación del producto de PCR de 1326 pb, a partir de muestras directas……64

Figura 43. Gel 3. Amplificación del producto de PCR de 1326 pb, a partir de muestras directas..65

Figura 44. Digestión con enzima de restricción Kpn1, muestras directas……65

Figura 45. Digestión con enzima de restricción Kpn1, muestras directas……66

Figura 46. Porcentaje de caracterización de especie a partir de muestras directas y cultivos por PCR-RFLP. 66

Figura 47. Distribución de L. panamensis/L. guyanensis en las Unidades Militares del Ejército Nacional…… 67

Figura 48. Distribución de L. braziliensis en las Unidades Militares del Ejército Nacional……..67

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Resumen del genoma de *L. major, L. infantum y L. braziliensis*..... 38
Tabla 2. Rango de eficacia de los regímenes de tratamiento disponibles para la leishmaniasis cutánea producida por las principales especies de *Leishmania sp*. (15). 46
Tabla 3. Proporción de casos por Unidad Militar..... 33
Tabla 4. Muestra de estudio, Unidades del Ejército Nacional. 34
Tabla 5. Cepas de referencia utilizadas en la estandarización de las metodologías..... 38
Tabla 6. Fragmentos de los cortes realizados por las enzimas de restricción Kpn1. 43
Tabla 7. Recuento para curva de crecimiento de *L. panamensis* 49
Tabla 8. Recuento para curva de crecimiento de *L.guyanensis* 49
Tabla 9. Recuento para curva de crecimiento de *L. braziliensis*..... 50
Tabla 10. Análisis bioinformático de los primers OL. Blast-NCBI..... 53
Tabla 11. Sensibilidad de las metodologías de diagnóstico de leishmaniasis..... 56
Tabla 12. Análisis de exactitud. Detección de las metodologías dependiendo de la evolución..... 57
Tabla 13. Análisis bioinformático de los primers CBP 1 y 2. Blast-NCBI. 58
Tabla 14. Cortes realizados por la enzima de restricción Kpn1..... 61
Tabla 15. Tipificación molecular por PCR-RFLP de los a partir de los cultivos positivos obtenidos en el estudio. 63

LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

A	Adenina
ADN	Acido Desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
ARNg	ARN guía
ARNm	ARN mensajero
ARNr	ARN ribosómico
BASER	Batallón de servicio
BRCNA	Brigada contra el narcotráfico
BRIM	Brigada Móvil
BR	Brigada
C	Citocina
CAP	7-metil-guanocina
Cat.	Catalogo
CDFLA	Centro Dermatologico Federico Lleras Acosta
CES	Universidad CES, Medellín
CIMPAT	Centro de Investigaciones en Microbiología y Parasitología Tropical. Universidad de los Andes
CPB	Cisteina Proteasa Tipo B
CO2	Dióxido de Carbono
dATP	2'-3' Di-deoxi adenina trifosfato
dCTP	2'-3' Di-deoxi citosina trifosfato
dGTP	2'-3' Di-deoxi guanina trifosfato
dTTP	2'-3' Di-deoxi timina trifosfato
dNTPs	Deoxinucleótidos trifosfatos
FBS	Fetal Bovine Serum
G	Guanina
G6PD	Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa
gp 46	Glucoproteína 46
gp63	Glicoproteína 63

GPI	Glucosil-fosfatidil-inositol
FUCAD	Fuerza Conjunta de acción decisiva
FUDRA	Fuerza de despliegue rápido.
ITS	Internal Transcribed Spacers
INS	Instituto Nacional de Salud
kADN	ADN del Kinetoplasto
Kb	Kilo base
kDa	Kilo Daltons
LCL	Leishmaniasis cutánea localizada
LM	Leishmaniasis mucocutánea
L. archibaldi	*Leishmania archibaldi*
L. braziliensis	*Leishmania braziliensis*
L. chagasi	*Leishmania chagasi*
L. forattinii	*Leishmania forattinii*
L. garnhami	*Leishmania garnhami*
L. gerbilli	*Leishmania gerbilli*
L. guyanensis	*Leishmania guyanensis*
L. infantum	*Leishmania infantum*
L. panamensis	*Leishmania panamensis*
L. peruviana	*Leishmania peruviana*
L. pifanoi	*Leishmania pifanoi*
L. venezuelensis	*Leishmania venezuelensis*
LDPK	Leishmaniasis cutánea post-kala-azar
LPG	Lipofosfoglicano
LC	Leishmaniasis cutánea
LV	Leishmaniasis visceral
LMC	Leishmaniasis mucocutánea
Mb	Mega Bases
ME	Mini-Exón
mg	Microgramos

mL	Mili Litros.
M. leprae	*Mycobacterium leprae M.*
abcesus	*Mycobacterium abcesus*
M. fortuitum	*Mycobacterium fortuitum*
M. chelonae	*Mycobacterium chelonae*
MLEE	Electroforesis de enzimas multilocus
MPM	Marcador Peso Molecular
MQ	MiliQ
NCBI	National Center for Biotechnology Information
ng	Nano gramos
NNN	Medio difásico de *Novy-McNeal-Nicolle*
OMS	Organización mundial de la Salud
Pb	Pares de bases
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PCR-RFLP	PCR de polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción
PECET	Programa de Estudio y Control de Enfermedades Tropicales
Pg.	picogramos
Ref.	Referencia
RFLP	Polimorfismo de Longitud de Fragmentos de Restricción
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SDS	Dodecilsulfato de Sodio
SLME	Spliced Leader Mini-Exon
T	Timina
T. cruzi	*Trypanosoma cruzi*
TAE	Tampón Tris-Acetato-EDTA
U	Unidades
UTR	untranslated region
UV	Ultra Violeta
V	Voltios
VIH	Virus de la Inmunodeficiencia Humana

WR	Walter Reed Army Medical Center
WHO	World Health Organization
µL	Micro litros

INTRODUCCIÓN

Las Leishmaniasis son un grupo de enfermedades causadas por un parásito protozoo perteneciente al género *Leishmania*, presente en todos los continentes excepto en la Antártida, es una zoonosis que afecta la piel, las mucosas o las vísceras, es transmitido por la picadura de un insecto flebotomíneo del cual se conocen cerca de 500 especies, de los cuales solo se han reportado 30 como transmisoras de la enfermedad (1).

De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud (OMS) la leishmaniasis amenaza alrededor de 350 millones de hombres, mujeres y niños en 98 países de todo el mundo, 12 millones de personas se cree que están infectadas en la actualidad, se encuentra distribuida en Norte y Sudamérica, Europa, África y Asia, es endémica en las regiones tropicales y subtropicales en los 4 continentes, tiene una prevalencia mundial de 20 millones de casos y se cree que la incidencia anual oscila entre 1 - 2 millones de nuevos casos para la leishmaniasis cutánea y 500.000 nuevos casos para la leishmaniasis visceral. Sin embargo, los datos oficiales subestiman la realidad de la infección por estos protozoos flagelados debido a varios factores como: numerosos casos no son diagnosticados o no se declaran al Sistema de Vigilancia Nacional, la mayoría de los datos oficiales se obtienen exclusivamente a partir de la detección pasiva de los casos, personas infectadas asintomáticas, la subestimación de los casos de leishmaniasis visceral y por último, la leishmaniasis es de notificación obligatoria en tan sólo 32 de los 98 países endémicos (1, 2).

En América se han reportado casos desde el norte de Argentina hasta el sur de Texas, con la excepción de Chile y Uruguay. En Colombia, durante la década de los 90 se notificaban en promedio 6.500 casos nuevos de leishmaniasis cada año, cifra que ha venido aumentando progresivamente al punto de notificar al Sistema de Vigilancia Nacional en los años 2005 y 2006 a cerca de 20.000 casos cada año; debido a que surgieron nuevos focos de transmisión, que anteriormente no reportaban (1,2).

Las leishmaniasis son patologías endémicas en casi todo el territorio Colombiano, excepto en San Andrés Islas y Bogotá D.C. (1). Se estima que en el país existen alrededor de 10 millones de personas en riesgo, dándose la transmisión generalmente en el área rural, así mismo se presentan las tres formas clínicas de la enfermedad, siendo la más frecuente la leishmaniasis cutánea (98.6% de los casos en el año 2010) endémica principalmente en los departamentos de Meta, Antioquía y Tolima, la leishmaniasis mucosa (1.06% de los casos), endémica en Antioquía, Meta y Guaviare y la leishmaniasis visceral (0.41% de los casos), es endémica en la Costa Atlántica y Magdalena Medio (Córdoba, Sucre y Bolívar) (1,2,3).

Aunque la población más afectada siguen siendo hombres jóvenes que se introducen en el ciclo selvático por exposición ocupacional (militares, agricultores, grupos armados ilegales), la

enfermedad también gana importancia en el contexto doméstico, y afecta a un número creciente de mujeres y niños, debido los patrones cambiantes en la dinámica de transmisión como la alteración en los ecosistemas, desplazamiento de poblaciones en áreas boscosas, construcción de presas, deforestación, urbanización, nuevos sistemas de riego para la agricultura, entre otras (2,3).

En el año 2009 se reportaron a nivel nacional 15477 casos de leishmaniasis de los cuales 7.542 fueron reportados por las Fuerzas Militares como leishmaniasis cutánea (cerca del 50 % del total de los casos), y en el 2010 de los 12.979 casos reportados, 6472 proveían de las Fuerzas Militares (cerca del 50% de los casos), siendo el personal militar una población especialmente vulnerable a la leishmaniasis. Debido a las operaciones militares que se llevan a cabo y se han incrementado en los últimos años, lo cual los ha llevado invadir el medio o hábitat del insecto, generando un aumento de la leishmaniasis cutánea (4).

La enfermedad para las Fuerzas Militares genera un interés debido a la complejidad diagnóstica y al alto costo que se genera por el elevado número de bajas administrativas y operacionales, así como los altos costos en el suministro del tratamiento de antimoniales pentavalentes (4). El diagnóstico de la leishmaniasis cutánea en el Ejército Nacional se hace generalmente por medio del frotis directo de la lesión el cual puede presentar falsos negativos debido muchas veces a la evolución de la enfermedad lo que dificulta la correcta visualización del parásito, incluso el diagnóstico en ocasiones se realiza cuando la enfermedad está en estados avanzados, evitando el efecto deseado del medicamento. El cultivo del parásito es otro método de diagnóstico de la leishmaniasis el cual también depende de la evolución de la enfermedad, de infecciones concomitantes que pueden contaminar el cultivo, la automedicación con cremas tópicas en las lesiones que pueden inhibir el crecimiento del parásito, y el tiempo que toma en darse el resultado que dura aproximadamente 28 días, presentándose la dificultad en un diagnóstico oportuno (2).

Se ha demostrado que la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) es más específica y sensible que las técnicas de diagnóstico convencional, ya que se identifica un blanco molecular propio de la *Leishmania*, es más efectiva incluso en lesiones de pocos días de evolución, permite guiar el tratamiento así como adelantar estudios de resistencia a los medicamentos antimoniales.

1. MARCO TEORICO

1.1. Antecedentes

La *Leishmania* es un parásito perteneciente a la familia *Trypanosomatidae* que causa un grupo de enfermedades conocidas como Leishmaniasis. Fue descrita por primera vez en 1903 en la India por W.B Leishman, a partir de lesiones de pacientes con diversas ulceraciones. Este protozoo es transmitido por vectores del género *Lutzomya* en el nuevo mundo y *Phlebotomus* en el viejo mundo, siendo capaz de infectar a gran cantidad de mamíferos entre ellos el hombre en quien la enfermedad puede presentarse como un espectro que va desde las afecciones cutáneas, mucosas o viscerales, esta última conocida como Síndrome de Kala azar (5,6).

La leishmaniasis es una causa importante de mortalidad y morbilidad a nivel mundial, según la OMS es endémica en muchos países, y se considera que 350 millones de personas corren riesgo de contraer esta enfermedad. Según las estimaciones, hay 12 millones de personas infectadas en todo el mundo y cada año se registran aproximadamente dos millones de nuevos casos (3,7).

Los datos indican que el número de casos han aumentado en las recientes décadas, incremento que puede deberse en parte al mejoramiento del diagnóstico y en consecuencia al mayor número de casos notificados, pero también puede justificarse como parte a la urbanización, deforestación, conflictos armados, turismo y a la emergencia de resistencia a los medicamentos antimoniales pentavalentes (8,9).

1.2. Filogenia y taxonomía

La clasificación de *Leishmania* se basó inicialmente en criterios eco-biológicas tales como vectores, distribución geográfica, el tropismo, propiedades antigénicas y manifestaciones clínicas. Sin embargo, por análisis bioquímicos y moleculares se mostró que lo patológico y geográfico son criterios a menudo insuficientes y por lo tanto otros criterios como patrones de polimorfismo, marcadores moleculares empleando ADN del cinetoplasto (kADN), proteínas o antígenos llegaron a ser utilizados para clasificar *Leishmania* (9,10).

Todos los miembros del género *Leishmania* (Ross R. 1903) (9), son parásitos de mamíferos. Los dos subgéneros, *Leishmania* y *Viannia*, se dividen sobre la base de su ubicación en el intestino del vector, Rioux et al. (1990) utilizó el análisis de isoenzimas

para definir especies complejos dentro de los subgéneros. Inicialmente, la clasificación de especies se basó en varios criterios extrínsecos tales como clínicas, geográficas y biológicas, por ejemplo, *L. guyanensis* (aisladas en Guyana), *L. peruviana* (aislado en Perú), *L. infantum* (aislada de un niño en Túnez) y *L. gerbilli* (aislado de jerbos). Desde la década de 1970, los criterios intrínsecos como datos inmunológicos, bioquímicos y genéticos se han utilizado para definir las especies de *Leishmania*. El uso de estas técnicas moleculares condujeron a la publicación de un esquema taxonómico por la OMS en 1990 (10). Figura 1. Los nuevos métodos de detección, aislamiento y genética han dado lugar a un aumento masivo en la identificación de un gran número de especies. En la actualidad, 30 especies son conocidas y aproximadamente 20 son patógenas para los seres humanos (8,10).

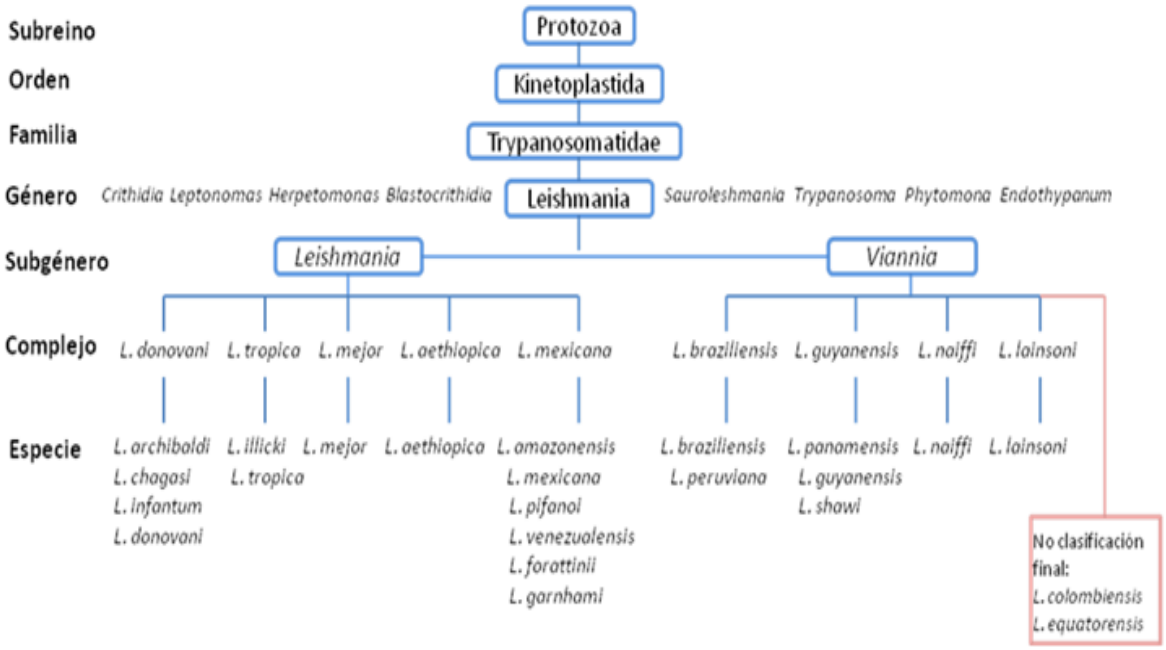


Figura 1. Taxonomía del género *Leishmania*.

Especies subrayadas son o han sido cuestionadas, (Basado en el esquema publicado por la OMS, 1990)

Estas especies generalmente presentan diferentes características epidemiológicas y clínicas relacionadas con diferentes perfiles genéticos y fenotípicos. La validez del esquema de clasificación, considerada por algunos investigadores como demasiado arbitraria, ha sido cuestionado en varias ocasiones. El debate se ha centrado en *L. panamensis, L. peruviana, L. chagasi, L. infantum, L. archibaldi, L. garnham, L. pifanoi, L. venezuelensis y L. forattinii*. Diferentes estudios ya han aclarado la situación de algunas de estas especies, por

ejemplo, *L. chagasi* se acepta como sinónimo de *L. infantum* y *L. peruviana* ha sido validada como una especie independiente. Las otras especies mencionadas se encuentran objeto de debate (10).

1.3. Morfología

Leishmania tiene un ciclo de vida complejo en el que los parásitos están expuestos a diferentes ambientes extra e intracelular. Estos parásitos son digenéticos o heteroxenos, es decir, tienen dos estadios básicos en su ciclo: uno extracelular que se desarrolla en el huésped invertebrado (phlebotomino) y un estadio intracelular en el huésped vertebrado, dos morfologías adaptadas a los distintos ambientes en los que debe sobrevivir (11, 12).

1.3.1. Forma libre, extracelular o promastigote

El promastigote constituye la forma extracelular que se desarrolla en el aparato digestivo del flebótomo, vector de la enfermedad, y constituye la forma infectante para el hospedador vertebrado y es la forma presente en cultivo in vitro. Tiene forma alargada, de 15 a 20 µm de longitud y presenta un flagelo libre en su parte anterior que puede llegar a medir el doble de la longitud del cuerpo del parásito, Figura 2. La visión al microscopio electrónico muestra un núcleo central, ribosomas, retículo endoplasmático, aparato de Golgi, una única mitocondria y el kinetoplasto que aparece como un cuerpo electro-denso en la zona anterior
(11, 12).

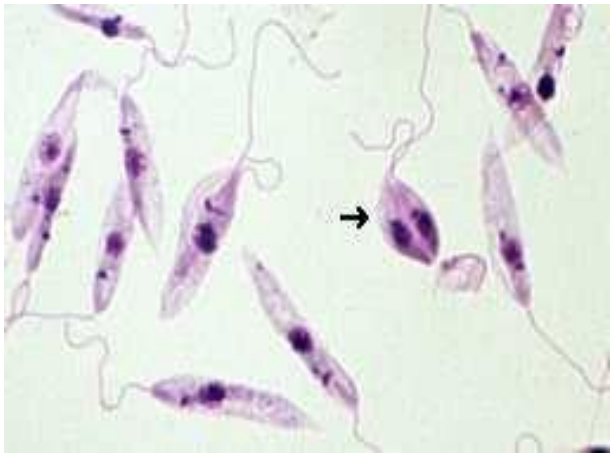


Figura 2. Promastigotes de *Leishmania.*

1.3.2. Forma aflagelada, intracelular o amastigote

El amastigote es la forma que se observa en los tejidos parasitados de los hospedadores vertebrados, generalmente en el interior de las células del sistema mononuclear fagocitario. En el interior de estas células se pueden encontrar los amastigotes englobados en una vacuola (vacuola parasitófora) que se forma tras la fusión del lisosoma y el fagosoma una vez que el parásito ha sido internalizado, Figura 3. Los amastigotes son formas ovoides con un tamaño comprendido entre 2 y 5 µm de diámetro (11, 12).

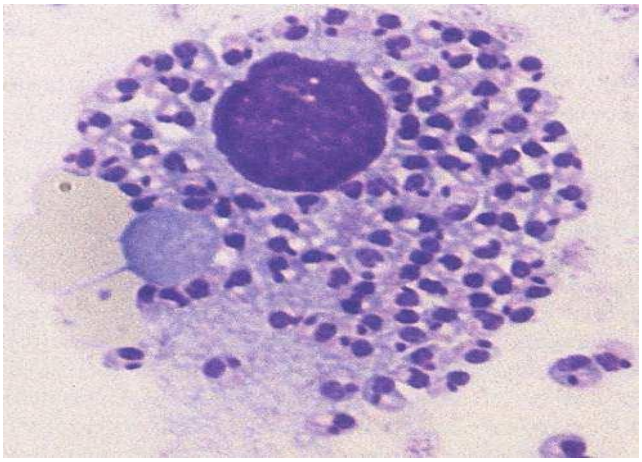


Figura 3. Amastigotes de *Leishmania*.

Estas formas presentan un núcleo central y un kinetoplasto alargado, pudiéndose apreciar la existencia de un bolsillo flagelar y un flagelo vestigial.

Durante el desarrollo del parásito en el flebótomo vector, *Leishmania* adopta varias morfologías intermedias entre la forma flagelada y la aflagelada. Las formas descritas enumeradas por orden de aparición a lo largo de esta transformación son los promastigotes procíclicos (aparecen entre las 24 y 48 tras la ingesta), nectomonas (48 - 72 horas), leptomonas (4 - 7 días), haptomonas (5 - 7 días) y metacíclicos (7 -14 días), estos últimos son los responsables de la transmisión de la infección al vertebrado (11, 12).

Tanto el promastigote como el amastigote son células bien organizadas. La membrana plasmática es una bicapa lipídica y se encuentra tapizada por un glucocálix formado por un conjunto de moléculas ancladas a la membrana a través de estructuras glucosil fosfatidilinositol (GPI), y relacionado con la capacidad invasiva del parásito. Las principales moléculas que forman este glucocálix son una glicoproteína de 63 kDa (gp63), otra

de 46 kDa (gp 46) y el lipofosfoglicano (LPG). La glucoproteína de 63 kDa (gp63) es una metaloproteinasa polimórfica y conservada entre las distintas especies de *Leishmania*. Está presente en las dos formas del parásito, alcanzando las 500.000 copias por célula en el promastigote. En los amastigotes aparece en menor número y localizada en el interior de lisosomas. La glucoproteína de 46 kDa (gp 46) presenta unas 400.000 copias por promastigote. Está presente en el Subgénero *Leishmania*, pero no así en *Viannia*, siendo su principal característica la resistencia a la proteólisis. Por último, el lipofosfoglicano (LPG) es otro glucoconjugado, implicado en el anclaje del parásito al macrófago y a las microvellosidades intestinales del insecto, y en la inhibición de la respuesta oxidativa y la producción de óxido nítrico por parte del macrófago. En el promastigote está presente en un número muy alto de copias, entre 1 y 1.5 millones por célula, sin embargo, en el amastigote es muy poco abundante (11, 12, 13).

Además de los orgánulos comunes a otros eucariotas, *Leishmania* posee ciertas particularidades que le diferencian. Debajo de la membrana citoplasmática encontramos una red de microtúbulos subpeliculares siguiendo una trayectoria helicoidal con respecto al eje longitudinal de la célula. Esta red de microtúbulos se extiende por todo el cuerpo celular dejando libre la porción correspondiente a la bolsa flagelar, donde quedan confinados los procesos de endo y exocitosis. Esta red proporciona una morfología estable y cierta movilidad contráctil. El glucosoma es un orgánulo único en los Kinetoplastidas que albergan las enzimas de las primeras etapas de la glucolisis y guarda semejanzas con los peroxisomas y glioxisomas de los eucariotas. El megasoma es un orgánulo lisosomal muy voluminoso que contiene, entre otras enzimas típicas de lisosomas, una alta proporción de cisteín-proteasas asociadas a la capacidad invasiva de los amastigotes del complejo *mexicana* (12,13).

Se acepta de forma general que la multiplicación de *Leishmania* es asexual (agamogonia). Se realiza por bipartición longitudinal de los promastigotes, excepto en las formas metacíclicas que no se dividen. Primero lo hace el núcleo, luego el corpúsculo basal, a continuación se forma el flagelo para finalmente dividirse el citoplasma. Los amastigotes se dividen bien por bipartición o bien por división múltiple (12, 13).

1.4. Ciclo de vida de la *Leishmania*

La mayoría de las leishmaniasis son zoonosis en las que distintas especies animales actúan como reservorio del parásito. En su inicio se trataría de parasitosis de animales salvajes, con la introducción accidental del hombre en el ciclo bio-epidemiológio del parasito (ciclo enzoótico o primario). Al desaparecer el reservorio salvaje del entorno humano, la adopción de animales domésticos susceptibles es el origen de las leishmaniasis de carácter zooantroponótico o secundario. Finalmente, el reservorio animal puede desaparecer y el hombre actuar como único hospedador vertebrado en un ciclo antriponótico o terciario. Así, en el mantenimiento de las leishmaniasis juega un papel fundamental la existencia de mamíferos hospedadores habituales de estos parásitos que constituyen la fuente de partida para su posterior propagación al hombre a través de los flebótomos vectores. Los carnívoros, fundamentalmente los cánidos y diferentes grupos de roedores ejercen usualmente este papel. Otras especies animales como los osos hormigueros, los perezosos, las zarigüeyas pueden actuar también como reservorios en Sudamérica (11,14).

El inicio del ciclo en el hospedador vertebrado tiene lugar cuando el flebótomo le inocula con su picadura los promastigotes infectantes o metacíclicos. Una vez llegan al hospedador vertebrado son captados por los macrófagos de la dermis y pasan a su citoplasma donde son englobados en una vacuola parasitófora, el parásito se transforma en la forma amastigote y se divide activamente por sucesivas divisiones binarias. La multiplicación y desarrollo en los macrófagos finaliza cuando la célula, que contiene unas decenas de parásitos, estalla. Los parásitos libres invaden otros macrófagos de la zona, en los que se repite el proceso multiplicativo, o bien se diseminan directamente a través de la piel o de la circulación cutánea hasta alcanzar las mucosas, o son arrastrados por el torrente sanguíneo y linfático, junto a los macrófagos circulantes, para localizarse en territorios orgánicos ricos en células macrofágicas fijas (médula ósea, hígado y bazo principalmente) (14).

El paso del parásito al vector tiene lugar cuando las hembras de los flebótomos se dirigen al hospedador vertebrado con el objeto de ingerir sangre para alimentarse y poder desarrollar sus huevos. La *Leishmania* se multiplica bajo la forma amastigote a su llegada al tubo digestivo del vector para luego pasar rápidamente a la forma promastigote que se multiplica activamente en su estómago e intestino. Finalmente y después de pasar por el estadio de promastigotes que también sufren un proceso de división binaria, los promastigotes

metacíclicos se sitúan en la región bucal o trompa del vector, desde donde pasarán al hospedador vertebrado (11,14).

Este protozoo presenta un ciclo de vida digenético, realizando parte de su ciclo en el tubo digestivo del hospedador invertebrado, bajo una forma flagelar denominada promastigote. Cuando el flebótomo parasitado ingiere sangre del hospedador mamífero, inocula con su saliva los promastigotes metacíclicos presentes en la probóscide; muchos de estos parásitos son eliminados por el hospedador y otros alcanzan las células fagocíticas donde son englobados en una vacuola parasitófora (fagolisosoma) con la finalidad de eliminarlo. Dentro del macrófago, el parasito sufre un proceso de transformación biológica que conlleva la pérdida del flagelo y otros cambios bioquímicos y moleculares que conllevan a las llamadas amastigotes intracelulares que le permitirán sobrevivir dentro de las células del mamífero (11).

Posteriormente, los macrófagos parasitados circulantes son ingeridos por otro flebótomo en cuyo intestino se liberan los amastigotes, estas formas del parasito se transforman en la zona posterior del tubo digestivo en promastigotes procíclicos provistos de un flagelo corto, a los que se denominan nectomonadas (24 a 48 horas). Estas formas promastigotes dentro del tracto digestivo del vector sufren una serie de modificaciones morfológicas que conllevan a las formas infectivas denominadas formas metacíclicas que serán inoculadas posteriormente permitiendo al parásito cerrar el ciclo biológico (11), Figura 4.

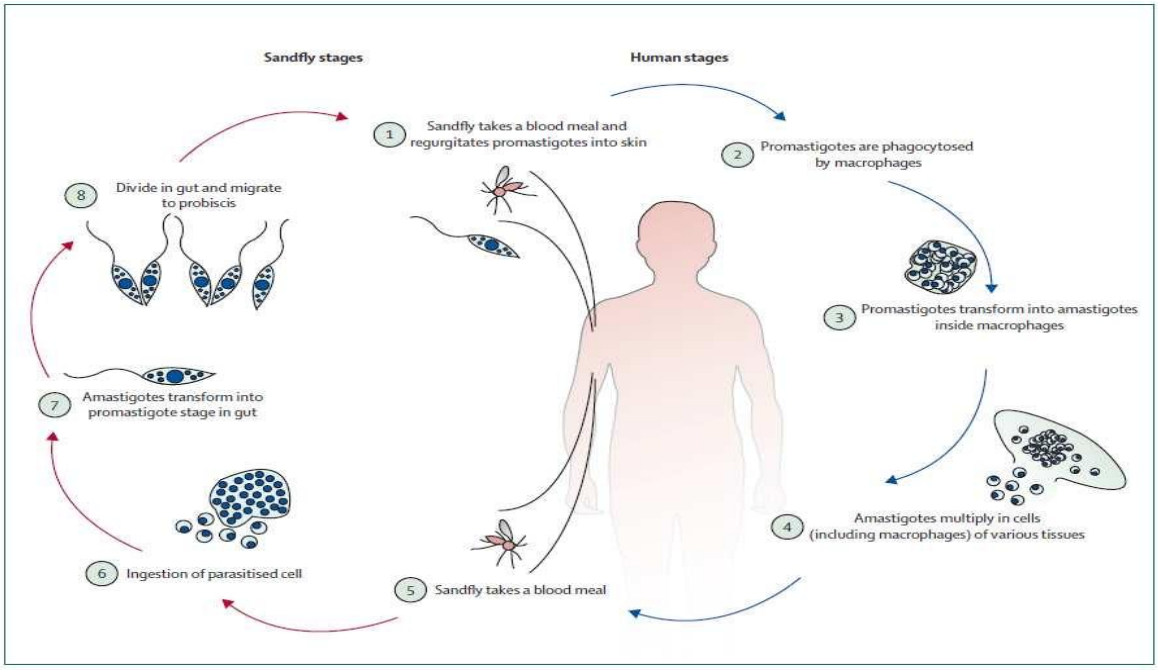


Figura 4. Ciclo biológico del género *Leishmania.* www.who.int/es

1.5. Epidemiología

La epidemiologia de la leishmaniasis puede alterarse por un cambio en alguno de las triadas epidemiológicas como los son los humanos, reservorios y vectores. Los factores ambientales, el desarrollo económico, la deforestación, la migración de zonas rurales a urbanas, los conflictos armados y sociales son los responsables de la dispersión del vector, lo que hace que la epidemiologia de la enfermedad y por consiguiente la distribución de las cepas de *Leishmania* (12,13).

Hasta hace pocos años, el impacto en la salud pública de la leishmaniasis fue subestimado. Durante los últimos 10 años, las regiones endémicas se han extendido y se ha producido un fuerte incremento en el número de casos registrados de la enfermedad (13).

En la actualidad, la leishmaniasis se produce en cuatro continentes y es considerada endémica en 98 países, 72 de los cuales son países en desarrollo (14,15, 25), Figura 5.

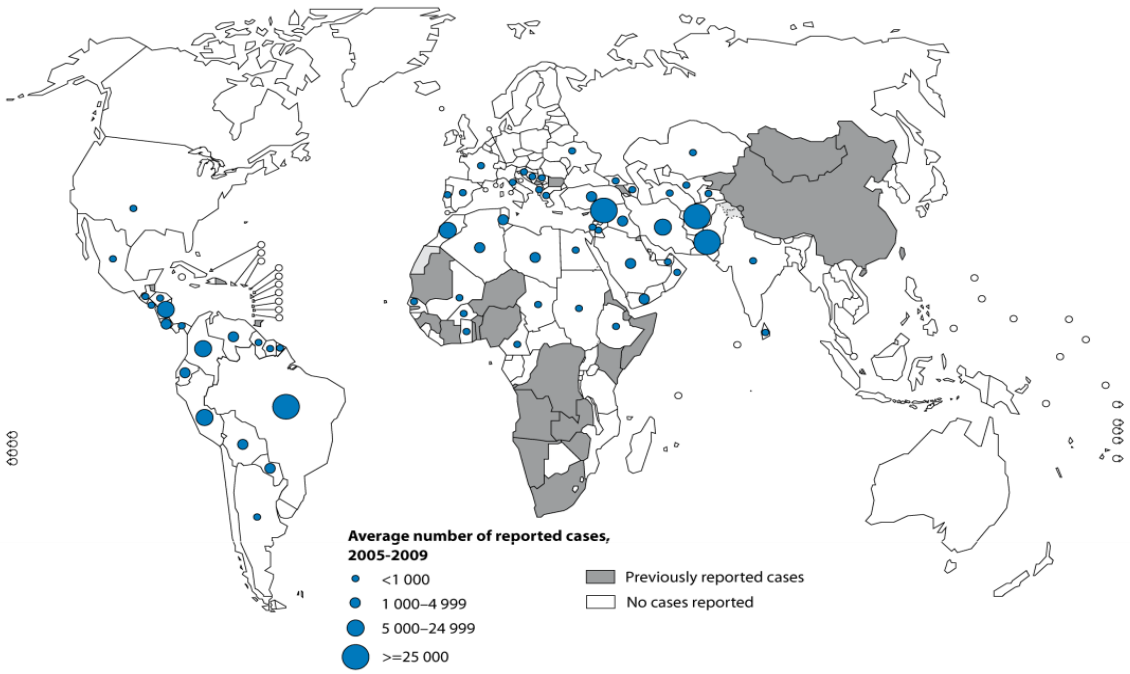


Figura 5. Distribución mundial de leishmaniasis cutánea, 2009. www.who.int/es

De acuerdo con la OMS, cada año se registran unos 500.000 casos de leishmaniasis visceral (el 90% en Bangladesh, el Brasil, la India, Nepal y el Sudán), que, según las estimaciones provoca más de 50.000 defunciones, y 1.500.000 casos de leishmaniasis cutánea (el 90% en

el Afganistán, la Arabia Saudita, Argelia, el Brasil, el Perú, la República Islámica de Irán y el Sudán). Sólo pueden hacerse estimaciones sobre la tasa mundial de mortalidad por leishmaniasis visceral, porque en muchos países no es una enfermedad de notificación obligatoria o a menudo no se diagnóstica, especialmente donde no hay acceso a la medicación (14,15), Figura 6.

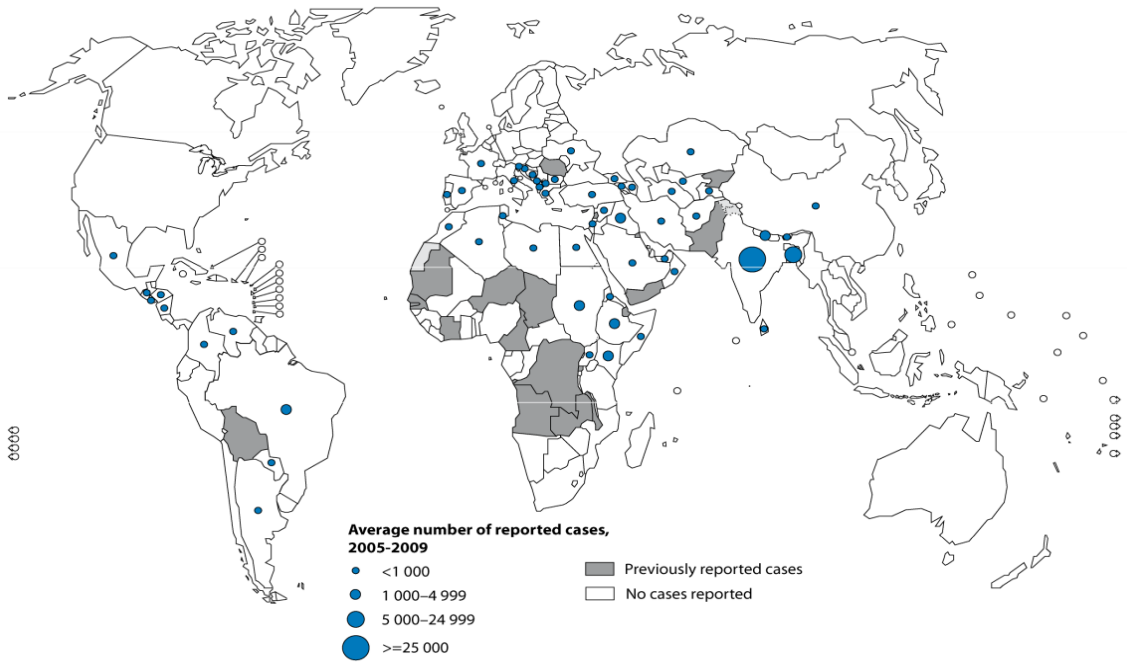


Figura 6. Distribución mundial de leishmaniasis visceral, 2009. www.who.int/es

El número de casos va en aumento, sobre todo por el incremento gradual de la transmisión en las ciudades, el desplazamiento de las poblaciones, la exposición de personas que no son inmunes a esta enfermedad, el deterioro de las condiciones sociales y económicas en las zonas urbanas periféricas, la malnutrición (con el consiguiente debilitamiento del sistema inmunitario), y la coinfección por el VIH que es un nuevo cuadro patológico, donde 34 de los 98 países endémicos han reportado casos de coinfección. En el sur de Europa, aproximadamente el 70% de los casos de leishmaniasis visceral en adultos están asociados con la infección por el VIH, donde se ha reportado el aumento del riesgo de la leishmaniasis visceral de 100-1000 veces en el sur de Europa y América del Sur (14, 17, 18).

En Colombia, durante la década de los 90 se notificaron 6.500 casos nuevos de leishmaniasis, para la década del 2000 se notificaron en promedio 14.000 casos lo cual

evidencia un incremento inusitado de los casos durante los últimos años. En el año 2005, se notificaron 18.097 casos de leishmaniasis, que representa un incremento de 3.794 casos (21.9%) al compararlo con el año 2004. De ellos, 17.983 casos correspondían a la forma cutánea (99.4%), a la forma mucosa 60 casos (0.3%) y a la forma visceral 54 casos (0.3%) (11). La leishmaniasis es una patología endémica en casi todo el territorio colombiano, excepto en San Andrés Islas y Bogotá D.C, se estima que en el país existen alrededor de 10 millones de personas en riesgo, y la transmisión principalmente en el área rural. (1, 11).

A nivel Nacional en el año 2009, se reportaron 15.477 casos de leishmaniasis de los cuales 7.542 fueron aportados por el Ejército Nacional, y en el año 2010 se reportaron 12.803 casos de los cuales 6.472 fueron del Ejercito, como se puede observar esta población tiene una alta morbilidad. (Salud Operacional Sanidad del Ejército, 2010), Figura 7.

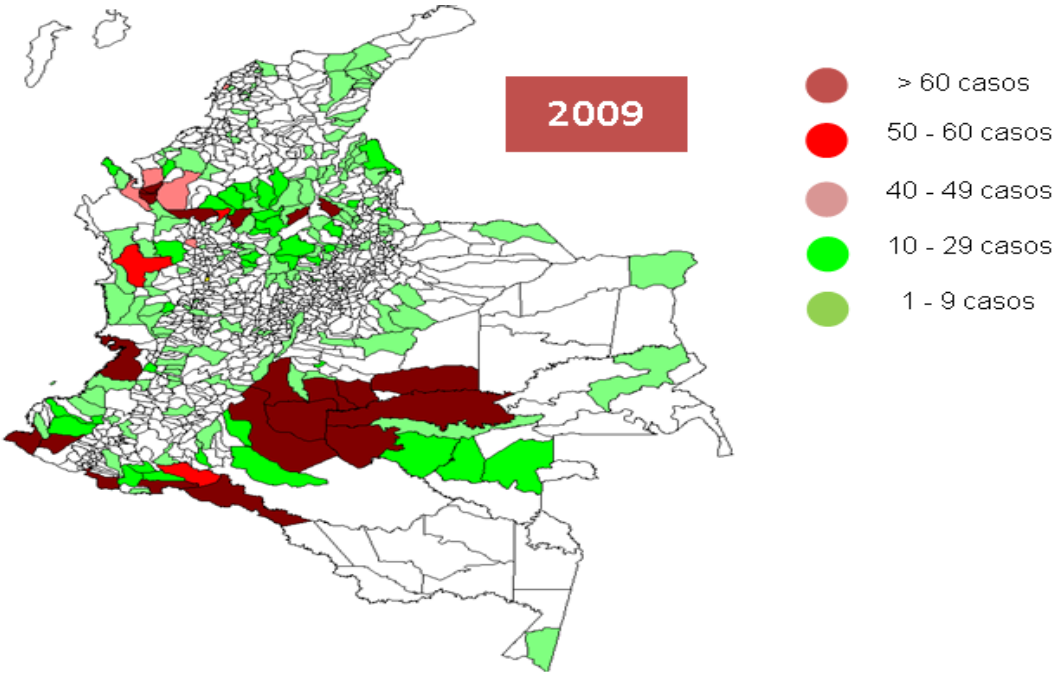


Figura 7. Reporte casos leishmaniasis cutánea Ejercito Nacional de Colombia. Salud Operacional Sanidad 2009.

La dinámica de la enfermedad entre los años 2005 y 2010 comparando lo reportado a nivel nacional y lo aportado por el Ejército se observa que aproximadamente que el 50% de los casos son reportados por estos. Figura 8.

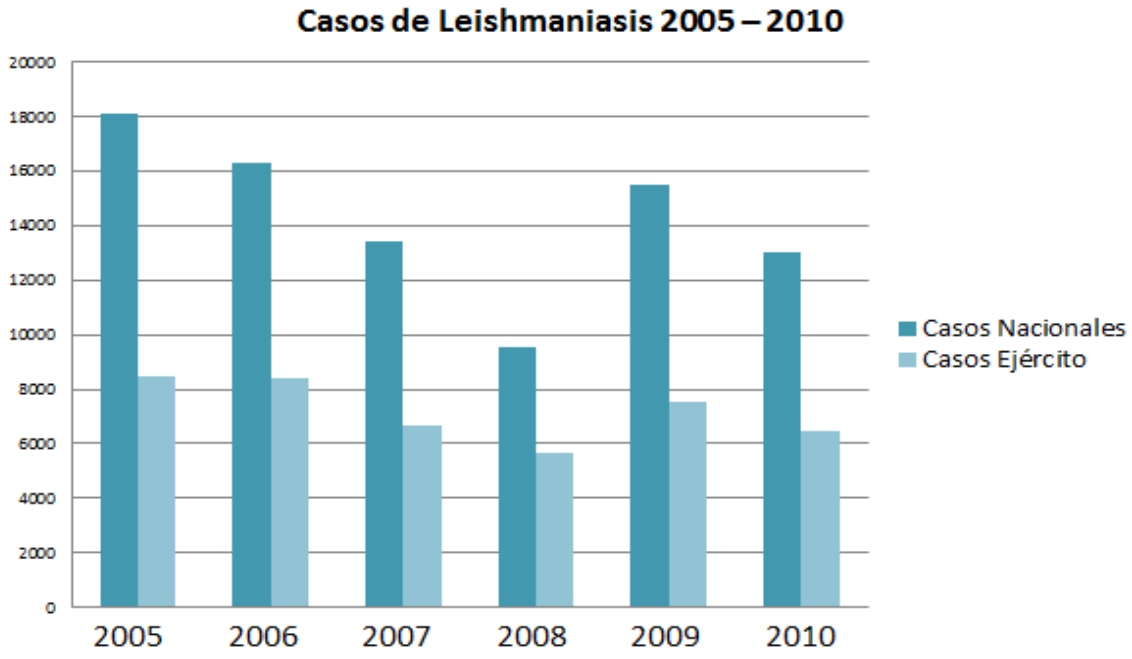


Figura 8. Dinámica de reporte de casos de Leishmaniasis a nivel Nacional y Ejército Nacional 2005-2010.

1.6. Características clínicas

1.6.1. Leishmaniasis cutánea

La leishmaniasis cutánea (LC) es la forma más común de la enfermedad. Por lo general, produce úlceras en las partes expuestas del cuerpo, tales como la cara, los brazos y las piernas. Puede haber un gran número de lesiones a veces hasta 200, que puede causar una discapacidad grave. Cuando las úlceras sanan, no siempre dejan cicatrices permanentes, pero en algunos casos las cicatrices de las ulceras son la causa de los prejuicios sociales graves (3).

Las lesiones se inician como pápulas que se convierten gradualmente en pequeños nódulos firmes que se van ulcerando gradualmente. Las manifestaciones clínicas varían de acuerdo con la respuesta inmune del hospedero, la especie del parásito y el tiempo de evolución de la infección (3,14), Figura 9.

Las úlceras típicas son redondeadas, con un fondo limpio de aspecto granular y bordes elevados y eritematosos, regularmente son indoloras. Otros pacientes jamás se ulceran y presentan lesiones nodulares o en forma de placa, en algunos casos vegetantes. Las úlceras

dejan una cicatriz característica, atrófica en su centro, de borde hiperpigmentado, con estriaciones estrelladas del centro a la periferia. La forma linfangítica se presenta cuando la úlcera se acompaña de nódulos que siguen el trayecto de los vasos linfáticos que drenan la lesión inicial (3,19).

La LC difusa se presenta en pacientes que tienen un defecto específico de la inmunidad celular y es causada *por Leishmania amazonensis* y *Leishmania mexicana*; se presenta con pápulas, placas y nódulos generalizados (3, 20).

Aunque la forma cutánea tiende a curarse espontáneamente, pueden dejar lesiones que, según la especie de *Leishmania*, pueden llegar a provocar leishmaniasis cutánea difusa, leishmaniasis recidivans o leishmaniasis mucocutánea, con consecuencias estéticas desastrosas para el paciente (3, 21,22).

En el año 2010 se presentaron 12.979 de leishmaniasis a nivel nacional de los cuales el 98.6% (12.803 casos) correspondieron a la forma cutánea, de los cuales el Ejército Nacional aporto 6403 casos (55%).

Figura 9. Lesión de leishmaniasis cutánea. Paciente del Ejercito Nacional.

1.6.2. Leishmaniasis mucocutánea

En la leishmaniasis mucocutánea (LMC), las lesiones pueden conducir a la destrucción parcial o total de las membranas mucosas de la nariz, la boca y las cavidades de la garganta y los tejidos circundantes, Figura 10. Al examen físico se puede encontrar eritema y edema

y en estados más avanzados ulceración, perforación y destrucción de tabique y mutilaciones. Los síntomas específicos son congestión, obstrucción nasal, prurito y epistaxis (3, 14, 23). La metástasis a las mucosas ocurre después de la diseminación hematógena o linfática aunque puede también ocurrir por extensión directa desde la piel a la mucosa vecina. Los síntomas principales son sensación de congestión y obstrucción nasal, prurito nasal, rinorrea serohemática o purulenta, epistaxis, hasta producir disfagia y cambios en el tono de voz. La infección bacteriana sobre-agregada es frecuente y severa e inclusive producir la muerte por compromiso del tracto respiratorio superior (3, 22, 23).

En el año 2010 en Colombia se presentaron 138 casos de LMC (1.06%) de los cuales 69 fueron aportados por las fuerzas militares.

Figura 10. Lesión de leishmaniasis mucocutánea. www.who.int/es

1.6.3. Leishmaniasis visceral

La leishmaniasis visceral (LV), también conocida como kala-azar, es la forma más grave de esta enfermad, resulta fatal en casi todos los casos, si no se trata. Pueden producirse brotes epidémicos con altas tasas de mortalidad. Una proporción variable de casos de leishmaniasis visceral puede convertirse en un tipo de leishmaniasis cutánea conocida como leishmaniasis dérmica post-kala-azar, afección que requiere un tratamiento prolongado y costoso (3, 22, 23).

Al picar el flebótomo el parásito invade las células del sistema retículo-histiocitario, se reproduce y se disemina por vía linfática o sanguínea hasta los macrófagos de médula ósea, hígado y bazo. La leishmaniasis visceral, es cada vez más frecuente como infección oportunista en pacientes infectados por el VIH.

Los síntomas pueden aparecer de una forma muy gradual o abruptamente, los más predominantes son fiebre intermitente, malestar general, astenia, anorexia, enflaquecimiento progresivo, palidez y hemorragias. Los signos clínicos son hepatoesplenomegalia, micropoliadenopatías, anemia y signos de desnutrición, Figura 11. Frecuentemente hay enfermedades intercurrentes como neumonía y tuberculosis. El diagnóstico y tratamiento oportuno y adecuado son de importancia para evitar las complicaciones y la mortalidad (3, 15, 21).

En Colombia en el 2010 se presentaron 54 casos (0.41%) de LV. En el Ejército Nacional no ha reportados casos de esta forma.

Figura 11. Leishmaniasis visceral en niños. www.who.int/es

1.6.4. Leishmaniasis cutánea post-kala-azar (LDPK)

Leishmaniasis cutánea post-kala-azar (LDPK) es una complicación de la leishmaniasis visceral en las zonas donde es endémica la especie de *Leishmania donovani*, se caracteriza por una erupción hipopigmentadas macular, maculopapular y nodular por lo general en pacientes que han recuperado de la LV, Figura 12. Por lo general, aparece entre 6 meses y 1 año o más después de la curación aparente de la enfermedad, pero puede ocurrir antes o incluso al mismo tiempo que la leishmaniasis visceral. Este tipo de lesiones se dan especialmente en el Sudán. LDPK cura espontáneamente en la mayoría de los casos en África, pero raramente en los pacientes en la India. Se considera que tienen un papel importante en el mantenimiento y contribución de la transmisión de la enfermedad sobre todo en los periodos interepidémicos de LV, actuando como un reservorio de parásitos (22, 24,25).

Figura 12. Leishmaniasis cutánea post-kala-azar. www.who.int/es

1.7. Genoma de Leishmania

1.7.1. Genoma nuclear

La *Leishmania* posee un genoma con características poco ortodoxas en su organización y expresión, en comparación con la mayoría de los eucariotas. Especies de *Leishmania* del viejo mundo tienen 36 pares de cromosomas (0.28-2.8 Mb), para *L. mejor* 32.8 Mb, mientras que las especies de *Leishmania* del nuevo mundo tienen de 34 o 35 pares de cromosomas, como por ejemplo *L. braziliensis* sólo tiene 35 cromosomas, debido a una fusión aparente de los cromosomas 20 y 34 (27).

Dichos cromosomas son lineales, entre 200 y 4000 Kb de longitud, posee telómeros, pero los centrómeros no han sido bien identificados (14, 26).

Anteriores estudios han establecido que el 30% del genoma se compone de elementos repetidos, aproximadamente la mitad de los cuales se encuentran ubicados en regiones telomérica/subteloméricas, y el resto, se dispersa en transposones, genes repetidos y otras secuencias simples. Ninguno de los genes que codifican proteínas de *Leishmania*, estudiadas hasta la fecha, contiene intrones, lo que simplifica la identificación de estos genes en el ADN genómico (10).

Las primeras comparaciones con otros genomas revelaron que el orden de los genes es altamente conservado entre las 30 especies de *Leishmania*. Sin embargo, un alto nivel de polimorfismo existe en las secuencias de ácidos nucleicos (10). Varios estudios sugieren que los cromosomas de *Leishmania* son principalmente diploides, con algunos cromosomas

siendo aneuploides. Hasta mediados de la década de los 90, la *Leishmania* era considerada un organismo aneuploide. Ahora la diploidía es ampliamente aceptada, la *Leishmania* se reproduce de forma asexual por fisión binaria, el nivel de ploidía fue impugnada ya que la amplificación del gen es un mecanismo frecuente por la que *Leishmania* resiste la acción de las presiones citotóxicas o ambientales (10, 26).

En *Leishmania* muchos genes se encuentran agrupados en unidades de transcripción policistrónicas y hacen que cada transcrito primario sea un ARNm precursor policistrónico. Los ARNm individuales son escindidos del precursor por medio de una reacción de trans-splicing, durante la cual, una secuencia líder de 39 nucleótidos (mini-exón, ME) se une a cada uno de los transcritos en el extremo 5'-, donándoles la estructura cap (residuo 7-metilguanosina) al mismo tiempo que el extremo 3'- de cada ARNm es poliadenilado, y generan así los ARNm maduros, las unidades policistrónicas pueden contener múltiples copias de un gen en tándem, así como también genes relacionados o no relacionados entre sí (10).

El genoma de *Leishmania* muestra una carencia acentuada de los factores conocidos de iniciación de la transcripción y la expresión génica está regulada casi completamente a nivel postranscripcional, a través del empalme de los ARNm y los mecanismos que involucran el procesamiento diferencial de la región no traducida 3' del ARNm (3'UTR). El genoma de *Leishmania* contiene secuencias de iniciación de la transcripción divergentes de las conocidas en otros eucariotes y éstas han sido explotadas como herramientas en el diseño de vectores de transfección. Poco se sabe acerca del mecanismo de iniciación de la transcripción en tripanosomátidos, y sólo unos pocos promotores han sido funcionalmente analizados. Diferentes procesos de modificación de proteínas ocurren dentro de Leishmania (fosforilación, glicosilación y lipidación para la estabilización y/o activación). Varias modificaciones importantes se han descrito y demostrado ser esenciales, como, glicosil-fosfatidil-inositol (GPI) de anclaje, acilación (incluyendo N-miristoilación y almitoilación) y prenilación, para facilitar la fijación de la membrana y/o las interacciones proteína-proteína (10).

La secuenciación del genoma de *L. major* nos ha revelado que tienen 911 genes ARN, 39 pseudogenes y 8298 genes codificadores de proteínas (36% de los cuales tienen una

función putativa). El genoma tiene un contenido de G+C de 59.7%. Los genes están organizados en tándem y tienen por lo menos dos o más copias en el genoma (10,26), Tabla 1.

Tabla 1. Resumen del genoma de *L. major, L. infantum y L. braziliensis*.

	L.major	*L. infantum*	*L. braziliensis*
Número de cromosomas	36	36	35
Contings	36	562	1,041
Tamaño (pb)	32,816,678	32,134,935	32,005,207
Contenido total G+C (%)	59.7	59.3	57.76
Genes codificantes	8,298	8,154	8,153
Pseudogenes	97	41	161
Contenido G+C codificante (%)	62.5	62.45	60.38

1.7.2. ADN Cinetoplasto

El cinetoplasto (kADN) es el ADN mitocondrial de los Kinetoplastidas y constituye el 10-20% del ADN total. Es una red de ADN circular concatenado (ver Figura 13), dividido en dos clases: los maxicírculos homogéneos (~ 25 a 50 moléculas de 20 kb) y los minicírculos heterogéneos (~ 0,8 kb), con muchas (~10^4) copias. El maxicírculo es el equivalente funcional al ADN mitocondrial, a pesar de su papel en la edición de los residuos de uracilo en nucleótidos del ARNm, codifican subunidades de los complejos respiratorios de la mitocondria. Los minicírculos codifican ARNs guía para la edición de la subunidad del citocromo oxidasa III ARNm, Figura 13. Por otra parte, Singh y Rastogi, 1999, han descrito un marco abierto de lectura sin precedentes en la región variable en una secuencia de minicírculos de *L. donovani*, que se transcribe y traduce a un producto de proteína (10, 27).

El kADN es rico en A+T (72-73%) a diferencia del ADN cromosómico, rico en G+C (>60%). La replicación del kinetoplasto se inicia por los minicírculos de manera muy organizada produciendo dos kinetoplastos hijos. Durante la fase S, los minicírculos individuales son liberados de una manera vectorial desde la red por la acción de una topoisomerasa II. (10,14, 28).

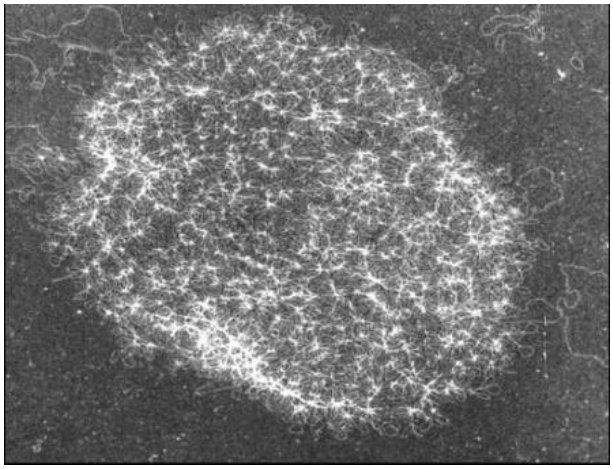


Figura 13. ADN de kinetoplasto (kADN) de *Leishmania*.

1.8. Diagnóstico

El diagnóstico de la Leishmaniasis cutánea tiene poca validez en cuanto a que las lesiones pueden variar en su apariencia clínica y severidad. El diagnóstico parasitológico se ha basado en la visualización directa del parásito mediante microscopia y en el aislamiento por cultivo. Recientemente se han descrito y usado metodologías moleculares dirigidas a la detección de ADN del parásito las cuales aplicadas adecuadamente han tenido sensibilidades altas frente a las técnicas parasitológicas estándar, aumentando los niveles de confianza en cuanto al diagnóstico convencional, además de brindar mayor confianza para la administración del tratamiento (28, 29, 30, 31).

1.8.1. Examen directo

El examen directo es un método rápido, económico y de fácil realización en unidades de salud con recursos mínimos. Su sensibilidad varía de acuerdo con el tiempo de evolución de la lesión (a menor tiempo de evolución mayor sensibilidad) la toma de muestras y la coloración de la muestra y la capacitación del personal que realiza la lectura de las láminas. En general puede decirse que la sensibilidad del examen directo es de un 85% a 90% (29), en pacientes cuya enfermedad no supere los cuatro meses de evolución y siempre y cuando el examen sea tomado de la manera adecuada. Se recomienda la toma de más de una muestra de una misma lesión, como mínimo tres preparaciones tanto del borde activo como del centro de la úlcera, lo cual aumenta la sensibilidad (30). Las lesiones crónicas se deben diagnosticar por aspirado y se recomienda el cultivo del mismo. Si la úlcera presenta signos de sobre-infección bacteriana, se debe administrar tratamiento antibiótico durante cinco días previo a la realización del examen directo (31, 32, 33).

1.8.2. Biopsia de piel

La biopsia es un procedimiento útil en el estudio de la leishmaniasis y se debe llevar a cabo después de que en el estudio del frotis de las lesiones no fue posible comprobar la presencia del amastigote. Su utilidad, además, radica en su relativa facilidad, establece un diagnóstico al demostrar los parásitos y determina otros procesos con los cuales se confunde la enfermedad clínicamente (30, 35, 36).

1.8.3. Cultivos *in vitro*

No existe un único medio de cultivo que sirva para el aislamiento de todas las especies de *Leishmania* ya que éstas difieren en su capacidad de crecer *in vitro.* Por esto, se han desarrollado diversos medios tales como el Medio de Novy, McNeal, Nicolle (NNN), el medio de Schneider´s Drosophila, medio de Seneka y Roswell Park Memorial Institute (RPMI 1640) entre otros. El cultivo se utiliza para obtener grandes cantidades de promastigotes con el fin de realizar la identificación de la especie (37, 38).

Los métodos tradicionales de cultivo consisten en sistemas de cultivo bifásico agar sangre con una capa líquida, tienen una sensibilidad del orden de 40 - 75%. Andrea K. Boggild *et al.* en 2008 (39) han evaluado otros métodos de cultivo como el microcultivo que consta de 70 µL en un capilar con medio líquido de una sola fase suplementado con suero fetal bovino (FBS). Este tiene la ventaja de ser menos costoso debido al menor volumen de medio utilizado y una reducción de costos de 10 veces entre tubos de cultivo tradicional y los tubos capilares, de más fácil uso y más sensible, incluso cuando carga parasitaria es menor. La sensibilidad de microcultivo está relacionada con las condiciones de microaerofília y niveles de CO_2 establecidos en el sistema, los cuales son permisivas para la transformación de amastigotes a promastigotes. Una limitación de microcultivo es que el microorganismo, una vez aislado es relativamente inaccesible debido a los extremos cerrados de los tubos capilares. Para sobrepasar esta dificultad se ha evaluado el uso de tubos Eppendorf de 1.5 ml utilizando medio monofásico líquido, el método de minicultivo que puede captar las ventajas de microcultivo y sistemas de cultivo tradicionales. Al igual que los tubos capilares, los tubos eppendorf son baratos, tienen un volumen pequeño y permiten la generación fácil de microerofília sin un significativo efecto de dilución. Al igual que el cultivo tradicional, estos tubos permitirían un fácil acceso a la cepa para el análisis posterior (39, 40, 41).

1.8.4. Pruebas serológicas

La detección de anticuerpos es un método diagnóstico de apoyo que sigue en importancia al parasitológico directo y siempre debe realizarse. Su positividad indica la respuesta humoral del huésped ante la presencia del parásito en el macrófago. Para la búsqueda de anticuerpos se utilizan varias técnicas tales como inmunofluorescencia indirecta (IFI), enzimoinmunoensayo (ELISA) y otras como hemoaglutinación. Todas ellas poseen una alta sensibilidad y especificidad para el diagnóstico de la leishmaniasis visceral aunque puede presentar reacciones cruzadas débiles con leishmaniasis cutánea, mucosa y la enfermedad de Chagas porque la respuesta celular en estas formas es baja. (42).

1.8.5. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

En los últimas dos décadas, la PCR y Real Time PCR se ha constituido en unas de las técnicas alternativas, sencillas, altamente sensibles y específicas que ha permitido identificar diferentes especies de *Leishmania* a partir de muestras de pacientes, cultivos, reservorios y vectores independiente de los cambios morfológicos del protozoo en su ciclo de vida (33, 53), así como de la respuesta inmune del huésped, pudiéndose detectar tanto en infecciones activas como en asintomáticas con el propósito de mejorar el poder discriminatorio de los métodos convencionales de tipificación (34, 43,54,55).

La PCR puede ser utilizada sobre las diferentes porciones invariables del ADN de *Leishmania* como el kADN que es considerado uno de los métodos más sensibles en el diagnóstico de leishmaniasis por tener ~ 10.000 copias por parasito (58); los genes que codifican el ARN ribosómico "ITS" (*Internal Transcribed Spacers*) que tiene de 40 a 200 copias, el mini-exon tiene de 100 a 200 copias (50,55), genes que codifican la cisteino-proteasa tipo B, amplificación del segmento 16S ARNr genes altamente conservados en *Leishmania*, regiones no transcritas como glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PD) que es una de las enzimas más ampliamente usados en la electroforesis enzima multilocus para la identificación de zimodemos de *Leishmania*, (51) secuencias repetitivas de ADN nuclear, regiones del gen de la ß-tubulina, ADN microsatélites, entre otros (46, 56,57).

Estos métodos tienen diferentes características: algunos identifican el parásito a nivel del complejo, mientras que otros identifican todas las especies de *Leishmania*. Esta información es importante con fines diagnósticos, sin embargo, una mayor especificidad pueden contribuir directamente a la comprensión de la epidemiología de la leishmaniasis (48, 49).

1.9. Caracterización de especies de *Leishmania*

Existe una necesidad real de diferenciar y caracterizar las poblaciones de los parásitos para mejorar el diagnóstico y tratamiento, evaluar las recaídas y reinfecciones, y establecer el pronóstico y control. La morfología de las distintas especies es indistinguible, pero su curso clínico es muy variado. Además, la taxonomía del género no está definitivamente cerrada, por los límites que impone la multiplicación clonal (52, 53). En general, se utilizan métodos extrínsecos (procedencia del sujeto infectado, lesión), es decir, métodos basados en el fenotipo, frente a métodos de caracterización intrínsecos, que analizan el genoma del parásito, y que son más sensibles y específicos en taxonomía (54, 55, 56).

1.9.1. Técnicas fenotípicas de caracterización

1.9.1.1. Electroforesis de enzimas multilocus (MLEE)

La caracterización mediante isoenzimas ha sido la técnica de caracterización fenotípica más ampliamente utilizada. Son enzimas con la misma función pero que presentan diferente movilidad cuando se someten a un campo eléctrico. El término "zimodemo" hace referencia a las poblaciones de parásitos de una misma especie que poseen los mismos perfiles enzimáticos. La caracterización enzimática se lleva a cabo en diferentes soportes, como son el acetato de celulosa, poliacrilamida y almidón, siendo este último el más utilizado, y el que tiene mejor rendimiento, finalmente se comparan con los patrones de los aislados de referencia para así identificarlos y caracterizarlos por zimodemos. Estas bandas pueden ser analizadas numéricamente mediante métodos estadísticos apropiados lo que permite observar la variabilidad de acuerdo a diferentes alelos o frecuencias genotípicas de loci que presentan distintos aislados de parásitos, lo cual ha sido un aporte importante en estudios taxonómicos. De hecho, se ha convertido en el método bioquímico más utilizado para distinguir las especies de *Leishmania*, y a comprender la epidemiología de la leishmaniasis cutánea y visceral (20, 41, 59, 60).

Sin embargo, esta técnica tiene varias desventajas, en primer lugar, se requiere de gran cantidad de masa celular y el uso de una gran cantidad de proteínas, en segundo lugar, es muy laborioso, necesita mano de obra intensiva, costosa y exigente técnicamente y en tercer lugar, tiene el poder discriminatorio relativamente pobre desde sustituciones de nucleótidos que no cambian la composición de aminoácidos llevando a ser detectados, al igual que los cambios en la composición de aminoácidos que no modifican la movilidad electroforética (10, 13, 58).

1.9.2. 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, no se modifica (59,60).

1.9.2.1. RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)

Los métodos para el genotipo de cepas dentro de las especies de parásitos de *Leishmania* están basados con una rápida PCR que proporcionan herramientas valiosas para estudiar la diversidad genética. La amplificación de ADN a partir de un número reducido de parásitos en volúmenes pequeños de muestra superar las limitaciones impuestas por cultivo in vitro, que pueden llevar a crecimientos selectivos y la selección de cepas (59).

Los métodos basados en PCR utilizados con mayor frecuencia para la genotipificación son la PCR de polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (PCR-RFLP). Esta es una herramienta rápida y sencilla que se han venido aplicando en estudios epidemiológicos moleculares. Ellos proporcionan información útil sobre la naturaleza y el alcance de la diversidad genética de las poblaciones de parásitos en una ubicación geográfica específica.

PCR-RFLP se mantiene en amplia utilización en la actualidad. Este método detecta pequeñas variaciones en un gen, la sustitución de una sola base se ha creado o suprimido un sitio capaz de ser digerida por una endonucleasa de restricción específica (60, 61, 62, 63).
Esta metodología se ha aplicado a varios genes en el género *Leishmania* tales como la gp63 secuencias codificadoras, la amplificación kADN, gen cisteín proteasa tipo B (CPB) y secuencias mini-exón (45,46, 60).

Se ha demostrado que esta técnica, tiene muchas ventajas sobre MLEE: tales como diferencia especies de *Leishmania* de más relevancia médica utilizando sólo una enzima de restricción, podría ser utilizado directamente de las muestras tomadas de humanos, animales o vectores tiene una sensibilidad 85,7% y tiene una gran diversidad de enzimas por lo tanto también podrían ser útiles para estudios taxonómicos, ecológicos y epidemiológicos en espacio y el tiempo (20, 41,62).

La 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. Las endonucleasas de restricción son capaces de encontrar dianas específicas en la secuencia de ADN (de 4 a 6 nucleótidos), y cortar en tantos fragmentos como dianas existan. El patrón de bandas que se visualiza tras la electroforesis y se visualizan en geles de agarosa, lo que se conoce como *fingerprinting* (63, 64, 65, 66).

Los protozoos del género *Leishmania* contienen una abundancia de cisteína proteasas de la familia de la papaína Cisteína proteasas que desempeñan un papel importante en la infección, reproducción, el desarrollo y el metabolismo de los protozoos. La actividad de la proteasa cisteína es necesario para la supervivencia de *Leishmania,* se han demostrado in vitro en *L. (L.) mexicana* que las proteasas de cisteína no sólo son factores de virulencia, sino también actúan como moduladores de la respuesta inmune.

Estos genes se encuentran presentes en el genoma en varias copias, que se expresan de forma diferencial, existen 19 copias, de las cuales las dos primeras (CPB1 y CPB2) se expresan en promastigotes metacíclicos, mientras que las restantes (CPB3-CPB19) solo se expresan en el amastigote (67, 68, 69).

1.10. Tratamiento

El tratamiento de las diferentes manifestaciones clínicas de la leishmaniasis se lleva a cabo con los mismos fármacos, tales como los antimoniales pentavalentes, la anfotericina B y la pentamidina, aunque la posología y la vía de administración difieren según los casos. La toxicidad asociada a estos fármacos leishmanicidas de uso común, junto con la aparición de fenómenos de resistencia a los mismos, ha originado la necesidad de obtener nuevos fármacos de diverso origen, como alternativa terapéutica (10, 14, 15).

La OMS recomienda para el tratamiento de la leishmaniasis los antimoniales pentavalentes, son agentes de primera elección (estibogluconato de sodio (Pentosan) o Antimoniato de Meglumina (Glucantime). El mecanismo de acción es a través de la inhibición de la actividad glicotica y la oxidación de ácidos grasos del amastigote; la dosis recomendada es

20mg/kg administrados por vía intramuscular o intravenosa diariamente durante 20 días en la forma cutánea y 28 días la forma mucocutánea y visceral. Estos medicamentos pueden tener graves efectos secundarios aunque por lo general reversibles como por ejemplo, dolores del músculo esquelético, fallas renales, hepatotoxicidad y cardiotoxicidad. En caso de recaída, los pacientes deben tratarse con medicamentos de segunda línea mucho más tóxicos, como la anfotericina B o la pentamidina. La anfotericina B liposómica carece prácticamente de efectos secundarios, pero no es asequible en los países en desarrollo por su costo (15, 70). En casos severos se han demostrado la eficacia de miltefosina por tener alta eficacia en el tratamiento de pacientes infectados con *L. panamensis*, con una reducida eficacia para los pacientes infectados con *L. braziliensis* y la termoterapia con radiofrecuencia, que también debe ser considerado como un tratamiento alternativo. Por lo tanto, para reducir efectos tóxicos, costos económicos, y el cumplimiento por parte del paciente al tratamiento, la mayoría de la investigación en la última década se ha centrado en el desarrollo de nuevas alternativas como nuevos tratamientos, modos de aplicación, dosis, horarios, condiciones de suministros por ejemplo parenteral *vs* local, o tópico *vs* oral) (14, 15, 70).

Numerosos estudios han demostrado que la administración intralesional de antimonio pentavalente es eficiente en el tratamiento de pacientes con Leishmaniasis cutánea causados por *L. trópica, L. braziliensis o L. panamensis*. Las ventajas de este enfoque es la entrada de un medicamento de mayor concentración en el sitio de la lesión, la reducción de efectos tóxicos sistémicos, mejorar el tiempo de curación, y la reducción de costos. Las desventajas son que no hay protocolo establecido (es decir, la cantidad de medicamento utilizado depende del número de lesiones, el tamaño y ubicación), y el tratamiento requiere una importante técnica y experticia por parte de las personas que lo administren, Tabla 2, (70, 71, 72, 73, 74).

Tabla 2. Rango de eficacia de los regímenes de tratamiento disponibles para la leishmaniasis cutánea producida por las principales especies de *Leishmania sp*. (15).

	Aplicación	Patología	Eficacia Clínica sobre *Leishmania spp*	Comentarios
Primera Línea de tratamiento				
Antimonio pentavalente				
20 mg/Kg diario por 20 días	Parenteral, intramuscular o intravenosa	LC	Todas las especies 36-96%	Efectos tóxicos secundarios, no usar en mujeres embarazadas
10-15 mg/Kg por 20-30 días	Parenteral, intramuscular	LC	Varias especies: >75%	Efectos tóxicos secundarios, no usar en mujeres embarazadas
20 mg/Kg por 28 días	Parenteral, intramuscular o intravenosa	LMC	*L. braziliensis, L. panamensis, L. guyanensis*: 10-75%	Efectos tóxicos secundarios, no usar en mujeres embarazadas
Protocolo variable	Local, intralesional	LC	*L. major*: 73% *L. tropica*: 75%	No efectos tóxicos secundarios a nivel sistémico
Tratamientos alternativos				
Amfotericina B				
1 mg/Kg diariamente	Parenteral	LC, LMC	*L. braziliensis:* desconocido	Efectos tóxicos secundarios
Pentamidina isotianato				
2 mg/Kg diariamente por 7 dosis	Parenteral	LC	*L. panamensis*: 95% *L. braziliensis*: 35%	Efectos tóxicos secundarios, especialmente en dosis altas.
4 mg/Kg diarios por 4 a 8 dosis	Parenteral	LC	*L. braziliensis*: 71%	---
Miltefosina				
2-5 mg/Kg por 28 días	Oral	LC	*L. panamensis*: 91% *L. braziliensis o L. mexicana*: 53%	Efectos tóxicos secundarios, no recomendado en usar en mujeres embarazada, ni en niños. También efectivo para tratar LM.
Termoterapia				
Una aplicación a 50°C por 30 seg.	Tópico	LC	*L. tropica*: 69%	No efectos secundarios, el uso depende d la lesión en número y medida.
Tres aplicaciones a 50°C por 30 seg por intervalos semanales	Tópico	LC	*L. braziliensis o L. mexicana*: 73%	No efectos secundarios, el uso depende d la lesión en número y medida.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo general

Determinar la utilidad de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en el diagnóstico e identificación de Leishmaniasis cutánea a partir de lesiones cutáneas del personal del Ejército Nacional de Colombia expuesto en zonas endémicas.

2.2. Objetivos específicos

1. Estandarizar la metodología de extracción de ADN y cultivo de *Leishmania* a partir de muestras clínicas del personal del Ejército Nacional que presente lesiones presuntivas de la enfermedad.
2. Estandarizar la metodología de PCR en la amplificación de la región del minicírculo del kinetoplasto como herramienta diagnóstica de leishmaniasis cutánea.
3. Comparar la especificidad y sensibilidad de la PCR-kADN frente a las técnicas convencionales de microscopia y cultivo.
4. Estandarizar e implementar de la identificación de especies de *Leishmania* subgénero *Viannia* por PCR-RFLP.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Tipo y Diseño de Estudio

Estudio descriptivo para la evaluación de pruebas diagnósticas de corte transversal según la temporalidad. Este estudio permitió evaluar la sensibilidad, especificidad y el grado de concordancia entre las tres pruebas diagnósticas (PCR, Cultivo, Frotis directo) para *Leishmania spp*, así como la exactitud con que estas pruebas orientan hacia un diagnóstico correcto.

3.2. Población de estudio

Se incluyeron al estudio 346 pacientes, con sospecha clínica de leishmaniasis cutánea, en las unidades de Tolemaida, Bonza, San José del Guaviare, Carepa, Larandia y Granada, previo consentimiento informado.

3.3. Tamaño de muestra

El tamaño de muestra fue calculada teniendo en cuenta las ecuaciones de población conocida y la proporción de casos dados por unidades militares que reportaron más casos durante el tercer trimestre del 2009, Tabla 3 y 4.

Tabla 3. Proporción de casos por Unidad Militar.

Censo poblacional año 2009	**554.435**
Riesgo poblacional	201.711
Casos de leishmaniasis III trimestre 2009	6.545
Prevalencia Población en riesgo	0.032
Tamaño de muestra	**346**

Tabla 4. Muestra de estudio, Unidades del Ejército Nacional.

Unidad	Muestra
Tolemaida	39
Bonza	46
Granada-Meta (BRIM 12)	8
Carepa (BASER 17)	37
Tolemaida FUCAD	68
San José del Guaviare (BR 22)	29
Larandia (BRCNA)	66
Tolemaida FUDRA	53
Total	**346**

3.4. Recepción e ingreso del paciente

Se realizó diagnóstico de leishmaniasis cutánea a todo paciente que cumplía con uno de los siguientes criterios:

- Lesiones cutáneas abiertas (úlcera franca o vegetante)
- Lesiones cutáneas cerradas (pápulas, nódulos, placas infiltradas, costrosas, indoloras) localizadas en cualquier parte del cuerpo.
- Lesiones verrugosas, nódulos que siguen el trayecto de los vasos linfáticos regionales.

Se explicó al paciente acerca del estudio y se entregó el formato de consentimiento informado. Una vez el paciente conoció y aprobó su participación en el proyecto se procedió a diligenciar algunos datos del paciente (Anexo 2) y se procedió a la toma de muestra.

3.5. Criterios de inclusión

1. Pacientes mayores de 18 años, hombres que pertenezcan al Ejército Nacional.
2. Buen estado de salud.
3. Que presenten lesiones características de leishmaniasis cutánea como ulceras,

placas, pápulas, Figura 14.

4. No estén recibiendo tratamiento en el momento de la toma de la muestra.
5. Que en opinión del investigador principal el paciente pueda entender y seguir el protocolo.

Figura 14. Lesión característica de leishmaniasis cutánea en personal del Ejército.

3.6. Criterios de exclusión

1. Paciente con lesiones sobre infectadas.
2. Pacientes que hayan recibido tratamiento durante los últimos tres meses.
3. Pacientes que estén recibiendo tratamiento con: Glucantime®, pentamidina, leishcutan, miltefosina, termoterapia o crioterapia en el momento a la toma de la muestra.
4. Pacientes que no puedan entender verbalmente o por escrito español o con discapacidad mental.

3.7. Toma de muestras

3.7.1. Toma de muestras para frotis directo

El examen directo se realizó haciendo limpieza de la lesión utilizando gasas y agua destilada, en algunos casos se retiró la costra para la toma de muestra, se hizo isquemia manual utilizando los dedos pulgar e índice, se raspó del borde interno de la úlcera con una lanceta o se hizo una incisión del borde activo de la lesión (en los casos en que la lesión sea cerrada, no ulcerada). Se extendió el material obtenido en una lámina portaobjetos nueva y limpia, previamente marcada con el número de registro correspondiente, esparciéndola suavemente en tres porciones, se dejaron secar, y se llevaron a colorear (Anexo 8) y se

almacenaron hasta su lectura, Figura 15 (5,23).

Figura 15. Toma de muestra para frotis directo

3.7.2. Toma de muestra para cultivo

Se tomó de la lesión el exudado aspirando con una jeringa de 3 cm con aguja calibre 25, la cual contenía 0.5 ml de una mezcla de antibióticos penicilina/estreptomicina (100 unid/ml penicilina y 100 µg/ml de estreptomicina), se cultivó en 0.5 mL de medio Schneider´s Drosophila suplementado con suero fetal bovino al 20% (Anexo 7) en un vial de 1.5 ml de Capacidad, Figura 16.

Figura 16. Inoculación del exudado en medio de cultivo, toma en campo.

3.7.3 Toma de muestras para PCR

De la misma manera que para la toma de muestra para frotis directo se realizó limpieza de la lesión utilizando una gasa y agua destilada, hizo isquemia manual utilizando los dedos pulgar e índice, se hizo incisión del borde activo de la lesión y se raspó con una lanceta. El material obtenido se colocó en un tubo Eppendorf conteniendo 400 µL de buffer PBS pH 7.4 y se guardó a 4°C hasta su procesamiento.

3.7.4. Diagnóstico parasitológico

Una vez tomadas las muestras se realizaron las lecturas de diagnóstico parasitológico tradicionales como microscopia y cultivo. Las muestras tomadas para frotis directo de la lesión fueron coloreadas con Giemsa para observar la presencia o ausencia de los amastigotes en microscopio de luz a un objetivo de 100X.

La técnica de cultivo utilizado en el estudio fue el llamado minicultivo (45,46) en tubos Eppendorf el cual contiene 0.5 ml de medio Schneider´s Drosophila enriquecido con suero fetal bovino al 20% (anexo 3), los cultivos fueron inoculados con la muestra tomada con antibiótico y se llevaron a incubación a 26ºC durante 28 días. Los cultivos fueron reportados como negativos a los 28 días de incubación. (39,40).

3.7.5. Cepas de Referencia y especímenes clínicos utilizadas

Se utilizaron 19 cepas de referencia representativas de *Leishmania*, para diagnóstico diferencial se utilizaron otros microorganismos causantes de infecciones cutáneas como: *Mycobacterium leprae, Mycobacterium chelonae, Mycobacterium fortuitum* y *Mycobacterium abcsesus*, como diagnóstico diferencial taxonómica se utilizó dos cepa de *Trypanosoma cruzi,* y 5 aislamientos de pacientes con lesiones de leishmaniasis cutánea tomadas en el Laboratorio para evaluación de la técnica de extracción de ADN y PCR, Tabla 5.

Tabla 5. Cepas de referencia utilizadas en la estandarización de las metodologías.

Microorganismo	Cepa	Fuente
L. (V) panamensis	MHOM/PA/71/L894 UA 140 MHOM/CO/87 2306 WR	CDFLA PECET Walter Reed Army Medical Center
L. (V) braziliensis	MHOM/BR/84/LTB300 UA 301 MHOM/CO/88 2802 WR	CDFLA PECET Walter Reed Army Medical Center
L. (V) guyanensis	MHOM/GF/79/LEM85 2853 WR	CDFLA Walter Reed Army Medical Center
L. (L) mexicana	3001 WR	Walter Reed Army Medical Center
L. (L) major	779 WR	Walter Reed Army Medical Center
L. (L) donovani	378 WR	Walter Reed Army Medical Center
L. (L) peruviana	2862 WR	Walter Reed Army Medical Center
L.(L) amazonensis	2827 WR	Walter Reed Army Medical Center
L. (L) tropica	2995 WR	Walter Reed Army Medical Center
M. leprae		CES, Medellín
M. abcsesus		Universidad Nacional
M. chelonae		Universidad Nacional
M. fortuitum		Universidad Nacional
T. cruzi	NC2	CIMPAT, Universidad de los Andes
T. cruzi		CES, Medellín
Leishmania spp	114003	Laboratorio de Ref. Ejército Nacional
Leishmania spp	117006	Laboratorio de Ref. Ejército Nacional
Leishmania spp	117007	Laboratorio de Ref. Ejército Nacional
Leishmania spp	121018	Laboratorio de Ref. Ejército Nacional
Leishmania spp	128002	Laboratorio de Ref. Ejército Nacional

3.8. Estandarización de la metodología

3.8.1. Cultivo de parásitos

Para la estandarización del cultivo a partir de muestras directas, se utilizó el método de campo descrito por Andrea K. Boggild, *et al.* en 2008 (45), en que se evaluaron dos nuevas técnicas de cultivo el microcultivo y minicultivo donde reportaron una sensibilidad de 84.7% y 76.3% respectivamente en comparación con los cultivos convencionales con una sensibilidad de 59.3%. Con base en este trabajo, se evaluaron estas dos técnicas utilizando las muestras tomadas en las bases de Tolemaida y Bonza en medio de cultivo Schneider´s Drosophila suplementado con suero fetal bovino al 20% (45,46) e incubando los tubos a 26°C hasta observar crecimiento o 28 días para descartarlo definitivamente como negativo. Las cepas recuperadas y las cepas de referencia fueron criopreservadas en glicerol al 10% (Anexo 6).

3.8.2. Extracción de ADN de *Leishmania*

Para la estandarización de extracción de ADN, primero se estudió el crecimiento del parasito con el fin de conocer el día ideal para la obtención de DNA para el caso de los cultivos de las cepas: se realizó una curva de crecimiento para determinar la fase de crecimiento logarítmico, fase de mayor cantidad de masa parasitaria para esto se realizaron cultivos en medio Schneider suplementado con suero fetal bovino al 20% de las cepas de referencia: *L. panamensis*, *L. braziliensis*, *L. guyanensis*, principales especies descritas para leishmaniasis cutánea en Colombia.

Se realizó cultivo en masa el cual fue dividido en 8 botellas de cultivo con medio Schneider´s suplementado. Cada día se tomó muestra para recuento en cámara de Neubauer, se utilizó colorante con azul de toluidina para evidenciar la viabilidad. Solo se incluyeron en el recuento los promastigotes coloreados. Este procedimiento se repitió durante 8 días.

Para la extracción de ADN de las cepas cultivadas y las muestras directas de pacientes, se realizó la comparación de dos métodos de extracción de ADN; por el método convencional de fenol-cloroformo (Anexo 4) y el Kit comercial de Wizard® SV Genomic DNA Purification System (Anexo5).

3.9. Estandarización de la PCR-kADN para género *Leishmania*

3.9.1. Análisis bioinformático

El análisis bioinformático de los primers OL-1 y OL-2 reportados por Cabrera O, *et al*. (49), se basó en analizar la especificidad con otras especies de la Familia *Trypanosomatidae* y con otros microorganismos causantes de lesiones en piel parecidas a la leishmaniasis como el género *Mycobacterium*, mediante la herramienta de búsqueda de BLAST del servidor NCBI (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi).

3.9.2. Condiciones de la PCR-kADN

Para la estandarización e implementación de la PCR en el laboratorio se utilizó las cepas de referencia y muestras de pacientes, empleando los primers OL1 y OL2 descritos y

utilizados por el Grupo de Entomología del Instituto Nacional de Salud (INS) para el estudio de insectos infectados, con las siguientes secuencias: (sintetizados por IDT Integrated DNA Techologies 100 nmol): OL1 (5´ GGG GAG GGG CGT TCT GCG AA 3´) y OL2 (5´CCG CCC CTA TTT TAC ACC AAC CCC3´). Con el empleo de estos iniciadores se amplificó una secuencia de 120 pb del ADN del kinetoplasto de *Leishmania,* utilizando el kit de GoTaq® Flexi DNA polimerase de Promega Corporation.

Las condiciones de la PCR se realizaron a un volumen final de 25 µL, con una concentración final de: 1X de *buffer* PCR (PROMEGA, USA. Cat. # M8295, 0.05 mM de mezcla de deoxinucleótidos trifosfatados (dNTPs: dATP, dTTP, dCTP y dGTP) (PROMEGA, USA. Cat. # U1515), 2 mM de MgCl2 (PROMEGA, USA. Cat. # M8295, 0.055 U/µL de enzima *Taq* polimerasa (PROMEGA, USA. Cat. # M8295 y 0.4 µM de los iniciadores OL-1 y OL-2. Se agregó finalmente 2 µL de templado de ADN sin diluir a cada una de las mezclas reactivas.

El perfil térmico optimizado para todas las PCR-kADN consistió de: un paso de denaturación de 94°C por 2 minutos, seguida por 30 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 55°C y 30 segundos a 72°C, terminando con un ciclo de 10 minutos a 72°C.

3.9.3. Visualización de los productos amplificados

La amplificación se evaluó mediante visualización de los productos en gel de agarosa por electroforesis a 100 Voltios (V) durante 1 hora (CAMBREX SEAKEM. Cat. # 50004) al 2% (p/v) en *buffer* TAE 1X (Cat. # V4271). Los geles se tiñeron con bromuro de etidio (10 mg/mL) (Cat. # H5041, Promega).

Para las corridas electroforéticas se sembraron 10 µL del volumen final de reacción (25 µL) y 5 µL de buffer de carga 6X (Gel Loading Buffer Cat. # G2526), el tamaño de los productos se comparó contra un marcador de peso molecular (MPM) con rango de 100 a 1500 pb (PROMEGA, USA. Cat. # G2101). El resultado final de la electroforesis se fotodocumento mediante la captura de imágenes en alta resolución bajo luz ultravioleta (UV) utilizando el transiluminador BioDoc-IT ™ Imaging System.

3.9.4. Especificidad analítica

Se evaluó la especificidad analítica de las técnicas moleculares (*primers*) mediante la amplificación de material genómico con cepas de referencia de *Leishmania*, así como especie perteneciente a la familia *Tryponosomatidae* como *Trypamosoma cruzi* y diferentes agentes infecciosos que afectan la piel y que pueden confundirse con las lesiones causadas por *Leishmania sp* tales como *Mycobacterium chelonae, Mycobacterium leprae, Mycobacterium fortuitum, Mycobacterium abscesus,* utilizando los protocolos químicos y térmico optimizados y la visualización de los productos de amplificación como se mencionó anteriormente.

3.9.5 Sensibilidad analítica

El estándar de oro es la demostración o comprobación parasitológica por cualquier metodología diagnóstica (OMS 2010, 78), para el análisis se tomó a todos pacientes que fueron reportados como positivos clínicamente o frotis directo, comparándolo con la PCR-kADN.

3.9.6. Límite de detección

Se determinó el límite de detección de la PCR-kADN mediante la amplificación por triplicado de material genético del agente infeccioso diana a concentración inicial conocida (ng/µL), sometido a dilución logarítmica en base 10 a punto final (1:10.000.000.000) y visualización de los productos de amplificación.

3.10. Identificación de especie por PCR-RFLP (Cisteín Proteasa tipo B)

3.10.1. Análisis bioinformático PCR- RFLP

Para el análisis de los primers empleados en este trabajo, son los descritos y utilizados en el PECET (Programa de Estudio y Control de Enfermedades Tropicales), amplificando el gen de la cisteín proteasa tipo B (67), del genoma de la *Leishmania sp*, basándose en el análisis de especificidad con otras especies de la Familia *Trypanosomatides* y del género *Mycobacterium* microorganismos causantes de lesiones en piel similares que la leishmaniasis, mediante la herramienta BLAST del servidor NCBI (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi).

3.10.2. Condiciones de la PCR-RFLP

Para la estandarización e implementación de la PCR en el laboratorio se realizó con las cepas de referencia y muestras de pacientes, empleando los iniciadores Fw CBP-1 y Rv CBP-2 con las siguientes secuencias: Fw CBP-1 (5´TGA CGG TGC CGA GGG TCC T 3´) y Rv CBP-2 (5´ CTA CTT GAA CGT GCA GAT 3´) sintetizadas por Biomol, que se utiliza como blanco molecular el gen de la cisteín proteasa de tipo B presente en todas las especies de *Leishmania*, se amplifico una secuencia de 1326 pb utilizando el kit de GoTaq® Flexi DNA polimerase de Promega Corporation (Cat. # M8295).

Las condiciones de la PCR se realizaron a un volumen final de 25 µL, con una concentración final de: 1X de *buffer* PCR (PROMEGA, USA. Cat. # M8295, 0.2 mM de mezcla de deoxinucleótidos trifosfatados (dNTPs: dATP, dTTP, dCTP y dGTP) (PROMEGA, USA. Cat. # U1515), 1.5 mM de MgCl2 (PROMEGA, USA. Cat. # M8295, 1.0 U/Rx de enzima *Taq* polimerasa (PROMEGA, USA. Cat. # M8295 y 0.4 µM de los iniciadores Fw CBP-1 y Rv CBP-2. Se agregó finalmente 2 µL de ADN.

El perfil térmico optimizado para todas las PCR-RFLP fue: un ciclo de denaturación a 94°C por 5 minutos, 35 ciclos de 40 segundos a 94°C, 1 minuto a 63°C y 2 minutos a 72°C y terminando con un ciclo de 8 minutos a 72°C.

3.10.3. Visualización de los productos amplificados

La eficiencia de la amplificación se evaluó mediante electroforesis a 100 Voltios (V) durante 30 minutos y visualización de los productos en gel de agarosa al 1.5% (CAMBREX SEAKEM. Cat. # 50004) al 1.5% (p/v) en *buffer* TAE 1X (Cat. # V4271). Los geles se tiñeron con bromuro de etidio (10 mg/mL) (Cat. # H5041, Promega).

Para las corridas electroforéticas se sembraron 5 µL del volumen final de reacción (25 µL) y 3 µL de buffer de carga 6X (Gel Loading Buffer Cat. # G2526), el tamaño de los productos se comparó contra un marcador de peso molecular (MPM) con rango de 100 a 1500 pb (PROMEGA, USA. Cat. # G2101). El resultado final de la electroforesis se fotodocumento mediante la captura de imágenes en alta resolución bajo luz ultravioleta (UV) utilizando el transiluminador BioDoc-IT ™ Imaging System.

3.11. Análisis de restricción enzimática con Kpn1 para identificación de especies Subgénero *Viannia*.

3.11.1. Análisis bioinformático

Se analizó por bioinformática los cortes realizados por la enzima Kpn1 en el programa de New England Biolabs Neb Cutter V2.0 en el servidor (http://tools.neb.com/NEBcutter2/).

3.11.2. Condiciones de la digestión

La técnica de la PCR-RFLP es una técnica basada en el corte con endonucleasa de restricción de los productos amplificados por PCR. Si dos productos amplificados presenta una variación de la secuencia nucleotídica, en los sitios de reconocimiento de las enzimas de restricción, generarán distintos patrones de fragmentos. Usando el producto de PCR del gen de la cisteín proteasa tipo B de 1.326 pb, se realizó la digestión con la endonucleasa de restricción Kpn1 (SIGMA, Nº Ref. R1258), enzima que permite diferenciación de *L. braziliensis* y *L. panamensis/L. guyanensis*, Tabla 6.

La mezcla de reacción de la restricción fue utilizando 10 µL del producto de PCR, 0.25 µL de la enzima KpnI, 2.5 µL de buffer 1X y 12.25 µL de agua MQ. Se incubó 1 hora a 37°C según condiciones del fabricante, y se visualizó en gel de agarosa al 1.5%.

Tabla 6. Fragmentos de los cortes realizados por las enzimas de restricción Kpn1.

Especie	Fragmentos
L. braziliensis	492, 834
L. panamensis/L. guyanensis	1326

3.12. Análisis de datos

Para la recolección de datos se construyó una base de datos en Excel 7.0. y para el análisis univariado y bivariado se construyó una base de datos en Epi-Info versión 3.5.1. de 2008.

4. RESULTADOS

4.1. Descripción de la población a estudio

Una vez incluidos los datos demográficos y epidemiológicos de los pacientes en la base de datos se procedió a hacer el análisis de los mismos. El 96% de los pacientes tenían un rango de edad entre los 18 a 33 años, el 3% entre 33 a 48 años y 1% no tenían dato, Figura 17.

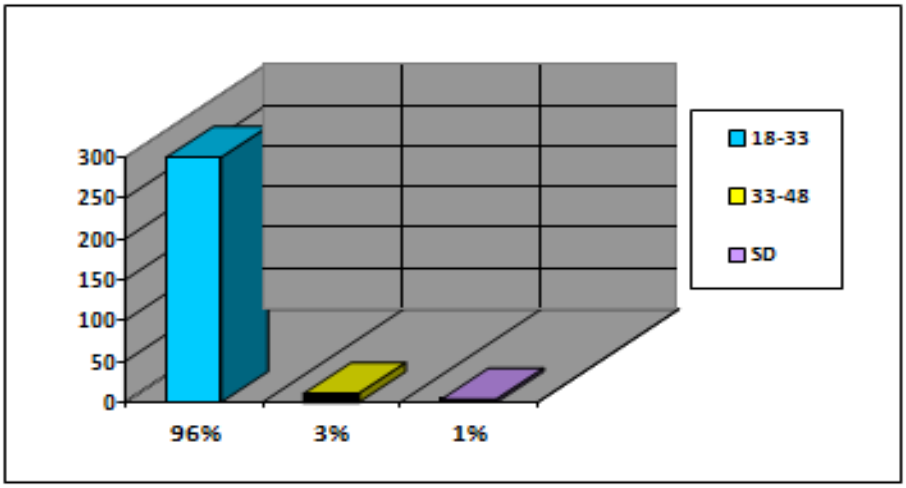


Figura 17. Frecuencia de edad.

El 43.9 % tenían de 1 o más tratamientos previos, dato muy importante ya que se podría considerar una problemática de recurrencia de la infección y/o resistencia a los medicamentos, Figura 18.

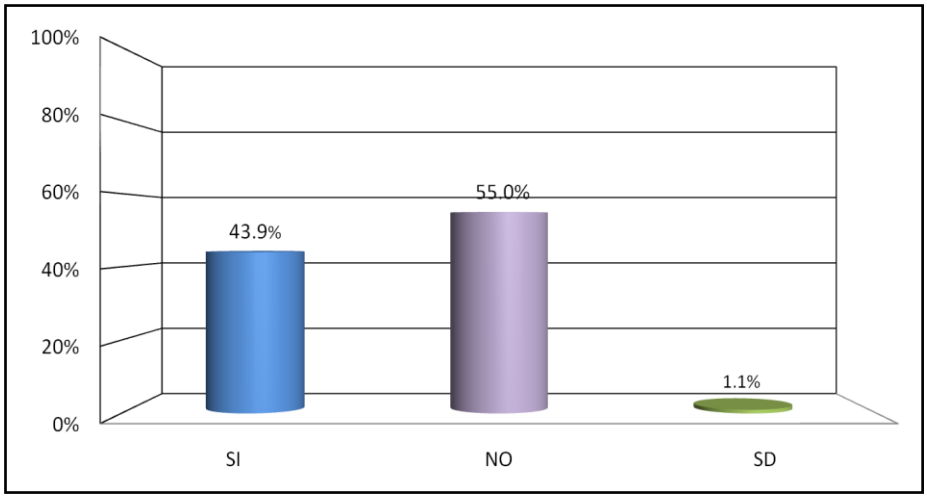


Figura 18. Tratamiento previo.

Se pudo observar que el 47% de los pacientes tenían un tiempo de evolución de la enfermedad de 0 a 30 días, el 33% entre 1 a 2 meses y la población restante (20%) tenían una evolución de la enfermedad entre 2 a 5 meses con lesiones de gran tamaño en su mayoría sobreinfectadas, Figura 19.

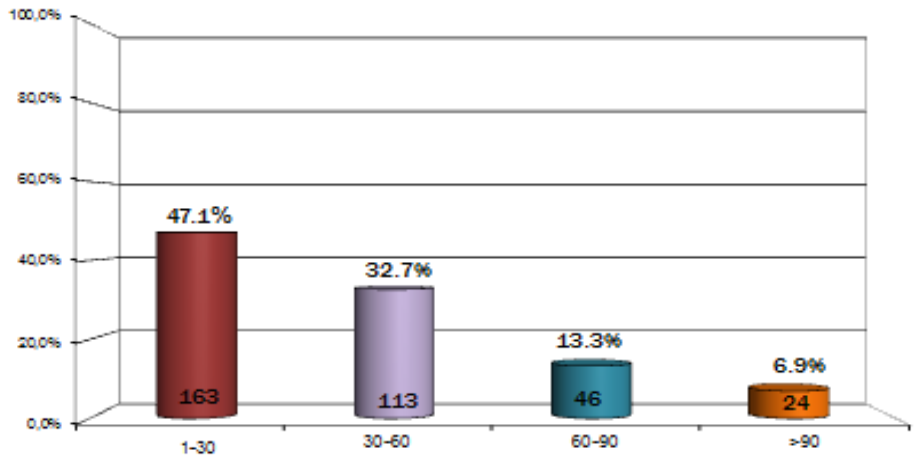


Figura 19. Frecuencia de tiempo de evolución de la enfermedad.

En cuanto a los episodios anteriores pudo notarse que el 45% de los pacientes presentaban recurrencias de la enfermedad ya fuese por reinfección al entrar nuevamente al área o bien por resistencia al tratamiento, Figura 20.

Figura 20. Lesiones de leishmaniasis cutánea sobreinfectadas en Personal del Ejército Nacional.

Con relación a sitio de la lesión pudo observarse que el 58% de los pacientes presentaban lesiones en las manos y antebrazos, el 22% en las áreas de cabeza, cara y cuello y el 20% restantes en las piernas, espalda, abdomen, glúteos, entre otros, Figura 21.

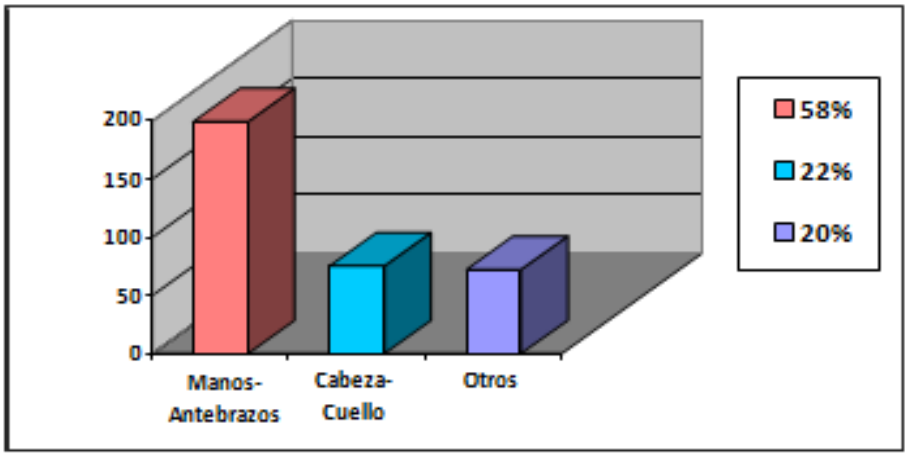


Figura 21. Frecuencia de sitios de lesión.

4.2. Estandarización de metodologías

4.2.1. Cultivo de parásitos

Para la estandarización del cultivo en muestras directas de pacientes, se tomó muestras en Tolemaida y Bonza, ensayando las dos técnicas de cultivo descritos anteriormente en la sección de materiales y métodos, se realizó la técnica de microcultivo en capilares con medio de cultivo Schneider´s suplementado con FBS 20%, Figura 22, no se obtuvo buenos resultados en este método, porque fue difícil la visualización de los parásitos por su pequeña superficie y la dificultad en el acceso a los parásitos, no se obtuvo crecimiento en los ensayos.

Figura 22. Técnica de microcultivo.

Se ensayó simultáneamente la técnica de minicultivo utilizando 500 µL de medio Schneider´s suplementado con FBS en viales de 1.5 mL de capacidad, Figura 23, fue el más indicado para el desarrollo del estudio por su bajo costo y la positividad de los cultivos de pacientes, sin embargo los resultados finales para este proyecto fue de una positividad del 7.2% en comparación con las otras metodologías propuestas, debido a que solo utilizamos el medio Schneider´s para el proceso ya que en el Laboratorio solo se contaba con este.

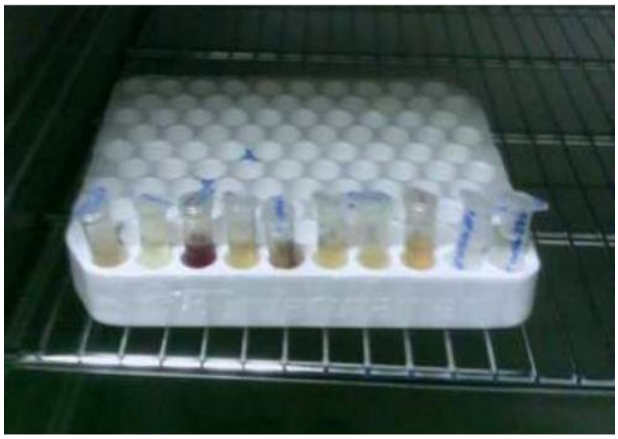


Figura 23. Técnica de minicultivo.

4.2.2. Extracción de ADN de *Leishmania*

Para la estandarización de la metodología de extracción de ADN de *Leishmania* se realizó a partir de 5 muestras clínicas de pacientes del Ejército Nacional (114003, 117006, 117007, 121018, 128002), y 9 cepas de referencia en cultivo, utilizando el método convencional con fenol-cloroformo (Anexo 4) y el kit de extracción de ADN Wizard® sv Genomic DNA Purification System. Promega. Cat #. A2361 (Anexo 5).

Como se describió en la sección de materiales y métodos para la estandarización de la extracción de ADN a partir de cultivo, se realizó las curvas de crecimiento para determinar la fase de crecimiento logarítmico, fase de mayor cantidad de masa parasitaria en tres especies: *L. panamensis, L. guyanensis* y *L. braziliensis*. Los resultados de las curvas se muestran en las Figuras 24, 25 y 26 y Tablas 7, 8 y 9.

Curva de crecimiento para *L. panamensis*:

Tabla 7. Recuento para curva de crecimiento de *L. panamensis.*

Día	Recuento
0	32,25
1	63,00
2	386,25
3	1.000,00
4	9.050,00
5	12.100,00
6	18.050,00
7	6.800,00
8	9.275,00

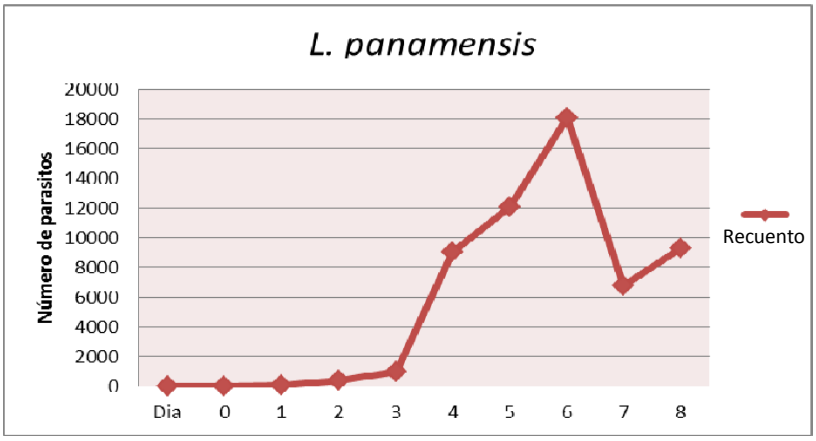


Figura 24. Curva de crecimiento de *L. panamensis*, recuento de parásitos.

Curva de crecimiento de *L. guyanensis:*

Tabla 8. Recuento para curva de crecimiento de *L. guyanensis.*

Día	Recuento
0	137,50
1	367,25
2	1.220,00
3	2.825,00
4	20.125,00
5	32.625,00
6	34.925,00
7	22.125,00
8	24.550,00

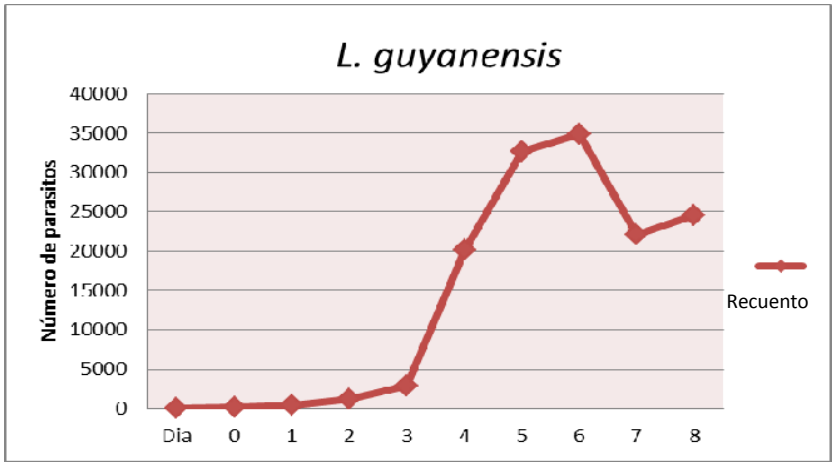


Figura 25. Curva de crecimiento de *L. guyanensis*, recuento de parásitos.

Curva de crecimiento de *L. braziliensis*:

Tabla 9. Recuento para curva de crecimiento de *L. braziliensis.*

Día	Recuento
0	79,75
1	105,75
2	213,00
3	1400,00
4	9600,00
5	15925,00
6	18000,00
7	14400,00
8	10500,00

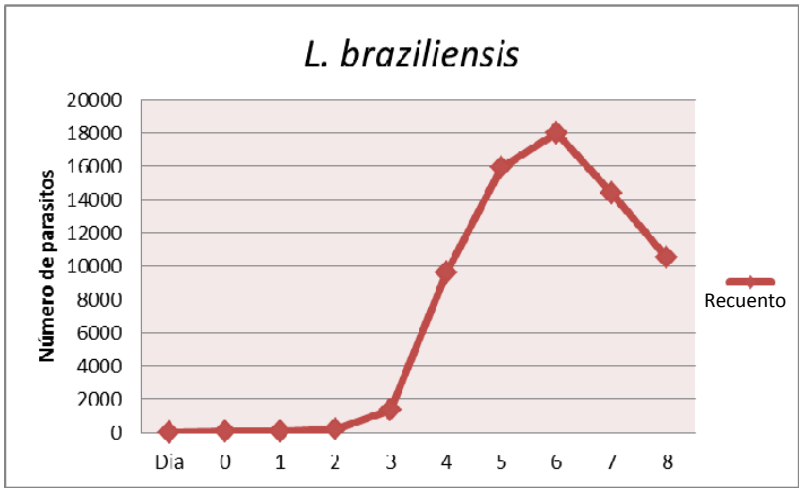


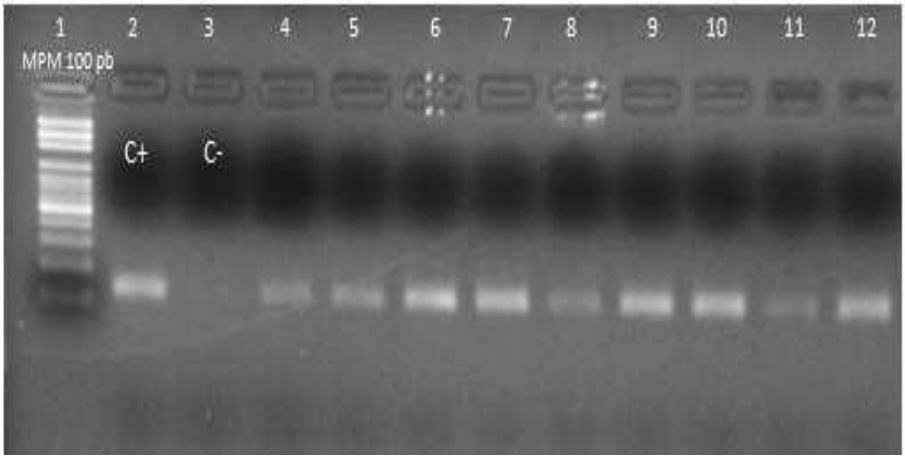
Figura 26. Curva de crecimiento de *L. braziliensis*, recuento de parásitos.

Con el proceso anterior para el caso de extracción de ADN a partir de cultivo, se tomaron los promastigotes después del cuarto hasta el sexto día para la estandarización de la extracción de ADN, sugiriendo al día 5 como el ideal para la obtención del ADN, porque la masa parasitaria en esta fase es abundante y de buena calidad por ser un ADN joven.

Para observar si se obtenía un buen producto extraído se realizó una PCR-OL, amplificando una banda de 120 pb. La amplificación se realizó con las condiciones de PCR y la visualización de los productos descritos en los apartados 3.9.2 y 3.9.3.

Los geles a partir de muestras extraídas con el kit Promega, evidencia una banda clara y bien definida del producto esperado; visible en los geles de agarosa. Figura 27.

Gel 1.



Gel 2.

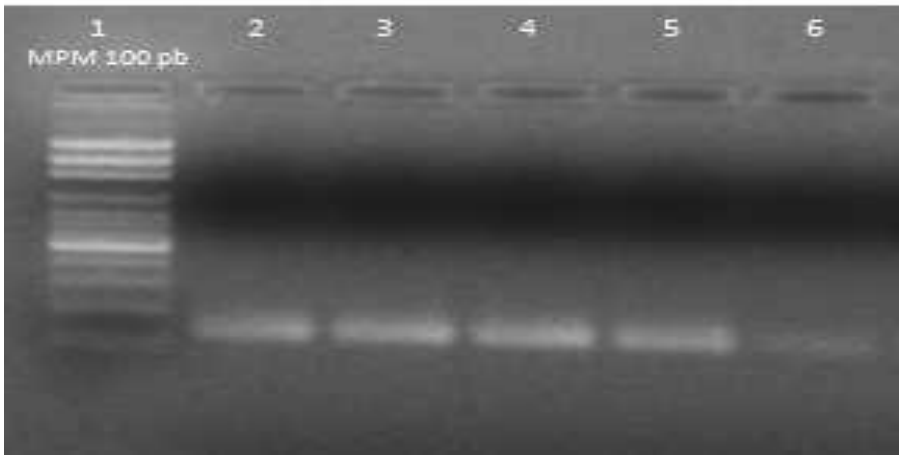


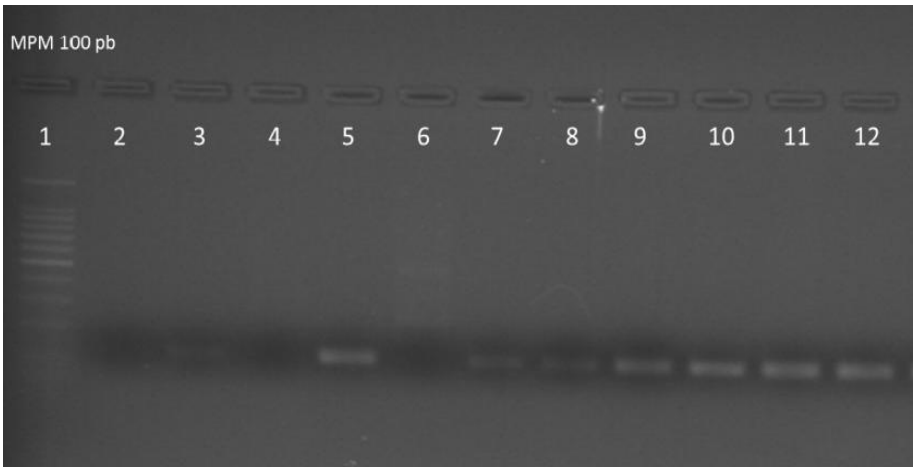
Figura 27. Resultado de la PCR-OL con extracción de ADN con kit Promega.

Gel 1: pozo 1: MPM 100 pb, pozo 2: control positivo (*L. panamensis* UA140), pozo 3 control negativo, pozos 4 al 8: muestras de pacientes, pozos 9 al 12: ADN extraído de cepas de referencia de *Leishmania* (*L. braziliensis, L. panamensis, L. guyanensis, L. amazonensis*).

Gel 2: pozo 1: MPM 100 pb, pozos 2 al 6: cepas de referencia de *L. mexicana, L. peruviana, L. donovani, L. mejor, L. trópica*.

La extracción de ADN por el método convencional de fenol-cloroformo, evidencia la presencia de una banda también visible un poco tenue que con el kit, pero de igual manera es clara para determinar la presencia del blanco molecular amplificado, Figura 28.

Gel 1.



Gel 2.

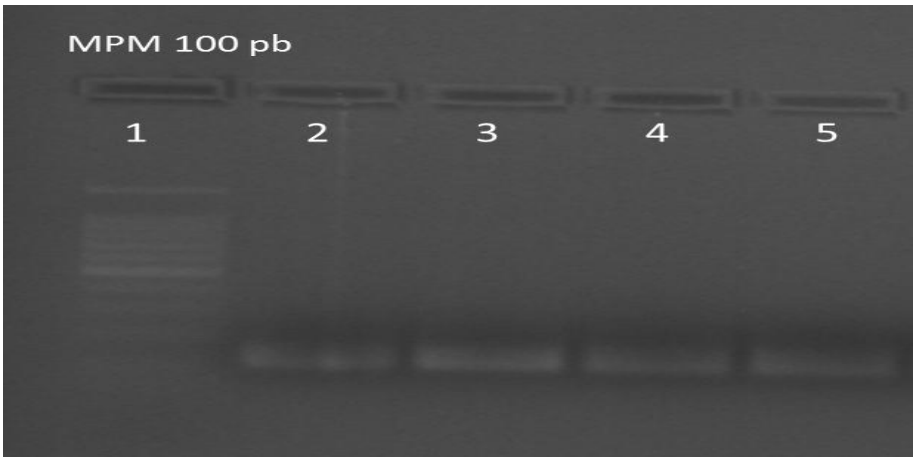


Figura 28. Resultado de la PCR-OL por método de extracción de ADN por método de fenol-cloroformo.

Gel 1: pozo 1: MPM 100 pb, pozo 2: control negativo, pozos 3 al 7: muestras de pacientes, pozos 9 al 12: ADN extraído de cepas de referencia de *Leishmania* (*L. braziliensis, L. panamensis, L. guyanensis, L. amazonensis*).

Gel 2: pozo 1: MPM 100 pb, pozos 2 al 5: cepas de referencia de *L. mexicana, L. peruviana, L. donovani, L. mejor, L. trópica*.

Con la comparación de los dos métodos de extracción fenol-cloroformo y el kit de Promega, se logró la amplificación del blanco molecular kADN por PCR, originando una banda de 120 pb esperada para los dos ensayos, se tuvo igual eficiencia evidenciada en los geles de agarosa.

4.3. Estandarización de PCR-kADN amplificando la región del minicírculo del cinetoplasto

Teniendo en cuenta el procedimiento anterior se realizó la estandarización y optimización de la técnica de PCR utilizando los primers OL-1 y OL-2 descritos por Cabrera *et al* (49), amplificando una región conservada de los minicírculos del cinetoplasto, en primera instancia se evaluó por bioinformática la especificidad de estos primers sobre el género *Leishmania*, además se evaluó esta especificidad con otras especies de la Familia *Trypanosomatidae* y con especies del género *Mycobacterium* causantes de lesiones en piel, se corrió Blastn una herramienta del NCBI, que nos permitió analizar que estas secuencias de los primers que solo amplifican el género *Leishmania* y no tenían ninguna similitud con otros microorganismos, Tabla 10.

Tabla 10. Análisis bioinformático de los primers OL. Blast-NCBI.

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
AJ131633.1	Leishmania infantum kinetoplast constant region	40.1	40.1	45%	0.004	100%
X98348.1	Leishmania donovani dDNA minicircle, clone NM12	40.1	40.1	45%	0.004	100%
X81881.1	L.donovani kinetoplast minicircle NM11 DNA	40.1	40.1	45%	0.004	100%
M94091.1	Leishmania amazonenesis DNA sequence	40.1	40.1	45%	0.004	100%
M94090.1	Leishmania amazonenesis DNA sequence	40.1	40.1	45%	0.004	100%
Z11555.1	L.mexicana kinetoplast minicircle DNA	40.1	40.1	45%	0.004	100%
Z11553.1	L.mexicana kinetoplast minicircle DNA	40.1	40.1	45%	0.004	100%
Z11552.1	L.mexicana kinetoplast minicircle DNA	40.1	40.1	45%	0.004	100%
Z11551.1	L.mexicana kinetoplast minicircle DNA	40.1	40.1	45%	0.004	100%
Y07904.1	L.donovani kinetoplast minicircle NM18	38.2	38.2	43%	0.014	100%
AF129739.1	Leishmania donovani kinetoplast DNA minicircle, partial sequence	38.2	38.2	43%	0.014	100%
AF092933.1	Leishmania donovani kinetoplast minicircle DNA, partial sequence	38.2	38.2	43%	0.014	100%
EU429383.1	Leishmania amazonensis clone AR512 minicircle DNA-like mRNA, partial sec	36.2	36.2	40%	0.056	100%
U19810.1	Leishmania amazonensis kinetoplast minicircle, partial sequence, fragment	36.2	36.2	40%	0.056	100%
AY145437.1	Leishmania mexicana kinetoplast minicircle, complete sequence	36.2	36.2	40%	0.056	100%
M21326.1	L.mexicana amazonensis (MHOM/BR/00/Raimundo) kinetoplast DNA, clone	36.2	36.2	40%	0.056	100%
M21327.1	L.mexicana amazonensis (MHOM/BR/00/Josefa) kinetoplast DNA, clone pM	36.2	36.2	40%	0.056	100%
AJ270147.1	Leishmania sp. kinetoplast minicircle DNA, isolated parasites	34.2	56.5	63%	0.22	100%
EU437407.1	Leishmania infantum isolate MCAN/ES/98/10445 clone LinGpja_9 kinetopla	32.2	32.2	36%	0.87	100%
EU437406.1	Leishmania infantum isolate MCAN/ES/98/10445 clone LinGpja_8 kinetopla	32.2	32.2	36%	0.87	100%
EU437405.1	Leishmania infantum isolate MCAN/ES/98/10445 clone LinGpja_7 kinetopla	32.2	32.2	36%	0.87	100%
EU437404.1	Leishmania infantum isolate MCAN/ES/98/10445 clone LinGpja_5 kinetopla	32.2	32.2	36%	0.87	100%
EU437403.1	Leishmania infantum isolate MCAN/ES/98/10445 clone LinGpja_4 kinetopla	32.2	32.2	36%	0.87	100%
EU370912.1	Leishmania tropica isolate Lt-TK-5 kinetoplast minicircle, partial sequence	32.2	32.2	36%	0.87	100%
EU370911.1	Leishmania tropica isolate Lt-TK-3 kinetoplast minicircle, partial sequence	32.2	32.2	36%	0.87	100%
EU370910.1	Leishmania tropica isolate Lt-TK-14 kinetoplast minicircle, partial sequenc	32.2	32.2	36%	0.87	100%
EU370909.1	Leishmania tropica isolate Lt-TK-13 kinetoplast minicircle, partial sequenc	32.2	32.2	36%	0.87	100%
EU370908.1	Leishmania major isolate Lm-FR-9 kinetoplast minicircle, partial sequence	32.2	32.2	36%	0.87	100%
EU370907.1	Leishmania major isolate Lm-FR-8 kinetoplast minicircle, partial sequence	32.2	32.2	36%	0.87	100%

Después de haber realizado el análisis bioinformático se realizó la optimización de los reactivos para la mezcla de PCR, para esta estandarización se utilizó ADN de las cepas de referencia de *L. panamensis*, *L. braziliensis*, *L. guyanensis*, *L. amazonensis* y *L. mexicana* ADN extraídas de las muestras de los pacientes tomadas para el proyecto. Como se pueden ver en las fotos de los geles a continuación se observan las bandas esperadas de 120 pb, específico para el género *Leishmania*. Esta PCR se utilizó como screening para determinar la infección con leishmaniasis del personal militar, Figura 29, 30 y 31.

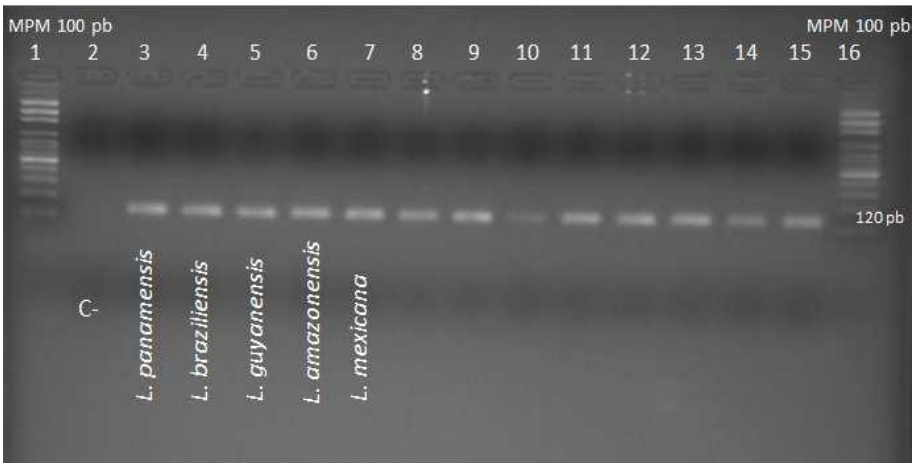


Figura 29. Gel. 1. Producto resultante de la PCR-kADN, amplificando una región del kinetoplasto de 120 pb.

Los pozos 1 y 16 contiene MPM de 100 pb, pozo 2: control negativo, pozo 3: *L. panamensis*, pozos 4: *L. braziliensis*, pozo 5: *L. guyanensis*, pozo 6: *L. amazonensis*, Pozo 7: *L. mexicana*, Pozo 8-15: muestras de pacientes a partir de la lesión.

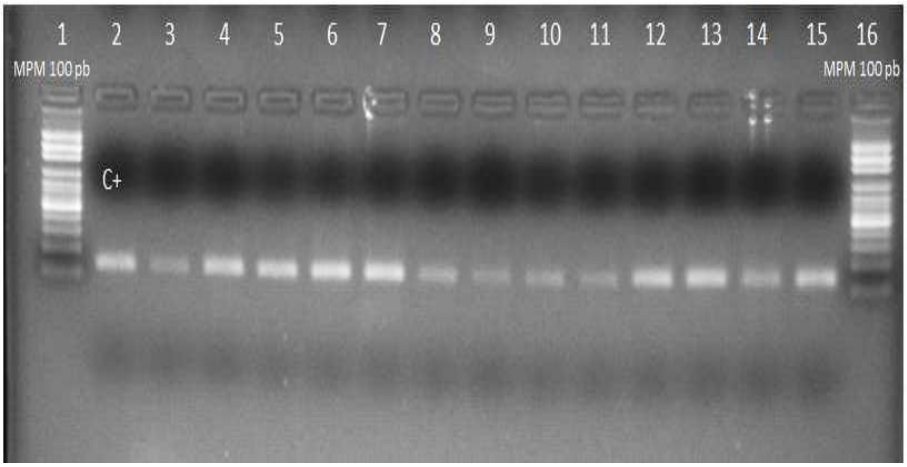


Figura 29. Gel. 2. Producto resultante de la PCR-kADN, amplificando una región del kinetoplasto de 120 pb.

Los pozos 1 y 16 contiene MPM de 100 pb, pozo 2: control positivo (*L. panamensis*), pozos 3 al 15: muestras de pacientes a partir de la lesión.

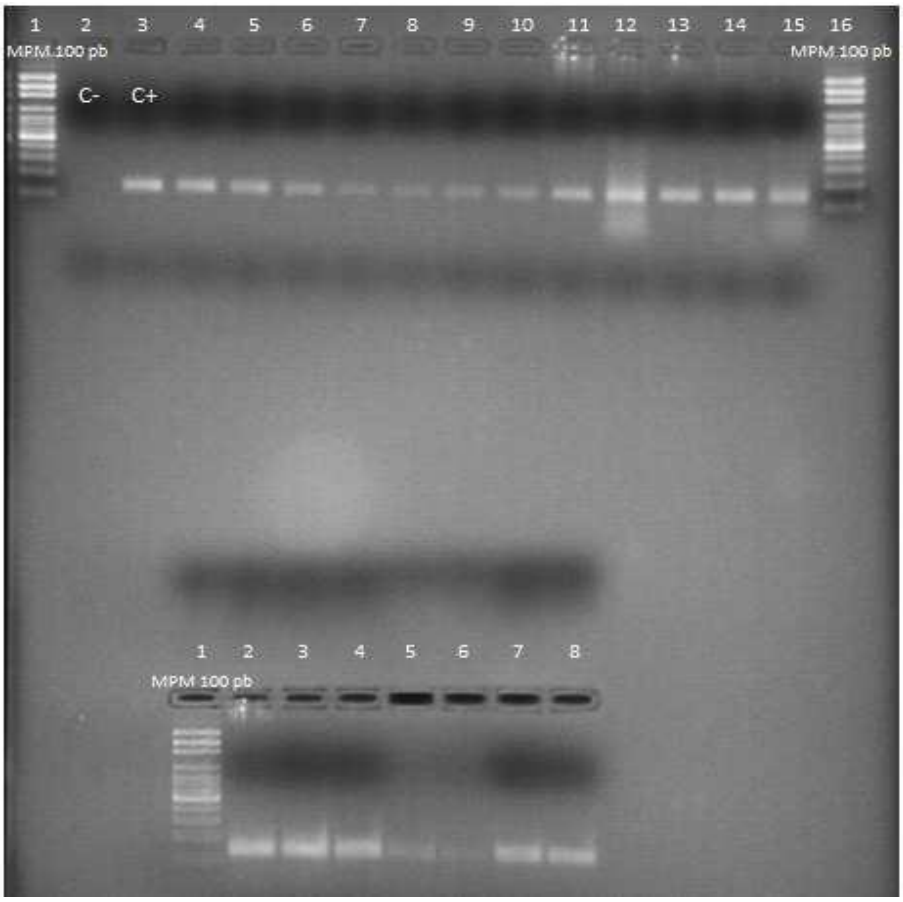


Figura 30. Gel. 3. Producto resultante de la PCR-kADN, amplificando una región del kinetoplasto de 120 pb.

Los pozos 1 y 16 (carril 1) y pozo 1 (carril 2) contiene MPM de 100 pb, pozo 2 (carril 1): control negativo, pozo 3(carril1): control positivo (*L. panamensis*), pozos 4 al 15 (carril 1) y pozos 2 al 8 (carril 2): muestras de pacientes a partir de la lesión.

4.4. Especificidad y sensibilidad analítica

Para verificar la especificidad de la PCR, se extrajo en paralelo; ADN de cepas pertenecientes al género *Mycobacterium* tales como *M. abscesus*, *M. fortuitum* y *M. chelonae*, además de ADN de *Trypanosoma cruzi*, especie perteneciente a la misma familia que el género *Leishmania*. Se realizó la PCR-OL junto a ADN de cepas de referencia de *Leishmania*. Las condiciones de metodología de PCR y su visualización se realizaron como se describió en el capítulo de materiales y métodos, este corrido nos permitió ver la banda de 120 pb, lo que nos indican que los primers solo son específicos para el género *Leishmania*, Figura 32.

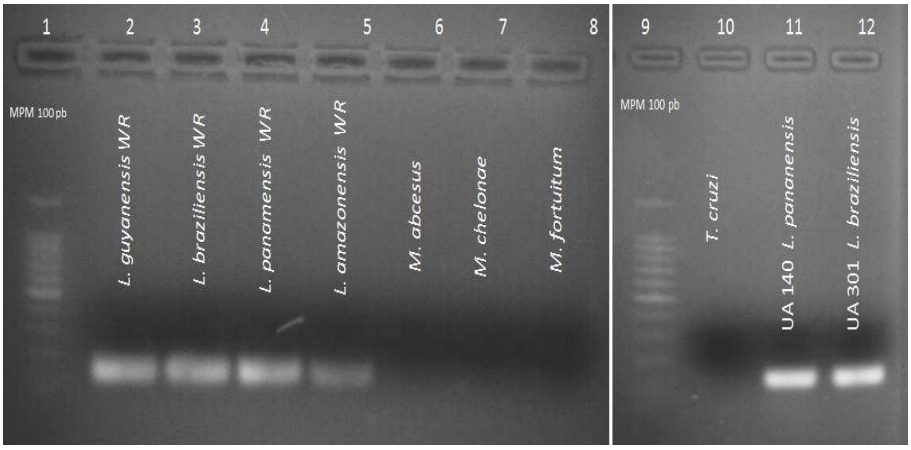


Figura 31. Especificidad de la PCR OL, con cepas de referencia del Género *Leishmania*, especies del Género *Mycobacterium* y *T. cruzi*.

La sensibilidad de la PCR-OL, frente a las técnicas convencionales de microscopia y cultivo para el diagnóstico de la enfermedad, los resultados obtenidos en este trabajo con las metodologías diagnósticas se obtuvo una positividad del 47.0 % por frotis directo y del 98 % por PCR.

La positividad por cultivo fue del (7.2%), aislando los promastigotes de *Leishmania* en 25 de los 346 cultivos realizados.

Tabla 11. Sensibilidad de las metodologías de diagnóstico de leishmaniasis.

Metodologías	Positivo	Negativos	Sin Dato	N total
PCR	338(98.0%)	8(2.0%)	0	346
Cultivo	25 (7.2%)	321 (92.8%)	0	346
Frotis directo	162 (47.0%)	182 (53.0%)	2 (0.6%)	346

La concordancia entre el frotis directo y la metodología de PCR fue del 46.0%. El cultivo tuvo una concordancia del 100% frente al frotis directo y la PCR, Tabla 10.

No se observaron diferencias significativas al comparar el tiempo de evolución de la enfermedad y la positividad de las metodologías de frotis directo y PCR. Sin embargo la

PCR mostro en todo momento una positividad mayor que las otras metodologías empleadas, Tabla 11.

Tabla 12. Análisis de exactitud. Detección de las metodologías dependiendo de la evolución de la enfermedad.

Método	Tiempo de evolución en días			
	0-30	**31-60**	**61-90**	**> 90**
Frotis	50% (81/163)	41% (46/112)	48% (22/46)	58% (14/24)
PCR	96% (156/163)	99% (111/112)	98% (45/46)	96% (23/24)

Cinco de los pacientes resultaron negativos mediante las 3 metodologías utilizadas, los cuales tuvieron una nueva evaluación clínica para descartar la enfermedad o confirmarla, por otras metodologías de diagnóstico.

La especificidad de la PCR-OL fue del 100% ya que no hubo amplificación de los controles negativos, ni de los ADN *de Mycobacterium* y *T. cruzi*; utilizados para este análisis. La sensibilidad de la PCR-OL fue del 98% en comparación de las metodologías convencionales utilizadas.

4.5. Límite de detección

Para evaluar el límite de detección para la PCR-OL se realizó por triplicado el ensayo utilizando un ADN previamente cuantificado con 37 ng/µL, a partir de este ADN se realizó una serie de diluciones en base 10 hasta llegar a la dilución 10^{-10}, a esta serie de diluciones se le realizo la PCR-OL y se corrió en gel de electroforesis al 2%.

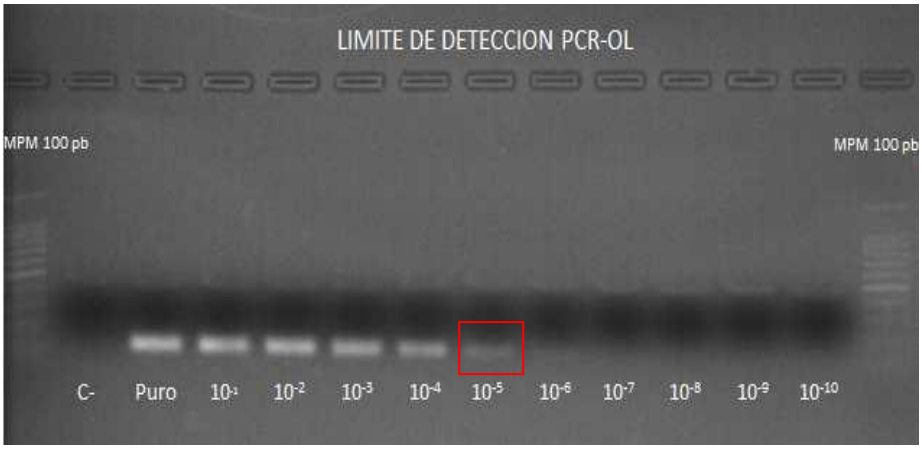


Figura 32. Límite de detección de la PCR-OL.

Como se puede observar con las bandas de las diluciones 10^{-4} y 10^{-5} con 0.0037 ng/µL (3.7 pg/ µL) y 0.00037 ng/µL (0.37 pg/µL) respectivamente, el límite de detección de la PCR-OL es de 0.37 pg/µL, esto quiere decir que se requiere de 2 parásitos para obtener una banda claramente visible, Figura 33.

4.6. Estandarización e implementación de la PCR-RFLP para identificación de especie

Como se describió en el apartado 4.3, se realizó el análisis bioinformático de los primers utilizados para la amplificación del gen de la cisteín proteasa tipo B, se corrió Blastn del NCBI donde se observa la especificidad de estos primers para amplificar el género *Leishmania*, además se verificó esta especificidad corriendo la PCR con otros microorganismos causantes de lesiones de piel como son el género *Mycobacterium*, y la especificidad de género amplificando la especie de *Trypanosoma cruzi* perteneciente a la misma familia del género *Leishmania*.

Tabla 13. Análisis bioinformático de los primers CBP 1 y 2. Blast-NCBI.

Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
GQ180933.1	Leishmania guyanensis cysteine protease (CPB) gene, complete cds	40.1	40.1	52%	0.002	100%
EU289030.1	Leishmania panamensis cysteine protease gene, complete cds	40.1	40.1	52%	0.002	100%
XM_001562091.1	Leishmania braziliensis MHOM/BR/75/M2904 cathepsin L-like protease (Lb	40.1	40.1	52%	0.002	100%
XM_001562090.1	Leishmania braziliensis MHOM/BR/75/M2904 cathepsin L-like protease (Lb	40.1	40.1	52%	0.002	100%
XM_001562089.1	Leishmania braziliensis MHOM/BR/75/M2904 cathepsin L-like protease (Lb	40.1	40.1	52%	0.002	100%
AM494945.1	Leishmania braziliensis chromosome 8	40.1	233	52%	0.002	100%
XM_001686412.1	Leishmania major adenosine kinase-like protein (LmjF34.3600) partial mRI	36.2	36.2	47%	0.034	100%
XM_001562091.1	Leishmania braziliensis MHOM/BR/75/M2904 cathepsin L-like protease (Lb	40.1	40.1	52%	0.002	100%
XM_001562090.1	Leishmania braziliensis MHOM/BR/75/M2904 cathepsin L-like protease (Lb	40.1	40.1	52%	0.002	100%
XM_001562089.1	Leishmania braziliensis MHOM/BR/75/M2904 cathepsin L-like protease (Lb	40.1	40.1	52%	0.002	100%
AM494945.1	Leishmania braziliensis chromosome 8	40.1	233	52%	0.002	100%
XM_001686412.1	Leishmania major adenosine kinase-like protein (LmjF34.3600) partial mRI	36.2	36.2	47%	0.034	100%
XM_001468658.1	Leishmania infantum adenosine kinase-like protein (LinJ34.3120) partial n	34.2	34.2	44%	0.14	100%
AM502252.1	Leishmania infantum chromosome 34	34.2	1045	100%	0.14	100%
CP000080.1	Leishmania major strain Friedlin chromosome 29, complete sequence	32.2	670	100%	0.54	100%
XM_842694.1	Leishmania major strain Friedlin hypothetical protein, conserved (LmjF29	32.2	32.2	42%	0.54	100%
XM_001568129.1	Leishmania braziliensis MHOM/BR/75/M2904 hypothetical protein, conserv	30.2	30.2	39%	2.1	100%
AM494972.1	Leishmania braziliensis chromosome 35	30.2	885	100%	2.1	100%
AM494971.1	Leishmania braziliensis chromosome 34	30.2	652	100%	2.1	100%
AM494969.1	Leishmania braziliensis chromosome 32	30.2	498	92%	2.1	100%

Con el análisis bioinformático, se realizó la estandarización y optimización de la PCR utilizando los primers CBP-1 y CBP-2, se utilizaron los ADN de las cepas de referencia del género *Leishmania*. Para evaluar la especificidad se utilizó cepas del género *Mycobacterium* y *Trypamosoma cruzi*, Figuras 34, 35 y 36 y Tabla 13.

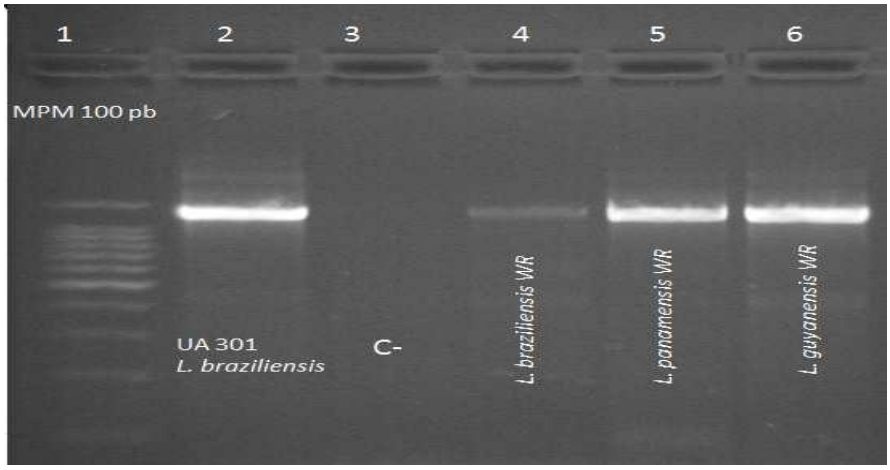


Figura 34. Estandarización de la PCR amplificando gen CPB de 1326 pb.

Pozo 1: MPM 100 pb, pozo 2: cepa de referencia de L. braziliensis, pozo 3: control negativo, pozos 4-6: cepas de referencia del Walter Read de *L. braziliensis, L. panamensis* y *L. guyanensis*.

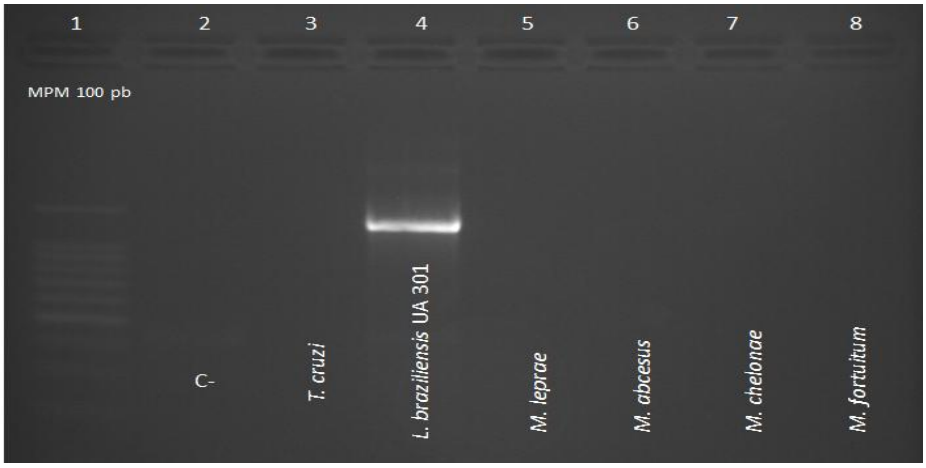


Figura 33. Especificidad de la PCR amplificando gen CPB de 1326 pb

Pozo 1: MPM 100 pb, pozo 2: control negativo, pozo 3: *T. cruzi*, pozos 4: *L. braziliensis* UA 301, pozos 5-8: cepas del género *Mycobacterium*: *M. leprae, M. abcesus, M. chelonae* y *M. fortuitum*.

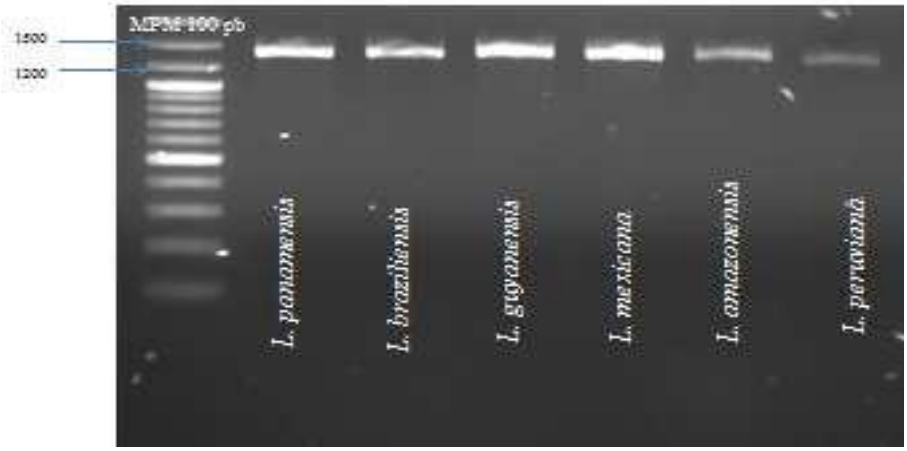


Figura 36. Estandarización de la PCR-RFLP con primers CBP 1 y 2 con cepas de referencia de *Leishmania.*

Para la digestión del producto de PCR de 1326 pb del gen CPB, se realizó el respectivo análisis bioinformático, donde se confirmó los cortes propuestos por el PECET (Programa de Estudio y Control de Enfermedades Tropicales), utilizando la herramienta del NEBcutter V 2.0 de New England Bioland, en la entrada de http://tools.neb.com/NEBcutter2/. Figura 37.

Para la enzima de restricción KpnI, arrojó los siguientes cortes:

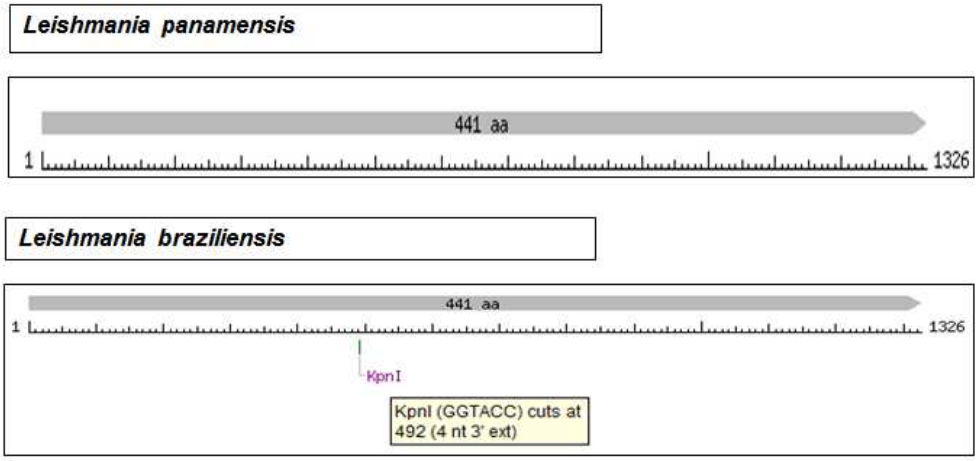


Figura 37. Cortes realizados por la enzima Kpn1 analizado en el programa New England Biolabs Neb Cutter.

Se observa que solo *L. braziliensis* presenta un corte dando dos fragmentos uno de 492 y 834 pb, digiriendo con la enzima Kpn1, Tabla 14.

Tabla 14. Cortes realizados por la enzima de restricción Kpn1.

Especie	Enzima	Numero de Cortes	Posición en el Gen	Fragmentos
L. panamensis	KpnI	0		
L. braziliensis	KpnI	1	492 (1326 pb)	492-834

Para demostrar estos cortes se realizó los siguientes ensayos con cepas de referencia utilizando los primers CBP 1 y 2 amplificando una secuencia de 1326 pb y la posterior digestión con la enzima de restricción KpnI, Figura 38.

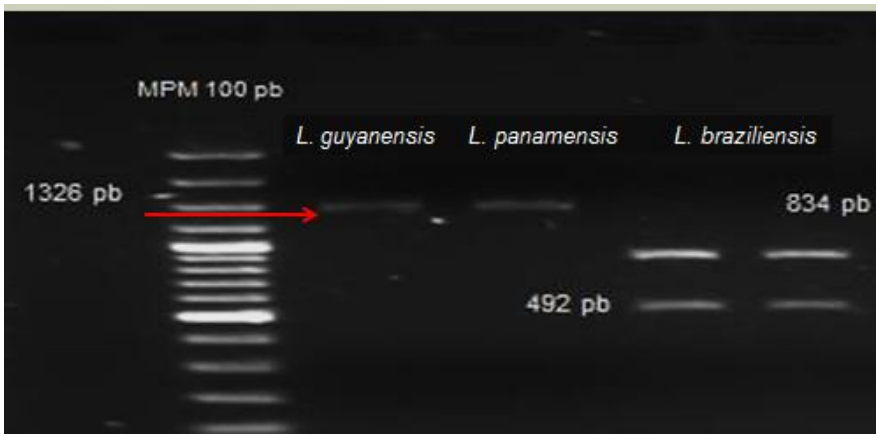


Figura 38. Gel de electroforesis después de la digestión con la enzima Kpn.

4.6.1. Identificación de especie a partir de cultivo

Con las condiciones de la PCR utilizando los primers CBP-1 y CBP-2 según las condiciones descritas en materiales y métodos amplificando una banda de 1326 pb, Figura 39, y las condiciones de digestión con enzimas de restricción, Figura 40, se identificaron los 25 aislamientos positivos por cultivo que se lograron obtener del proyecto.

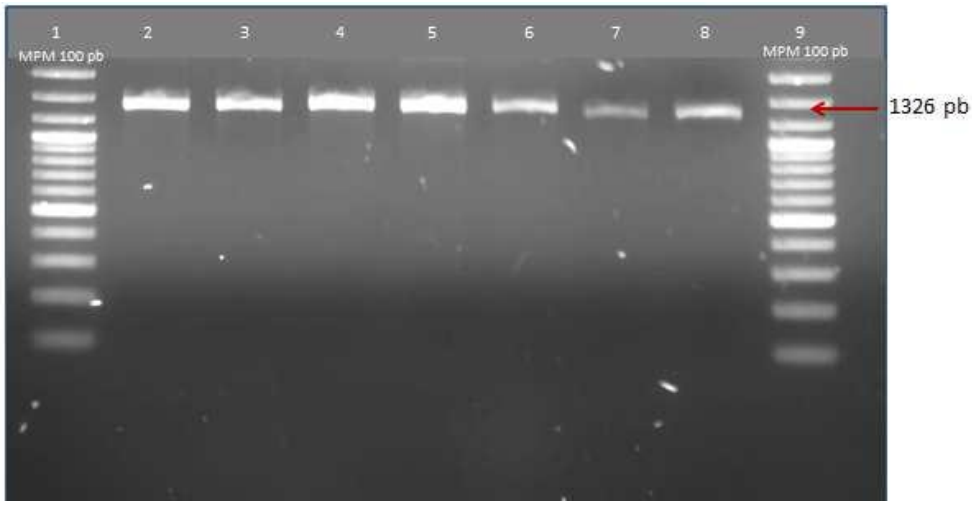


Figura 39. Resultado de la identificación de especie mediante PCR-RFLP gen CPB.

Los resultados obtenidos al realizar la PCR-RFLP se logró la identificación del 100% de los aislamientos obtenidos, que pertenecen al subgénero *Viannia*, donde 17 (68.0%) presentaron perfiles para *Leishmania braziliensis* y 8 (32.0%) perfiles para *Leishmania panamensis*. La descripción de las especies se encuentra descrita en la Tabla 15.

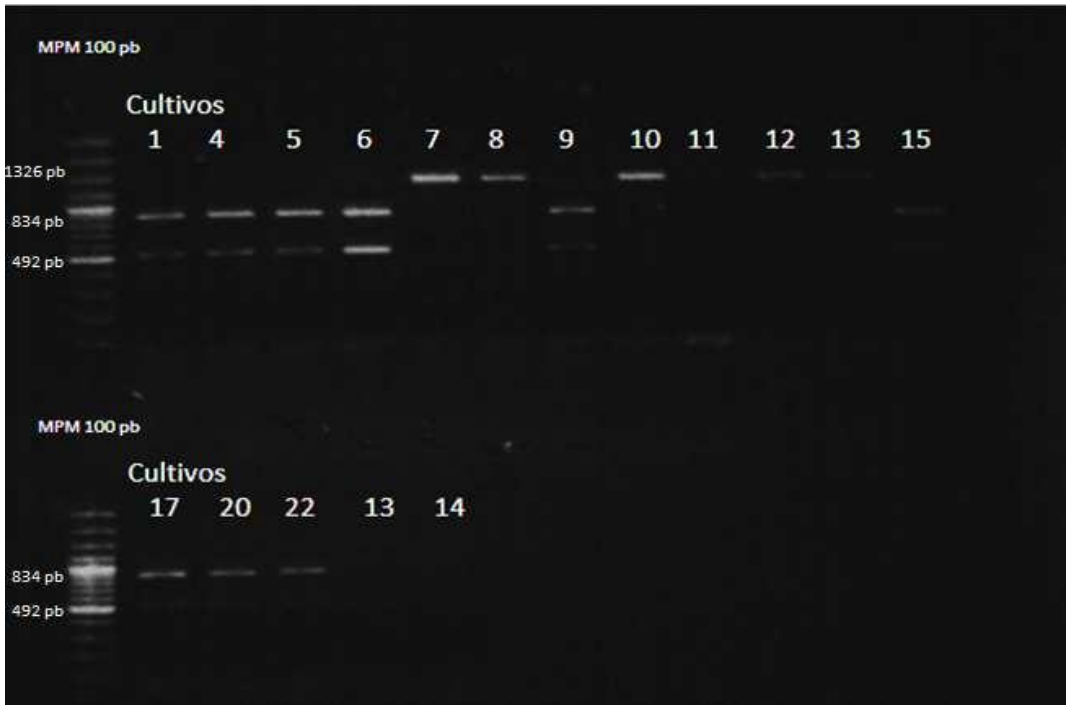


Figura 34. RFLP de las 25 muestras incluidas en el estudio, utilizando la enzima KpnI.

Tabla 15. Tipificación molecular por PCR-RFLP de los a partir de los cultivos positivos obtenidos en el estudio.

Unidad	Código muestra	Especie identificada
Tolemaida	T12	*L. braziliensis*
Tolemaida	T18	*L. braziliensis*
Tolemaida	T21	*L. braziliensis*
Tolemaida	T27	*L. braziliensis*
Tolemaida	T29	*L. braziliensis*
Tolemaida	T30	*L. braziliensis*
Tolemaida	T36	*L. panamensis/L.guyanensis*
Bonza	B83	*L. braziliensis*
Bonza	B104	*L. panamensis/L.guyanensis*
Granada	G115	*L. panamensis/L.guyanensis*
Carepa	C118	*L. panamensis/L.guyanensis*
Carepa	C128	*L. panamensis/L.guyanensis*
Carepa	C131	*L. panamensis/L.guyanensis*
Tolemaida	T221	*L. braziliensis*
San José del Guaviare	SG231	*L. panamensis/L.guyanensis*
San José del Guaviare	SG233	*L. braziliensis*
San José del Guaviare	SG243	*L. panamensis/L.guyanensis*
San José del Guaviare	SG244	*L. braziliensis*
San José del Guaviare	SG254	*L. braziliensis*
Tolemaida	T382	*L. braziliensis*
Tolemaida	T398	*L. braziliensis*
Tolemaida	T399	*L. braziliensis*
Tolemaida	T402	*L. braziliensis*
Tolemaida	T408	*L. braziliensis*
Tolemaida	T415	*L. braziliensis*

Una vez se logró la identificación de especie a partir de cultivo se quiso evidenciar esta eficiencia de la metodología a partir de la muestra clínica directa.

4.6.2. Identificación de especie a partir de muestra directa

Se tomaron 104 muestras del estudio para identificación directa a partir de la muestra utilizando los primers CBP-1 y CBP-2 para la amplificación por PCR del gen de la cisteín proteasa tipo B de 1326 pb, Figuras 41, 42 y 43.

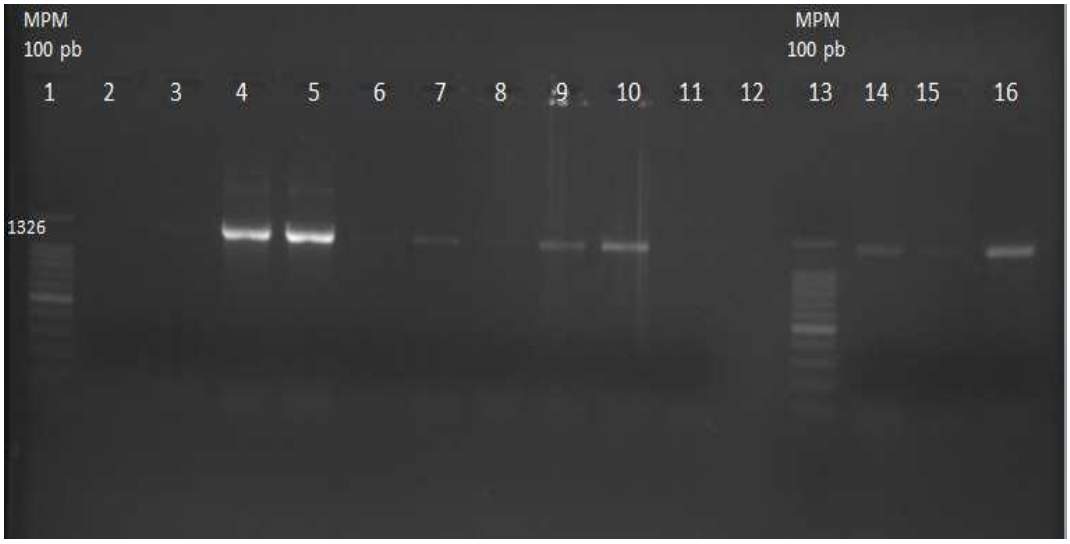


Figura 35. Gel 1. Amplificación del producto de PCR de 1326 pb, a partir de muestras directas. Pozo 1 y 13. MPM 100 pb, pozo 2: control negativo, pozos del 2-16: Muestras de clínicas de paciente.

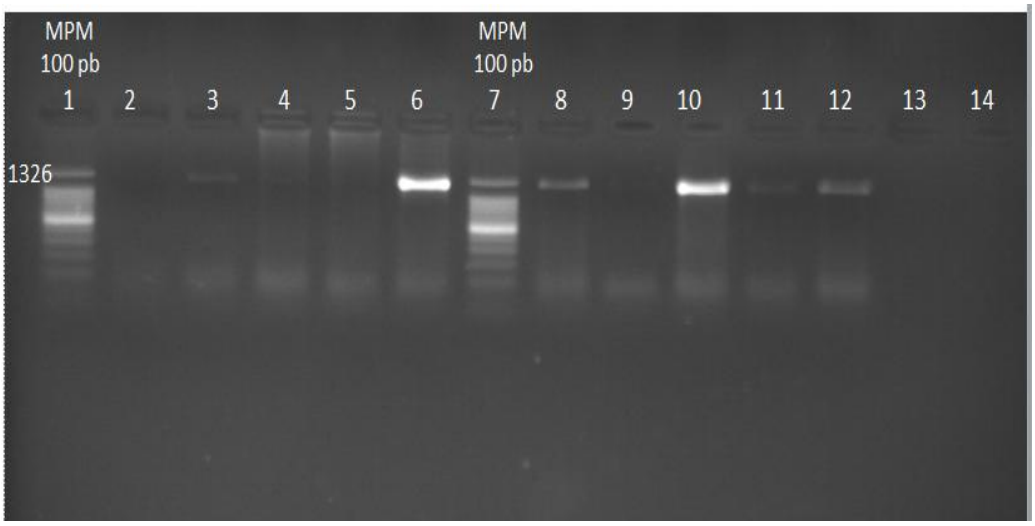


Figura 42. Gel 2. Amplificación del producto de PCR de 1326 pb, a partir de muestras directas. Pozo 1 y 7: MPM 100 pb, pozo 2: control negativo, pozos 2-14: muestras de paciente

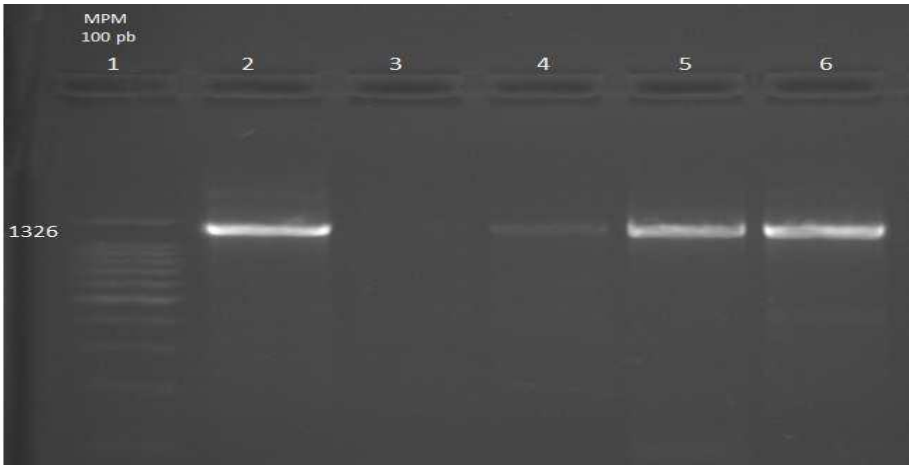


Figura 43. Gel 3. Amplificación del producto de PCR de 1326 pb, a partir de muestras directas. Pozo 1: MPM 100 pb, 2-6: muestras de paciente

Como se describió anteriormente en la identificación a partir de cultivo se realizó la digestión con la enzima de restricción Kpn1 a partir del fragmento de 1326 pb, Figura 44.

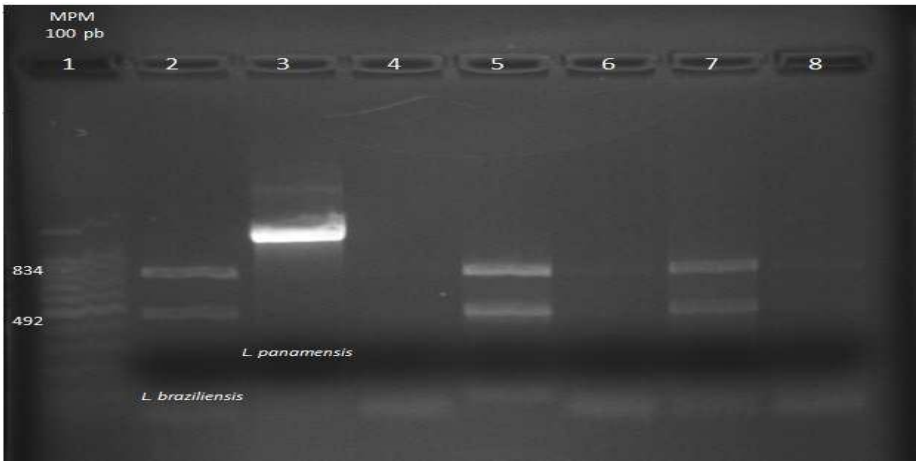


Figura 44. Gel 3. Digestión con enzima de restricción Kpn1, muestras directas.
Pozo 1: MPM 100 pb, Pozo 2: Control *L. braziliensis*, Pozo 3: *L. panamensis*, pozo4-8: muestras de pacientes

De acuerdo a las anteriores condiciones, se logró la identificación de 90 muestras de los cuales la especie más predominante en este estudio fue *L. panamensis/L.guyanensis* con el 45% (47 muestras) y *L. braziliensis* 42% (43 muestras) y 13% (14 muestras) no se logró la identificación, este debido a la cantidad o calidad de la muestra de ADN utilizado porque no amplifico ningún fragmento, Figura 46.

Al realizar este ensayo se logró identificar la especie con dificultad con algunos inconvenientes con la presencia de bandas inespecíficas que mediante el análisis bioinformático no se pudieron evidenciar, Figura 45.

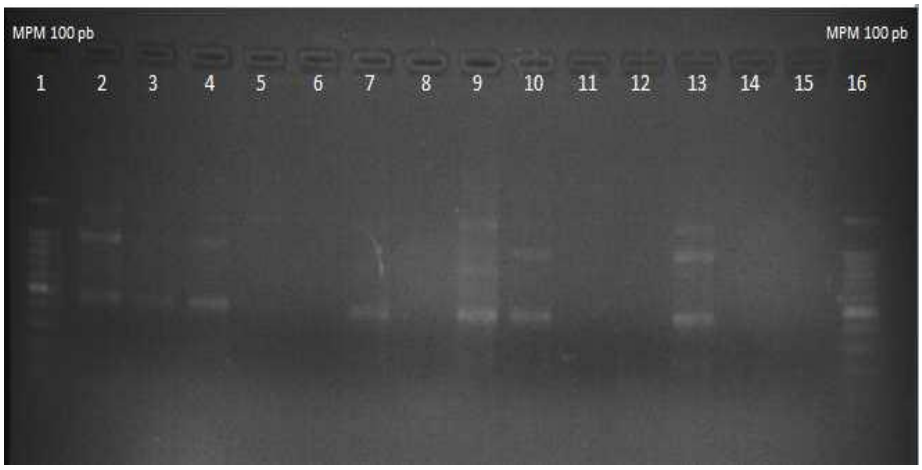


Figura 45. Digestión con enzima de restricción Kpn1, muestras directas.
Pozo 1 y 16: MPM 100 pb, Pozo 2: control *L. braziliensis*, Pozos 3-15: muestras de clínicas de pacientes.

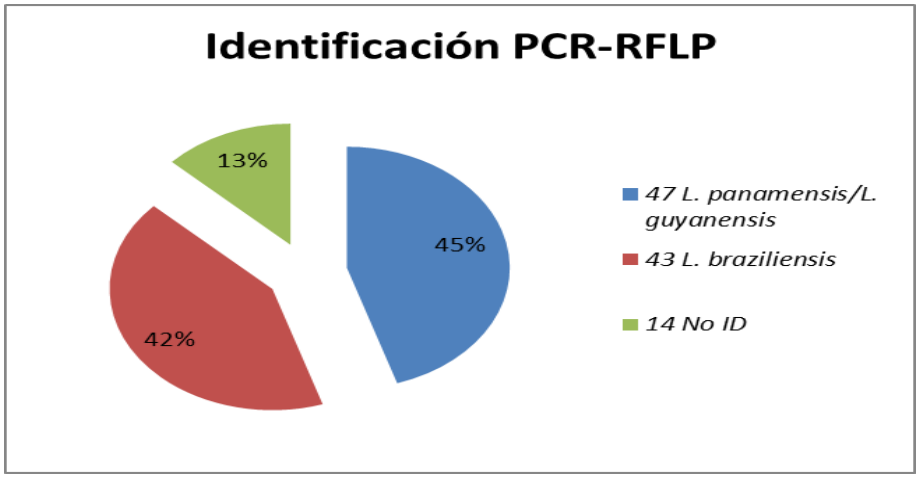


Figura 36. Porcentaje de caracterización de especie a partir de muestras directas y cultivos por PCR-RFLP.

La mayoría de las especies caracterizadas en este trabajo hacen parte de las zonas de mayor influencia por la población militar ya que hacen parte de las regiones del país donde se encuentra los mayores problemas de orden público como son los departamentos del Meta, Caquetá, Antioquia, Guaviare, Putumayo, Santander y Cundinamarca principalmente.

Figura 47. Distribución de *L. panamensis/L. guyanensis* en las Unidades Militares del Ejército Nacional.

Los pacientes pertenecientes las divisiones militares donde se identificó el complejo *Leishmania panamensis/L. guyanensis* fueron: en la I División (Bolivar) 1 caso, II División (Santander) 2 casos, IV División (FUCAD, FUDRA, Cundinamarca, Meta y Guaviare) 25 casos, VI División (Caquetá y Putumayo) 13 casos y VII División (Antioquia y Choco) 6 casos, Figura 47.

Figura 48. Distribución de *L. braziliensis* en las Unidades Militares del Ejército Nacional.

Los militares pertenecientes a las divisiones militares donde se identificó la especie de *Leishmania braziliensis* fue: la I División (Cesar) 1 caso, IV División (FUCAD, FUDRA, Cundinamarca, Meta y Guaviare) 33 casos, VI División (Caquetá y Putumayo) 6 casos y VII División (Antioquia) 3 casos, Figura 48.

5. DISCUSION

La Leishmaniasis cutánea es una enfermedad ampliamente distribuida a nivel mundial. En Colombia se ha registrado un incremento de casos desde el año 2005 dados por el cambio en el patrón epidemiológico, la aparición de nuevos focos, el proceso creciente de domiciliación y urbanización del ciclo de la transmisión, la colonización de áreas semiforestales, el movimiento de tropas insurgentes y militares, la explotación extensiva y desordenada de recursos naturales y las malas condiciones de vida de la población; donde el 98% de los casos notificados de leishmaniasis es de tipo cutáneo. En el personal del Ejército Nacional, como se ven en las estadísticas nacionales, la población más vulnerable a la enfermedad dadas sus condiciones misionales en el apoyo y seguridad nacional y por su presencia en zonas de mayor problema de orden público, que a su vez corresponden a las zonas de mayor riesgo de infección. Durante los últimos 6 años la población militar ha aportado más del 50% de los casos de leishmaniasis a nivel nacional (datos no publicados, reportados por la oficina de estadística de la Dirección de Sanidad Ejército).

El desarrollo de este proyecto de investigación ha sido el primer paso para el estudio de la leishmaniasis a nivel de Fuerzas Militares desde el Laboratorio de Referencia en Enfermedades Tropicales del Ejército Nacional, donde se estandarizaron las diferentes metodologías de cultivo y PCR para diagnóstico de la enfermedad como apoyo a diferentes proyectos a futuro que requieran de estas metodologías, como ayuda diagnóstica en casos con dificultad y en pro de la implementación de metodologías de punta a nivel de un laboratorio de referencia.

El Sistema General de Salud del Ejército está integrado en su mayoría por personal uniformado que se encuentra desarrollado operaciones militares en áreas de predominio endémico, más susceptibles a la adquisición de la enfermedad y la rotación constante por diferentes zonas geográficas de las guarniciones que poseen la responsabilidad de la seguridad nacional, hace que esta población estén en riesgo de adquirir la enfermedad.

Con los datos epidemiológicos recogidos en el proyecto se observó que los pacientes tenían un largo periodo de evolución de la enfermedad lo cual lleva a disminuir la posibilidad diagnóstica mediante frotis y en muchos de los casos la presencia de sobreinfección bacteriana que dificulta el diagnóstico y por ende el tratamiento supervisado. Por tanto, las metodologías convencionales en muchos de estos casos no ayudan al correcto y

oportuno diagnóstico del mismo, llevando a que el paciente padezca por más tiempo la enfermedad dado que sin evidencia diagnóstica al paciente no se le suministra el tratamiento.

Un dato recogido muy importante fue que el 45% de los pacientes presentaban recurrencias de la enfermedad ya fuese por reinfección al entrar nuevamente al área o bien por resistencia al tratamiento, preguntas que se deben resolver con el desarrollo de nuevos proyectos en el Laboratorio de Referencia del Ejército Nacional de Colombia.

La localización de las lesiones cutáneas encontradas en el 60% de los pacientes se ubican en zonas del cuerpo que en general deberían estar cubiertas por el camuflado, lo que evidencia el descuido y el mal uso del camuflado impregnado con permetrina, toldillos y repelentes, demostrando la falta de conocimiento de la enfermedad, en el autocuidado y en el uso de elementos de protección personal. También se evidencio la presentación de lesiones extremadamente grandes y sobreinfectadas muchas veces debido a las dificultades en la evacuación del personal de las zonas de combate de manera oportuna permitiendo además que la enfermedad avance y que las lesiones se expongan a contaminantes ambientales.

En cuanto a las metodologías utilizadas en este trabajo, el cultivo produjo un resultado muy bajo de positividad (7.2%) en comparación con las otras utilizadas, se empleó el método de minicultivo descrito por Andrea K. Boggild, *et al. e*n 2008 (45), donde reportaron una sensibilidad de 76.3%, cabe anotar que en este trabajo se utilizó el medio Schneider's suplementado con suero fetal bovino al 15% en viales con 500 µL, la positividad de esta metodología puede variar mucho y ser afectada por varios factores propios de la toma de muestra, del paciente, y del profesional en realizar la toma de la muestra por aspiración con la jeringa; la no ubicación de la zona de mayor posibilidad de captar el parasito y un punto muy importante y concluyente es que muchos de los pacientes tenían cremas antibióticas en sus lesiones que podría definitivamente influir en el crecimiento del parasito, además de la dificultad en la obtención del parasito ante la avanzada evolución de las misma. Definitivamente la baja sensibilidad de este método hace necesario la implementación de medios de cultivo a base de sangre como lo son el NNN o Seneka, para mejorar el aislamiento del parasito, así como el aumento en el número

de cultivos por paciente lo cual puede aumentar la posibilidad de aislamiento. Adicionalmente, la obtención de un cultivo positivo es enriquecedora para el laboratorio de referencia en lo concerniente a la identificación de especie necesaria para la metodología de isoenzimas y PCR; además de la obtención de los aislados para la alimentación del cepario para la utilización de cepas en posteriores estudios.

Para la extracción de ADN se evaluó la efectividad de dos métodos comúnmente utilizados, como lo es la extracción convencional por fenol-cloroformo y extracción con un kit comercial. Estos dos métodos fueron efectivos a la hora de extraer ADN del parasito a partir de cultivo y de muestras clínicas. Se determinó como de mayor utilidad la utilización del kit ante la menor toxicidad, es amigable con el medio ambiente y se obtuvo buenos resultados en la recuperación de ADN a partir de las muestras y cultivos en poco tiempo, en comparación con el método convencional que es demasiado tóxico, más dispendioso y requiere de mayor tiempo para la obtención de ADN.

El diagnóstico de la leishmaniasis es un tema ampliamente estudiado debido a la falta de una metodología lo suficientemente sensible para ser establecida como estándar. Se ha hablado de la comprobación parasitológica mediante cualquier método como estándar de referencia o de oro, bien sea por metodologías parasitológicas o bien moleculares. Debido a la baja sensibilidad de las metodologías convencionales se ha evidenciado la necesidad de desarrollar una técnica que mejore esta dificultad, y que en los últimos años se han implementado en el diagnóstico e identificación de microorganismos causantes de múltiples enfermedades, como lo es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). En este trabajo se desarrolló una PCR que amplifica una región conservada de los minicírculos del cinetoplasto ($_k$ADN) con primers OL descritos por Cabrera *et al*, 2002, utilizados en el INS por el Grupo de Entomología para el estudio de insectos infectados con el parasito causante de leishmaniasis. Primero se realizó un análisis bioinformático para observar su utilidad, además se estudió la especificidad de los primers usados, mediante el uso de cepas de referencia de *Leishmania* y otros microorganismos como especies del género Mycobacterium, causantes de lesiones en piel parecidas a la leishmaniasis y cepas de *Trypanosoma cruzi*, perteneciente a la misma familia *Trypanosomatidae* que el género *Leishmania*.

Se evidenció la especificidad de esta PCR-kADN para amplificar este blanco molecular para demostrar la presencia del parásito de cualquiera de las especies de *Leishmania*, sin interferencias con otros microorganismos, se tomó esta PCR como tamizaje para determinar la infección de los pacientes para un diagnóstico inicial de enfermedad. Esta PCR fue muy útil por la alta positividad con un 98% (338/346) en las muestras analizadas, ya que es uno de los blancos moleculares más eficientes por tener un gran número de copias en el genoma, los minicírculos del kADN cuentan con aproximadamente 10.000 copias, que constituye a el 10 al 20% del ADN total, demostrando ser el método más sensible y eficiente para el uso rutinario de diagnóstico (75). Además fue el primer estudio utilizando la PCR-kADN como herramienta rutinaria para el diagnóstico de la leishmaniasis en la práctica clínica en Colombia en población militar (77).

La identificación de especies de *Leishmania* tiene la utilidad de determinar un pronóstico clínico, seleccionar un régimen terapéutico más adecuado y eficaz para ser administrado a cada individuo, para el conocimiento de la epidemiologia de la enfermedad y la distribución de las especies en el país.

De las técnicas de identificación conocidas se considerada como prueba de oro para la identificación de especies el análisis isoenzimático (MLEE), poco útil clínicamente por su complejidad y por múltiples desventajas que limitan su uso, es lento, laborioso y costoso, requiere de cultivo y aislamiento de los parásitos, dispendioso por la contaminación bacteriana que dificulta aún más la metodología. Sin embargo, el desarrollo de la biología molecular, ha permitido la puesta en marcha de numerosas técnicas de identificación molecular y de tipificación de especies de *Leishmania*, en un intento por superar estas limitaciones, métodos basados por PCR-RFLP de diferentes secuencias del genoma como es el gen *gp*63, HSP70, ITR, mini-exón, kADN, citocromo *b*, entre otros. Sin embargo, en muchos de estos casos, múltiples enzimas de restricción son necesarios para garantizar la identificación de las especies, (79).

El Grupo del PECET (Programa de Estudio y Control de Enfermedades Tropicales), ha desarrollado e implementado la metodología de PCR-RFLP del gen de la cistein proteasa tipo B, y la posterior digestión con la enzima de restricción Kpn I, para diferenciar las

especies de *Leishmania*, este gen se encuentra en el genoma en múltiples copias presentes tanto en estadios de amastigotes como promastigotes (68, 69), un blanco que ha traído considerable atención en su papel en la destrucción de proteínas del huésped y evasión de la respuesta inmune (80), en este trabajo se analizó este blanco molecular para determinar su utilidad en la identificación de especies del subgénero *Viannia* en especial las especies *L. panamensis/L. guyanensis* y *L. braziliensis*, mostrando perfiles de *L. braziliensis* y *L. panamensis/ L.guyanensis*, a partir del cultivo, con alguna dificultad a partir de muestras clínicas. Se empleó para la caracterización de las 25 cepas de pacientes obtenidas por cultivo y 90 muestra clínicas, con las cuales se identificaron las especies pertenecientes al subgénero *Viannia;* como son *L. panamensis/guyanensis y L. braziliensis*, especies encontradas ampliamente distribuidas en Colombia causando la enfermedad tanto en la población civil como en la población militar. Es importante buscar nuevas utilidades de este gen para la diferenciación de todas las especies de *Leishmania* tanto del Subgénero *Viannia* como del Subgénero *Leishmania* causantes de la enfermedad en Colombia.

La distribución de las dos especies identificadas en este trabajo fueron proporcionales en los sitios muestreados, ya que se encuentran repartidas aproximadamente en la misma cantidad en las muestras analizadas, la importancia de este proceso radica en el conocimiento de la epidemiologia molecular y distribución de especies en las Divisiones Militares situados en los departamentos del Meta, Guaviare, Cundinamarca, Caquetá, Antioquia, Bolívar, Santander y Cesar, lugares donde existen los mayores problemas de orden público que los obliga a su permanencia en estos sitios por su labor; lo que permite guiar un tratamiento más eficaz; especie-especifico, individualizado, evitar resistencias y direccionar nuevas líneas de tratamiento para pacientes con recurrencias de infección, recaídas y pacientes con fallas terapéuticas, de acuerdo a la especie identificada, además de realizar nuevos proyectos encaminados a la búsqueda de interacciones hospedero-parásito y componentes inmunológicos que pueden llevar a la cura o a la persistencia de la enfermedad.

Además de buscar mejoras en la identificación y tipificación de los parásitos causantes de la leishmaniasis, también con este proyecto se observó la necesidad de trabajar con el personal militar en la prevención de la infección, a través de la información, capacitación y educación sobre esta enfermedad, enfatizando en la implementación de

medidas de autocuidado encaminadas a proteger la salud, utilizando en las zonas de alto riesgo de infección medidas de protección personal como el uso de los camuflados completo impregnados con permetrina, con mangas abajo, uso de jabones con acción repelente e insecticida, proteger los cambuches con toldillos de orificios menores de 1 mm, impregnados con permetrina, despejar de maleza los alrededores de las bases militares que están en medio de la selva, eliminación de desechos biológicos (excretas) lejos de los sitios de cambuche, entre otros.

El genoma del parásito es muy amplio y es importante seguir buscando nuevas alternativas diagnósticas que nos brinden nuevos y buenos resultados tanto en la identificación como en la tipificación de todas las especies del Género *Leishmania* utilizando metodologías moleculares que ofrezcan resultados rápidos y confiables para guiar nuevas expectativas de tratamiento y manejo de la enfermedad.

6. CONCLUSIONES

1. Se determinó y evidenció la necesidad de trabajar en un diagnóstico rápido y eficaz de la enfermedad, en soldados y militares infectados con leishmaniasis, ya que si no se tiene un resultado positivo de la enfermedad por frotis o cultivo, no pueden recibir el tratamiento. En este trabajo se observó que muchos de ellos presentaban lesiones muy grandes de más de 6 meses de evolución con frotis seriados negativos, que no podían ser diagnosticados y por ende no recibir tratamiento. Por esta causa se trabajó en la implementación de la PCR para un diagnóstico rápido de la enfermedad.

2. La PCR-kADN, amplificando secuencias del ADN del cinetoplasto, demostró ser una metodología altamente sensible ante el gran número de copias presentes en este blanco molecular, que se convierte en una prueba de tamizaje inicial de la enfermedad. Esta PCR convencional mostró excelentes resultados en el diagnóstico de leishmaniasis cutánea y la demostración de la infección en casos donde el frotis directo no lo hizo, facilitando el establecimiento del tratamiento de manera temprana evitando la evolución de las lesiones. Fue el primer estudio utilizando la PCR-kADN como herramienta rutinaria para el diagnóstico de la leishmaniasis en la práctica clínica en Colombia en la población militar

3. El uso combinado de las metodologías de diagnóstico convencional y métodos moleculares incrementan la probabilidad de éxito del diagnóstico de la leishmaniasis cutánea bajo las condiciones presentadas por los pacientes del Ejército Nacional, donde la PCR mostró la mayor utilidad reduciendo la variabilidad del diagnóstico con respecto al frotis.

4. La identificación del parásito se hace primordial ante el reporte en las dificultades de eliminación del parasito con el tratamiento de antimoniales pentavalentes de casos de leishmaniasis cutánea. Es de vital importancia para el tratamiento y para evitar el gran número de fracasos. Actualmente existen métodos que parten del cultivo en la identificación, sin embargo, ante la menor sensibilidad de éste, es un punto que dificulta la identificación y el direccionamiento del tratamiento. Teniendo en cuenta esta afirmación se realizó la implementación de una metodología molecular que parte de la utilización de un blanco altamente sensible

como lo es el gen de la cistein proteasa tipo B que permite la identificación de especie a partir de la muestra del paciente sin esperar el tiempo de crecimiento del cultivo, esta metodología permitió evaluar la distribución de dos cepas infectantes para la población militar.

5. A través de la realización de este proyecto, se aportó al Laboratorio de Referencia del Ejército Nacional la metodología de la PCR para un screening de infección y una metodología de identificación de las especies de *L. panamensis/L. guyanensis* y *L. braziliensis*, útil a partir de cultivo como de muestra clínica directa como una herramienta para guiar un tratamiento más eficaz y disminuir la posibilidad de resistencia.

6. Nuestros resultados muestran una presencia igual entre *L. panamensis/L. guyanensis* y *L. braziliensis* en nuestros pacientes, pero por el bajo número de muestras analizadas, no es adecuado hablar de una especie prevalente en la población militar. Además es necesario seguir explorando más este blanco molecular para poder identificar las demás especies del subgénero *Viannia* y del subgénero *Leishmania*.

7. Es un gran logro para aportar la generación de conocimiento en la distribución de especies a nivel nacional, demostrando la presencia de especies que se habían descrito propias de una región, como es el caso de *L. panamensis* que ha sido denominada causando infección en la zonas del norte occidente del país. Pero se ha encontrado en los últimos años la evidencia de su presencia en la zona oriental específicamente en el Departamento del Meta con una alta prevalencia (13).

8. Se hace evidente la necesidad de realizar jornadas de información, educación y capacitación a la población militar en el tema de la enfermedad, con el fin de implementar en ellos una conducta de autocuidado, utilización de medidas de protección personal adecuadas para así disminuir el riesgo de infección.

7. RECOMENDACIONES

1. En la recolección de los datos es necesario que se utilice un vocabulario más cotidiano para la toma de las encuestas y al hacer conocer los proyectos y poder tener el consentimiento por parte de los participantes, además de incluir en la encuesta las medidas de la lesión, la cual puede inferir en la evolución de la enfermedad, así como la presencia o no de infecciones secundarias.

2. Estudiar metodologías alternativas que puedan mejorar la sensibilidad del cultivo donde se aconseja aumentar el calibre de la aguja para la toma de muestra a 21 y utilizar un medio a base de sangre como el Senekjie o NNN para su aislamiento. Del éxito del cultivo depende el éxito en la identificación molecular del parasito lo cual conlleva a guiar correctamente la prognosis del tratamiento. Además para mejorar la concordancia entre metodologías hacer la toma biopsias que puedan ayudarnos a aumentar las posibilidades de obtener el aislamiento del parasito por cultivo, evitar el uso de antibióticos en la toma de muestra del cultivo ante posibles reacciones adversas y utilizar esta muestra para PCR o bien para estudios histopatológicos.

3. Se hace necesario continuar con el trabajo de la identificación de especie para separar *L. panamensis y L. guyanensis* y especies del subgénero *Leishmania*.

4. Proveer en futuros proyectos material lúdico que pueda ayudar y aclarar las dudas de los pacientes acerca de la leishmaniasis, así como material informativo dirigido a la prevención y a las medidas a tener en cuenta para evitar la enfermedad o bien para detectarla a tiempo.

5. Plantear proyectos futuros encaminados a resolver los problemas de fracasos terapéuticos y recurrencias de la enfermedad, correlacionando los genotipos encontrados.

5. Recomendar el uso de la PCR como ayuda diagnóstica ante un resultado negativo por frotis directo, según las guías de control de la leishmaniasis, OMS, 2010.

8. REFERENCIAS

1. Instituto Nacional de Salud. Subdirección de Vigilancia y Control en Salud Pública Informe Epidemiológico: Comportamiento de Leishmaniasis en Colombia; 2009.

2. Beltrán Cifuentes M C, Ospina P D, Corredor Arias L F. La *Leishmania spp*. como estrategia de diagnóstico y tratamiento de la *Leishmaniasis*. Investig. andina 2007; vol.9 No.15: Pág.64-76.

3. Organización Mundial de la Salud WHO. La Leishmaniasis. [8 de octubre de 2010] disponible en: http://www.who.int/leishmaniasis/en/.

4. Fuerzas Militares de Colombia, Armada Nacional. Informe Administrativo DISAN: Plan de Prevención, Vigilancia Epidemiológica, Control de leishmaniasis y suministro de antimoniato de meglumina (glucantime) ® para el personal de la Armada Nacional, 2005.

5. Ministerio de Salud de Colombia. Leishmaniasis, Plan nacional de control. Manual de normas técnico-administrativas. Trazo Ltda, 1994; Santafé de Bogotá, Colombia.

6. Ashutosh, Sundar S, Goyal N. Molecular mechanisms of antimony resistant in Leishamania. J Med Microbiol. 2007; Vol.56: Pág. 143-153.

7. Ashford R, Desjeux P, de Raadt P. Estimation of population at risk of infection and number of cases of Leishmaniasis. Parasitol. Today, 1992; Vol.8, N° 3: Pág. 104-105.

8. Lawn, S. D., J. Whetham, P. L. Chiodini, J. Kanagalingam, J. Watson, R. H. Behrens, et al. New world mucosal and cutaneous leishmaniasis: an emerging health problem among British travellers. Q J Med. 2004; 97: Pág. 781–788.

9. Ross R. Note on the bodies recently described by Leishman and Donovan. Brit Med J. 1903; Vol. 2: Pág. 1261-1262.

10. Reithinger R, Dujardin J C. Molecular Diagnosis of Leishmaniasis: Current Status and Future Applications. J Clin Microbiol. 2007; Vol. 45, N° 1: Pág. 21-25.

11. Bañuls A L, Hide M and Prugnolle F. *Leishmania* and the Leishmaniases: A Parasite

Genetic Update and Advances in Taxonomy, Epidemiology and Pathogenicity in Humans. Advances in Parasitology. 2007; Vol. 64: Pág. 1-113.

12. Urbano Amadeus Jesús. Tesis de maestría: Identificación fenotípica y genotípica de 74 nuevos aislamientos de *Tripanosomatidos* de seis países de Latinoamérica y España, Granada, 2009.

13. Ovalle CE, Porras L, Rey M, Ríos M, Camargo YC. Distribución geográfica de especies de Leishmania aisladas de pacientes consultantes al Instituto Nacional de Dermatología Federico Lleras Acosta, E.S.E., 1995-2005. Biomédica 2006; 26 (Supl.1): Pág. 145-151.

14. Urbano Amadeus J. Tesis doctoral: Caracterización bioquímica y molecular de tripanosomátidos aislados de perros en España, Granada, 2008.

15. Morales Hernández M A. Tesis doctoral: Epidemiología molecular de la coinfección por *Leishmania*-VIH, Madrid, 2002.

16. Reithinger R, Dujardin JC, Louzir H, Pirmez, Alexander B, Brooker S. Cutaneous leishmaniasis. Lancet Infect Dis. 2007; Vol. 7: Pág. 581–596.

17. Peralta, V. Tesis Pregrado. Aplicación en cadena en reacción de la polimerasa en el diagnóstico y evaluación del tratamiento con glucantime en pacientes con leishmaniasis de la localidad de Rurrenabaque. La Paz-Bolivia, 2007.

18. Desjeux P. and Alvar J. *Leishmania/*HIV co-infections: epidemiology in Europe. Annals of TropicalMedicine & Parasitology, 2003: Vol. 97, No. 1: Pág.3-15.

19. Leifso K, Cohen-Freue G, Dogra N, Murray A and McMaster WR. Genomic and proteomic expression analysis of *Leishmania* promastigote and amastigote life stages: The *Leishmania* genome is constitutively expressed. Molecular & Biochemical Parasitology. 2007; Vol. 152: Pág. 35–46.

20. Herwaldt B. L. Leishmaniasis. Lancet. 1999; Vol. 354: Pág. 1191–1199.

21. Rábago J, Sigall A D, López L, Baquera J, Solloa ME, Arenas R, et al. Leishmaniasis cutánea. Reporte de un caso. Med Int Mex. 2006; Vol. 22: Pág. 343-346.

22. Alvar JP. Las leishmaniasis: de la biología al control. Instituto de Salud Carlos III Madrid, 2da edición. 2001: Pág. 1-200.

23. Organización Mundial de la Salud WHO. La Leishmaniasis. [8 de octubre de 2010] disponible en: http://www.who.int/leishmaniasis/cutaneous_leishmaniasis/en/index.htmlhtt.

24. Lawn, S. D., J. Whetham, P. L. Chiodini, J. Kanagalingam, J. Watson, R. H. Behrens, and D. N. Lockwood. New world mucosal and cutaneous leishmaniasis: an emerging health problem among British travellers. Q J Med. 2004; Vol. 97: Pág. 781–788.

25. Ashutosh, Sundar S, Goyal N. Molecular mechanisms of antimony resistant in *Leishmania*. J Med Microbiol. 2007; Vol. 56: Pág. 143-153.

26. Ashford R, Desjeux P, de Raadt P. Estimation of population at risk of infection and number of cases of Leishmaniasis. Parasitol. Today, 1992; Vol. 8: Pág. 104-105.

27. Ivens A C, Peacock C, Worthey E, Murphy L, Aggarwal G, Berriman M. The Genome of the Kinetoplastid Parasite, *Leishmania major*. Scienc. 2005; Vol. 309: Pág. 436-442.

28. Faber WR, Oskam L, van Gool T, Kroon NC, Knegt-Junk KJ, Hofwegen H, van der Wal AC, Kager PA.. Value of diagnostic techniques for cutaneous leishmaniasis .J Am Acad Dermatol. 2003; Vol. 49: Pág. 70-74.

29. Ministerio de la Protección Social. Guía de atención a la Leishmaniasis, 2009.

30. Peacock CS, Seeger K, Harris D, Murphy L, Ruiz JC, et al. Comparative genomic analysis of three *Leishmania* species that cause diverse human disease. Nature Genetics. 2007; Vol. 39, N°7: Pág. 839-847.

31. Ramirez JR, Agudelo S, Muskus C, Alzate JF, Berberich C, Barker D, Velez ID. Diagnosis of cutaneous leishmaniasis in Colombia: the sampling site within lesions

influences the sensitivity of parasitologic diagnosis. J Clin Microbiol. 2000; Vol. 38: Pág. 3768-3773.

32. Brewster S and Barker D C. Basic molecular tools Analysis of minicircle classes in *Leishmania* (*Viannia*) species. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. 2002; Vol. 96, Supl.1: Pág.55-63.

33. Velez ID, Hendrickx E, Robledo S, Agudelo S. Leishmaniosis cutánea en Colombia y género, Cad. Saúde Pública, Rio de Janeiro, 2001; Vol. 17(1): Pág. 171-180.

34. van der Meide, W. F., G. J. Schoone, W. R. Faber, J. E. Zeegelaar, H. J. de Vries, Y. Ozbel, A. Lai, R. F. Fat, L. I. Coelho, M. Kassi, and H. D. Schallig. Quantitative nucleic acid sequence-based assay as a new molecular tool for detection and quantification of *Leishmania* parasites in skin biopsy samples. J Clin Microbiol. 2005; 43: Pág. 5560–5566.

35. Ministerio de la Protección Social, Dirección General de Promoción y Prevención, Guía de Atención de la Leishmaniasis. Santafé de Bogotá, Colombia, 2005.36.

36. Mahboudi F, Abolhassani M, Tehrani S, Azimi1 M and Asmar M. Differentiation of Old and New World *Leishmania* Species at Complex and Species Levels by PCR. Scand J Infect Dis. 2002; Vol. 34: Pág. 756–758.

37. Weigle KA, Labrada LA, Lozano C, Santrich C, Barker DC. PCR-based diagnosis of acute and chronic cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania* (Viannia).J Clin Microbiol. 2002; 40: Pág. 601-606.

38. Cuba C A. Diagnóstico Parasitológico de la Leishmaniasis Tegumentaria Americana. Rev Med Exp. 2000; Vol.17: Pág.1-4.

39. Lizardo Castro GA, Ponce C, Ponce E, Sierra M. Characterization of patients with atypical cutaneous leishmaniasis. Rev Med Honduras. 2008; Vol. 76: Pág.101-107.

40. Profeta ZM, Rotondo da Silva A, Oliveira Silva O, Caligiorne R, Oliveira E, Rabello A. Lesion aspirate culture for the diagnosis and isolation of *Leishmania* spp. from patients

with cutaneous leishmaniasis. Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. 2009; Vol. 104 (1): Pág. 62-66.

41. Cannova D. Técnicas de caracterización de *Leishmania* spp y su aporte en la leishmaniasis, Revista de la Facultad de Ciencias de la Salud. Universidad de Carabobo. 2007: Vol. 11: Pág. 67-72.

42. Böer A, Blödorn-Schlicht N, Wiebels N, Steinkraus V and Falk T.M. Unusual histopathological features of cutaneous leishmaniasis identified by polymerase chain reaction specific for Leishmania on paraffin-embedded skin biopsies. British Journal of Dermatology. 2006; Vol. 155: Pág.815–819.

43. Shahbazi F, Shahabi S, Kazemi B, Mohebali M, Reza A and Zare Z. Evaluation of PCR assay in diagnosis and identification of cutaneous leishmaniasis: a comparison with the parasitological methods. Parasitol Res. 2008; Vol. 103: Pág. 1159–1162.

44. Mehmet S. Serina T, Daglioglub K, Bagirovac M, Allahverdiyevc A, Uzund S, et al. Rapid diagnosis and genotyping of *Leishmania* isolates from cutaneous and visceral leishmaniasis by microcapillary cultivation and polymerase chain reaction–restriction fragment length polymorphism of miniexon region. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease. 2005; Vol. 53: Pág. 209– 214.

45. Boggild AK, Miranda-Verastegui C, Espinosa D, Arevalo J, Martinez-Medina D, Llanos-Cuentas A and Low D E. Optimization of Microculture and Evaluation of Miniculture for the Isolation of *Leishmania* Parasites from Cutaneous Lesions in Peru.Am. J. Trop. Med. Hyg. 2008; Vol. 79(6): Pág. 847–852.

46. Allahverdiyev A, Uzun S, Bagirova M, Durdu M, Memisoglu H. A sensitive new microculture method for diagnosis of cutaneous leishmaniasis. Am J Trop Med Hyg. 2004; Vol.70: Pág. 294–297.

47. Allahverdiyev AM, Bagirova M, Uzun S, Alabaz D, Aksaray N, Kocabas E and Koksal F. The value of a new microculture method for diagnosis of visceral leishmaniasis by using bone marrow and peripheral blood. Am. J. Trop. Med. Hyg. 2005; Vol. 73(2): Pág. 276–280.

48. Martin SK, Harun T, Adoyo A and Wasunna KM.A diagnostic ELISA for visceral leishmaniasis, based on antigen from media conditioned by *Leishmania donovani* promastigotes. Annals of Tropical Medicine & Parasitology. 1998; Vol. 92, No. 5: Pág. 571-577.

49. Cabrera O, Munstermann L, Cárdenas R, Gutiérrez R, Ferro C. Definición de las condiciones de temperatura y almacenamiento adecuadas en la detección de ADN de *Leishmania* por PCR en flebotominos. Biomédica. 2002; Vol. 22: Pág. 296-302.

50. Paiva B.R., Secundino N.F.C, Nascimento J.C., Pimenta P.F.P., Galati E.A.B., Andrade H.F., Malafronte R.S. Detection and identification of *Leishmania* species in field-captured phlebotomine sandflies based on mini-exon gene PCR. Acta Tropica. 2006; Vol. 99: Pág. 252–259.

51. Moreno T, Aranha L, McMahon-Pratt D, Jon J, Floeter-Winter L. A real–time Polymerase Chain Reaction Assay for the Identification and Quiantification of american *Leishmania* Species on the Basis of Glucosa-6-Phosphate Dehydrogenase. Am J Trop Med Hyg, 2008; Vol. 78: Pág. 122-132.

52. Wortmann G, Hocherg L, Hong H, Sweeney C, Zapor M, Aronson N, Weina P, et al. Rapid identification of Leishmania complexes by a real-time PCR assay. The American journal of tropical medicine and hygiene. 2005; Vol. 73, N°6: Pág. 999-1004.

53. Santamaría E, Ponce N, Puerta C., Ferro C. Validación de la PCR en la detección de parásitos de *Leishmania* (*Viannia*) sppen *Lutzomyia* (Díptera: Psychodidae) como herramienta en la definición de especies de vectores. Biomédica. 2005; Vol. 25: Pág. 271-279.

54. Roelfsema J H, Nozari N, Herremans T, Kortbeek LM, Pinelli E. Evaluation and improvement of two PCR targets in molecular typing of clinical samples of *Leishmania* patients. Experimental Parasitology. 2010.

55. Marfurt J, Nasereddin A, Niederwieser I, Jaffe CL, Beck HP, and Felger I. Identification and Differentiation of *Leishmania* Species in Clinical Samples by PCR

Amplification of the Miniexon Sequence and Subsequent Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis. Journal of Clinical Microbiology. 2003; Vol. 41, No. 7, Pág. 3147–3153.

56. Indiani de Oliveira C, Báfica A, Oliveira F, Favali C, Correa T, Freitas L, et al. Clinical Utility of Polymerase Chain Reaction–Based Detection of *Leishmania* in the Diagnosis of American Cutaneous Leishmaniasis. Clinical Infectious Diseases. 2003; Vol. 37: Pág. 149–153.

57. Mugasa C, Laurent T, Schoone G, Basiye FL, Saad A, Safi S, et al. Simplified molecular detection of Leishmania parasites in various clinical samples from patients with leishmaniasis. Parasites & Vectors. 2010; Vol. 3:13: Pág.1-6.

58. Bruijn M and Barker D C. Diagnosis of New World leishmaniasis: specific detection of species of the *Leishmania braziliensis* complex by amplification of kinetoplast DNA. Acta Tropica. 1992; Vol. 52: Pág. 45- 58.

59. Monbrison F, Mihoubi I, Picot S. Real – Time PCR assay for the identification of cutaneus *Leishmania* parasite species in Constantine region of Argelia. Acta tropica. 2007.

60. Moreira M.A.B., Luvizotto M.C.R., García J.F., Corbett C.E.P., Laurenti M.D. Comparison of parasitological, immunological and molecular methods for the diagnosis of leishmaniasis in dogs with different clinical signs. Veterinary Parasitology. 2007; Vol.145: Pág. 245-252.

61. Bensoussan E, Nasereddin A, Jonas F, Schnur L, and Jaffe CL. Comparison of PCR Assays for Diagnosis of Cutaneous Leishmaniasis. Journal of Clinical Microbiology. 2006; Vol. 44, No. 4: Pág. 1435–1439.

62. Marco J, Uezato H, Mimori T, Barroso P, Korenaga M, Nonaka S, Basombrío M, Taranto N, and Hashiguchi Y. Are cytochrome *b* gene sequencing and polymorphism-specific polymerase chain reaction as reliable as multilocus enzyme electrophoresis for identifying *leishmania spp*. from argentina. Am. j. trop. med. Hyg. 2006; Vol. 75(2): Pág. 256–260.

63. Rotureau B, Ravel C, Couppié P, Pratlong F, Nacher M, Dedet JP, and Carme B. Use of PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis To Identify the Main New World*Leishmania* Speciesand Analyze Their Taxonomic Properties and Polymorphism by Application of the Assay to Clinical Samples. Journal of Clinical Microbiology. 2006; Vol. 44, No. 2: Pág. 459–467.

64. Marfurt J, Niederwieser I, Makia ND, Beck HP, Felger I. Diagnostic genotyping of Old and New World *Leishmania* species by PCR-RFLP. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease. 2003; Vol. 46: Pág. 115–124.

65. Sierra D, Ochoa M, Calle JI, García G, Colorado D, et al, *Leishamania mexicana* en el Corregimiento de San Matias, Municipio de Gómez Plata, Antioquia, Colombia. Biomédica, 2006; Vol. 26: Pág. 232-235.

66. Miles, Michael A. Biochemical identification of *Leishmania*, Bol. Oficina Sanit. Panam. 1986; Vol. 101 (3): Pág.217-233.

67. Montalvo AM, Fraga J, Montano I, Monzote L, Marin M, Der Auwera GV, Dujardin JC, Velez ID, Muskus C. Differentiation of Leishmania Viannia panamensis and Leishmania (V) guyanensis using BccI for hsp70 PCR-RFLP. Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. 2010; 104: Pág.364-367.

68. Mundodi V, Kucknoor AS and Gedamu L. Role of Leishmania (Leishmania) chagasi amastigote cysteine protease in intracellular parasite survival: studies by gene disruption and antisense mRNA inhibition. BMC Molecular Biology. 2005; Vol. 6:3.

69. Mottram JC, Frame MJ, Brooks DR, Tetley L, Hutchison E, Souza AE, and Coombs GH. The Multiple cpb Cysteine Proteinase Genes of *Leishmania mexicana* Encode Isoenzymes That Differ in Their Stage Regulation and Substrate Preferences. The Journal Of Biological Chemestry. 1997; Vol. 272, No. 22, 30: Pág. 14285–14293.

70. Mottram JC, Souza EA, Hutchison E, Carter R, Frame MJ and Coombs GH. Evidence from disruption of the Imcpb gene array of Leishmania mexicana that cysteine proteinases are virulence factors. Proc. Natl. Acad. Sci. 1996; Vol. 93: Pág. 6008-6013.

71. Sukmee T, Siripattanapipong S, Mungthin M, Worapong J, Rangsin R, Samung Y. A suspected new species of Leishmania, the causative agent of visceral leishmaniasis in a Thai patient. International Journal for Parasitology. 2008; Vol. 38: Pág.617–622.

72. Minodiera P, Parolab P. Cutaneous leishmaniasis treatment. Travel Medicine and Infectious Disease. 2007; Vol. 5: Pág. 150–158.

73. Instituto Nacional de Salud. Protocolo de Vigilancia en salud pública de leishmaniasis. INS, Bogotá, D.C.: 2007. Disponible en: http://www.ins.gov.co/pdf/vcsp/2008_sivigila/Documentos/PROTOCOLOS/No_inmunoprevenibles/leishmaniasis-f.pdf.

74. Robinson RJ, Agudelo S, Muskus C, Alzate JF, Berberich C, Barker DC, Velez ID. The method used to sample ulcers influences the diagnosis of cutaneous leishmaniasis. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2002; 96: Pág. 169-171.

75. García D. Tesis de doctorado. Leishmaniasis cutánea: Estudio en el área sanitaria de Toledo. Madrid, 2004.

76. Oruéa A, De Abreua NY, Martínez C, Mendoza-Leóna A. Identificación de una secuencia de ADN genómico de *Leishmania* especifica del subgénero *Leishmania*. Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología. 2008; 28: Pág. 6-13.

77. Ampuero J, Pereira Rios A, Carranza-Tamayo CO, Sierra Romero GA. Genus-specific kinetoplast-DNA PCR and parasite culture for the diagnosis of localized cutaneous leishmaniasis: applications for clinical trials under field conditions in Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2009; 104 (7): Pág. 992-997.

78. OMS. Control of the leishmaniasis: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the control of leishmaniases, Genova, 22-26 Marzo 2010. WHO technical reprt series; n°. 949.

79. Alves da Silva L, Santos de Sousa S, Cardoso da Graca G, Porrozzi R, Cupolillo E. Sequence analysis and PCR-RFLP profiling of the hsp70 gene as a valuable tool for

identifying Leishmania species associated with human leishmaniasis in Brazil. Infection, Genetics and Evolution. 2020; 10: Pág. 77–83.

80. Hide, M., Bañuls, A.L. Species-specific PCR assay for L. Infantum/L. donovani discrimination. Acta Tropica. 2006; 100, Pág. 241–245.

9. DIVULGACIÓN DEL CONOCIMIENTO GENERADO

VII Encuentro Nacional de Investigación en Enfermedades Infecciosas. Paipa, Mayo 20-22 de 2010.

KO-43 **Detección molecular de *Leishmania* spp. en lesiones cutáneas del personal del Ejército Nacional de Colombia expuesto en zonas endémicas**

Jimena Jojoa, Claudia Méndez, Sandra Bello, Rocío Fernández, Johana Hernández, Claudia Castro
Laboratorio de Referencia e Investigación en Enfermedades Tropicales, Dirección de Sanidad, Ejército Nacional, Bogotá, D.C. clamacaos@hotmail.com

Introducción y Objetivos. La leishmaniasis es una enfermedad parasitaria producida por protozoos del género *Leishmania*. Anualmente se reportan dos millones de casos nuevos en el mundo; en Colombia, la incidencia aumentó notoriamente desde el 2005, ante el gran número de casos reportados por las fuerzas militares, las cuales presentan un gran número de bajas operacionales dadas las dificultades en el diagnóstico temprano de la enfermedad, razón por la cual es necesario contar con herramientas más especificas y sensibles. El objetivo del estudio fue determinar la utilidad de la PCR en el diagnóstico de leishmaniasis cutánea en el personal del Ejército Nacional de Colombia expuesto en

KP-44 **Validación de tres metodologías de laboratorio para el diagnóstico de la leishmaniasis cutánea**

Johana Hernández, Claudia Méndez, Sandra Bello, Rocío Fernández, Jimena Jojoa, Claudia Castro
Laboratorio de Referencia e Investigación en Enfermedades Tropicales, Dirección de Sanidad, Ejército Nacional, Bogotá, D.C. clamacaos@hotmail.com

Introducción y Objetivos. El diagnóstico de la leishmaniasis cutánea en Colombia se basa, principalmente, en el análisis microscópico de material obtenido de la lesión. Sin embargo, una alta proporción de casos dejan de detectarse debido a problemas relacionados con la calidad de la muestra, el número de parásitos y la evolución de la enfermedad. El presente estudio buscó validar el uso de las metodologías diagnósticas convencionales, tales como el examen microscópico y el cultivo, frente a un método molecular basado en la PCR, en la población militar, la cual es blanco de alto riesgo para la enfermedad. **Materiales y métodos.** Se incluyeron en el estudio 349 pacientes del Ejército Nacional con leishmaniasis cutánea sin tratamiento, previo consentimiento informado. A cada paciente se le tomaron tres muestras, consistentes en aspirado, raspado y linfa del borde activo de la lesión, para frotis, microcultivo y PCR. **Resultados.** Luego de la validación de las metodologías en el laboratorio, 163 muestras resultaron positivas en el análisis directo; se obtuvieron cultivos positivos en 27 muestras y la PCR fue positiva en 338 muestras. Por otra parte, el 90% de los cultivos positivos tuvieron resultado positivo en el examen directo y hubo una concordancia del 100% entre los resultados del examen directo, el cultivo o ambos, y la PCR. **Conclusiones.** El uso combinado de las metodologías del diagnóstico convencional y los métodos moleculares incrementa la

CLAUDIA MARCELA CASTRO OSORIO
Investigadora Dirección de Sanidad . 1.

DESCRIPCIÓN POBLACIONAL DE LOS PACIENTES INFECTADOS CON LEISHMANIASIS EN EL EJÉRCITO NACIONAL

Population Description of the Patients Infected with Leishmaniasis in the National Army

Resumen

La leishmaniasis es una enfermedad parasitaria producida por protozoos del género Leishmania los cuales causan un grupo de enfermedades conocidas como Leishmaniasis en las cuales la enfermedad cutánea es la presentación más común. En Colombia el número de casos de leishmaniasis ha aumentado notablemente desde el año 2005 ante el reporte de miles de casos por parte de las Fuerzas Militares. El diagnóstico de la enfermedad se hace por medio del frotis directo de la lesión, el cual en casos de evolución avanzada ocasiona un gran número de falsos negativos llevando a la cronicidad de la enfermedad.

El objetivo de este estudio fue describir las condiciones poblacionales de los pacientes del Ejército infectados con leishmaniasis, las cuales pueden influir la realización de un diagnóstico efectivo; para ello se analizaron los datos de 346 pacientes procedentes de las unidades con mayor número de casos reportados durante el segundo semestre del año 2010, a quienes se les recolectaron datos epidemiológicos y se realizó frotis directo de la lesión. Se observó que el 53% de los pacientes presentaban lesiones con más de un mes de evolución lo cual dificulta el diagnóstico y evita el efecto deseado del medicamento y el 45% presentaban recurrencias de la enfermedad indicándonos que debemos dirigir proyectos enfocados a estudios de resistencia a los fármacos anti leishmania. De igual manera, debemos fortalecer las campañas de prevención con el fin de disminuir las tasas de infección en el Ejército.

Abstract

The leishmaniasis is a parasitic disease produced by protozoos of the Leishmania gender which causes a group of diseases known as Leishmaniasis in which the cutaneous disease is the most common presentation. In Colombia the number of cases of leishmaniasis has increased remarkably since 2005 according to the report of thousands of cases in the troops. The diagnosis of the disease was obtained by means of direct frotis on the injury, which in cases of advanced evolution causes a great number of false negatives leading the sickness to the chronic state.

The objective of this study was to describe the population conditions of the Army infected patients of the Army with leishmaniasis, which can influence the accomplishment of an effective diagnosis. We analyzed data of 346 patients coming from the units with greater number of cases reported during the second semester of 2009, to those who collected data to them epidemiologists and frotis direct of the injury was realised. It was observed that 53% of the patients showed injuries with more than one month of evolution. It makes difficult the diagnosis and avoids the desired effect of the medicine and 45% presented recurrences of the disease indicating us that we must direct focused projects to studies of resistance to drugs anti leishmania. At the same way, we must fortify the prevention campaigns to diminish the rates of infection in the Army.

Palabras Claves:

Leishmaniasis, Ejército, diagnóstico, recurrencias

Keywords:

Leishmaniasis, army, diagnosis, recurrences

1. Claudia Marcela Castro, Bacterióloga, Magister en Microbiología, Jimena Jojoa, Bacterióloga, tesista, Estudiante de Maestría en Microbiología, Universidad Nacional. Sandra Bello, Bacterióloga, Magister en Ciencias Biológicas, Rocío Fernández, Bacterióloga. Johana Hernández, Microbióloga, Magister en Microbiología, MY. Claudia Méndez, Bacterióloga, estudiante Maestría en Microbiología Universidad Javeriana, Coordinadora. Todas del Laboratorio de Referencia e Investigación en Enfermedades Tropicales del Ejército. Dirección de Sanidad Ejército

10. ANEXOS

ANEXO 1. CONSENTIMIENTO INFORMADO

Proyecto: Detección molecular de *Leishmania spp.* en lesiones cutáneas del personal del Ejército Nacional de Colombia expuesto en zonas endémicas.

INFORMACIÓN Y FORMATO DE CONSENTIMIENTO

Introducción

Investigadores del Grupo de Investigación de Enfermedades Tropicales del Ejército con sede en Bogotá, están realizando un estudio para encontrar mejores formas de diagnosticar la leishmaniasis cutánea en personal del Ejército Nacional.

La *Leishmania* es un parásito que causa un grupo de enfermedades conocidas como leishmaniasis. Este parásito es capaz de infectar a gran cantidad de mamíferos entre ellos el hombre en quien la enfermedad puede presentarse de diversas maneras. Los datos indican que el número de casos han aumentado en estos últimos años. La afección cutánea es la presentación más común. Esta infección se manifiesta con una lesión en el sitio de la picadura de un mosquito que va evolucionando hasta la producción de una ulcera. En personal del Ejército Nacional existe una alta tasa de la enfermedad debido a muchos factores como su situación laboral y su instancia en las zonas endémicas.

Propósito

El propósito de este estudio es determinar la utilidad de algunas metodologías en el diagnóstico e identificación de *Leishmania spp.* a partir de muestras clínicas en personal del ejército Nacional.

Participación

Usted es libre de autorizar su participación en este estudio. Si usted decide autorizar su participación, le pediremos hacer lo siguiente:

Responder algunas preguntas relacionadas con la historia de la enfermedad. Autorizar la toma de un aspirado a partir de la lesión cutánea y una muestra de sangre. Para la toma de aspirado a partir de la lesión cutánea, la zona afectada se limpiará con alcohol antiséptico y se introducirá una jeringa para aspirar el líquido del borde de la lesión. Para la muestra sanguínea se tomará un tubo de sangre del brazo.

Los riesgos para este procedimiento son moderados, y consisten en la molestia que puede producir la aguja al ser introducida en la piel. Raras veces, se pueden presentar complicaciones como irritación o morados.

Costos

No se le cobrara ningún dinero por participar en este estudio. Los costos de toma de muestras y exámenes diagnósticos serán asumidos por el Grupo de Investigación.

Beneficios

El tratamiento para la enfermedad es gratis, incluso si decide no participar en el estudio. Usted se beneficiará directamente del estudio porque se le procesaran muestras para el diagnóstico de la *Leishmania spp* por diferentes métodos, lo cual aumenta la posibilidad de confirmar la enfermedad. Los resultados de este estudio podrían facilitar el diagnóstico de la enfermedad, sin embargo existe la posibilidad de que el estudio no lo beneficie.

Riesgos

El riesgo para la salud que conlleva la obtención de muestras de aspirado no es distinto al riesgo de realizar el diagnóstico en cualquier paciente con lesiones cutáneas. Las complicaciones que se pueden presentar como consecuencia en la toma de muestras son leves y poco frecuentes. La muestra de sangre generalmente no presenta complicaciones, pero puede aparecer en algunos casos un morado en el lugar donde se extraiga la sangre.

Derechos

Usted es libre de rehusarse a participar en el estudio ahora o retirarse en una fecha posterior, sin afectar los servicios médicos que están usualmente disponibles para usted.

Confidencialidad

Guardaremos privacidad acerca de los registros que puedan identificarlo hasta donde nos lo permita la ley. Ni sus registros ni sus muestras serán marcados con su nombre. Solo se utilizará un código del estudio. Los investigadores que participen en este estudio podrán ver ese código pero no el nombre. Su nombre tampoco aparecerá en ningún informe de este estudio.

Compensación

Si usted sufre algún daño debido al procedimiento de obtención de muestras, le daremos atención médica sin costo. Problemas no relacionados con el estudio o debidos al tratamiento de la leishmaniasis no están cubiertos por el estudio.

Personas a contactar

Si tiene preguntas adicionales o alguna queja con respecto al estudio puede comunicarse con la Mayor Claudia Méndez del Laboratorio de Referencia e investigación en enfermedades tropicales del Ejército Nacional teléfono 3470200 Ext. 190 o 191. Bogotá D.C.

Aceptación

Por favor, pregunte si tiene cualquier duda acerca del estudio o de este formato.

Su firma abajo indica que usted decidió participar en este estudio.

FIRME (O COLOQUE SU HUELLA DIGITAL) ABAJO SI USTED LIBREMENTE DECIDIO HACER PARTE DE ESTE ESTUDIO.

	Nombre (en letra clara)	Lugar y fecha (día/mes/año)	Firma o huella digital
Paciente			
Bacterióloga			

Autorización para guardar muestras

Si en alguna de las muestras se aísla el parásito de la leishmaniasis esta se incluirá en un Banco de cepas en el Laboratorio de Referencia e Investigación en Enfermedades Tropicales del Ejército Nacional que se utilizará para futuros estudios encaminados a mejorar el conocimiento sobre esta enfermedad. Por favor, háganos las preguntas que tenga acerca de esto. Si firma abajo, significa que está de acuerdo con dejar guardar las muestras después del estudio. Firme (o coloque su huella digital) abajo si usted libremente elige dejar guardar las muestras.

Si usted no está de acuerdo con dejar guardar estas muestras después del estudio, no firme

abajo. En ese caso, usted podrá participar en el estudio, pero sus muestras serán descartadas después de ser analizadas.

Si nos permite guardar sus muestras, pero decide cambiar de parecer en cualquier momento, contacte a la Mayor Claudia Méndez en el Laboratorio de Referencia e Investigación en Enfermedades Tropicales del Ejército Nacional teléfono 3470200 Ext. 190 o 191, Bogotá.

	Nombre (en letra clara)	Lugar y fecha (día/mes/año)	Firma o huella digital
Paciente			

ANEXO 2. FICHA EPIDEMIOLOGICA

PROYECTO LEISHMANIASIS

DATOS

ID Laboratorio _____

Datos demográficos

Fecha de ingreso _____

Nombre _____ Edad _____

Documento_____Grado _____

Donde adquirió la lesión _____

Datos epidemiológicos

Ubicación lesión

Cabeza ___ Cuello ___ Brazos ____ Piernas ____

Otra _____

Tiempo de evolución de la lesión _____

Tratamiento previo: SI _____NO _____

Observaciones

_____

_____

_____

Profesional responsable: _____

ANEXO 3. MINICULTIVO DE LEISHMANIAS EN MEDIO SCHNEIDER´S SUPLEMENTADO CON SUERO FETAL BOVINO 20%.

1. El exudado tomado con jeringa de 3 ml con aguja calibre 25 conteniendo 0.5 ml de una mezcla de antibióticos penicilina/estreptomicina (100 unid/ml penicilina y 100 µg/ml de estreptomicina).
2. Depositar el contenido en un vial estéril con 0.5 mL de medio de cultivo Schneider´s Drosophila suplementado con suero fetal bovino al 20%.
3. Incubar a 26°C realizando lecturas cada tres días para observar su crecimiento.
4. Si el cultivo es positivo se masificar en caja de cultivo celular de 25 ml de capacidad con 5 ml de medio de cultivo Schneider´s Drosophila suplementado con suero fetal bovino al 20%.
5. Los cultivos negativos fueron descartados hasta 28 días de incubación.

ANEXO 4. EXTRACCIÓN DE ADN POR FENOL-CLOROFORMO

1. Las muestras directas y los cultivos se tomaron en viales con 400 µl de solución de sales amortiguadoras PBS pH 7.4.
2. Adicionar 50 µl de solución de lisozima de 10 mg/ml, mezclar y e incubar a 37°C durante toda la noche.
3. Adicionar 80 µl de una solución de SDS 10 % (70 µl) y proteinasa K 10 mg/ml (10 µl), mezclar e incubar durante 10 minutos a una temperatura de 65°C en baño maría.
4. Adicionar 100 µl de solución de NaCl 5 M.
5. Adicionar 100 µl de solución CTAB/NaCl (4.1 g NaCl y 10 g CTAB [N-cetyl-N,N,N,-trimethylammoniumbromide] en 100 ml de agua destilada estéril) precalentada a 65°C durante 10 minutos. Mezclar hasta obtener un aspecto lechoso e incubará a 65°C durante 10 minutos.
6. Adicionar 750 µl de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (24:1:1), mezclar por inversión, durante 10 segundos y centrifugar a 13.000 rpm por 15 minutos a temperatura ambiente y separar la fase acuosa a otro vial nuevo y limpio.
7. Añadir 450 µl de isopropanol para precipitar los ácidos nucleicos, mezclar por inversión e incubar a -20°C durante toda la noche.
8. Centrifugar durante 15 minutos a 13.000 rpm y descartar el sobrenadante.
9. Adicionar al precipitado un mililitro de etanol al 70 %, mezclar por inversión y centrifugar durante 5 minutos a 13000 rpm. Descartar el sobrenadante y repetir este pasó una vez más.
10. Dejar secar el pellet de ADN a temperatura ambiente durante toda la noche.
11. Resuspender en 50 µl de solución de sales amortiguadoras de pH TE 0.1X.
12. Dejar en reposo una hora y procesar o almacenar hasta su uso a -20°C.

ANEXO 5. PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN DE ADN CON KIT Wizard® SV Genomic DNA Purification System. Promega. Cat #. A2361.

Preparación de soluciones:

A) Solución de digestión

Componentes	**Volumen por muestra (µl)**
Solución de lisis Nucleico	200
0.5 M EDTA pH 8.0	50
Proteinasa K (20mg/ml)	20
Solución RNasa A	5
Volumen Total	**275**

B) Solución de lavado:

1. Adicionar etanol al 95% a la botella de Wizard SV wash solution.
2. Guardar a temperatura ambiente.

Procedimiento de extracción de AND a partir de Cultivo y muestra directa

1. Tomar los 400 µl de buffer de extracción TE 1X con la muestra de tejido o cultivo y contenidos en un vial de 1.5 ml de capacidad.
2. Adicionar 275 µl de la solución de digestión a cada tubo de muestra.
3. Incubar los viales de las muestras a 55°C toda la noche.
4. Adicionar 250 µl de buffer Wizard sv Lysis a cada vial de muestra. Mezclar con vortex.
5. Transferir todo el lisado a la columna ensamblada con el tubo colector.
6. Centrifugar a 13000 x g durante 3min, a temperatura ambiente.
7. Descartar el líquido del tubo de recolección y volver a poner la columna en él.
8. Agregar 650 µl de la solución Wizard SV Wash a la columna
9. Centrifugar a 13000 x g durante 1 min, a temperatura ambiente.
10. Descartar el líquido del tubo de recolección y volver a poner la columna en él.
11. Repetir los pasos de limpieza 5-7 tres veces.

12. Centrifugar una vez más a 13000 x g durante 2 min, a temperatura ambiente, para secar el pellet.
13. Transferir la columna a un tubo nuevo de 1,5mL.
14. Agregar a la columna 50 µl de agua libre de nucleasas.
15. Incubar a temperatura ambiente por 2 min.
16. Centrifugar a 13000 x g durante 1min, a temperatura ambiente.
17. Remover la minicolumna y descartarla.
18. Centrifugar a 13000 x g durante 1 min, a temperatura ambiente.
19. Tapar el tubo de elución que contiene el ADN genómico purificado y almacenar a -20 °C.

ANEXO 6. CRIOPRESERVACIÓN

1. Sembrar las cepas en medio de cultivo Schneider´s suplementado con suero fetal bovino al 15% e incubarlos a 26°C hasta obtener un buen crecimiento de promastigotes con una concentración de 1 millón por ml (fase logarítmica de crecimiento a una concentración aproximada de 1x107 células/ml).
2. Pasar el contenido del frasco de cultivo a un tubo de 15 ml.
3. Centrifugar el cultivo de parásitos a 2000 rpm durante 10 minutos.
4. Retirar el sobrenadante y añadimos al pellet 5 ml de Medio de Congelación (medio de cultivo más 10% de glicerol estéril), resuspendiendo dicho pellet.
5. Repartir 1.5 mL de los parásitos en medio de congelación en tubos de congelación de plástico con tapa a rosca hermética de 1,8 ml de capacidad debidamente identificado y la fecha de criopreservación.
6. Mezclar por inversión el contenido celular y el glicerol debe ser para obtener una solución homogénea.
7. Enfriar las cepas haciendo un descenso de la temperatura de forma gradual, exponiendo el vial a 4 °C durante 1 hora (24 horas si es necesario), pasar a un congelador a -20 °C durante 1 hora y finalmente por tiempo indefinido a -70 °C o en nitrógeno líquido.

ANEXO 7. PREPARACIÓN DE MEDIO DE CULTIVO SCHNEIDER´S SUPLEMENTADO CON SUERO FETAL BOVINO 20%.

1. Inactivar previamente el suero fetal bovino a 56°C por 30 minutos.
2. Medir 45 ml del suero anteriormente inactivado y mezclarlo con 255 ml de medio de cultivo Schneider´s Drosophila 1X, para un volumen final de 500 mL.
3. Medir el pH que debe ser entre 7.4 +/- 0.1.
4. Esterilizar por filtración utilizando un filtro de membrana con un poro de 0,22 µm.
5. Guardar y mantener el medio a 4°C para su uso.

ANEXO 8. COLORACION DE GIEMSA

1. Dejar secar el frotis a temperatura ambiente durante 10 minutos.
2. Fijar las láminas con metanol absoluto, y dejar secar a temperatura ambiente.
3. Colocar las láminas a colorear en la gradilla de coloración, debidamente marcadas.
4. Prepare la solución de coloración: 4 gotas de colorante giemsa por cada 6 mililitros de PBS, (por cada placa se utilizan 3 mililitros de buffer + 2 gotas de Giemsa).
5. Cubrir la lámina con suficiente colorante Giemsa, sin burbujas, durante 20 minutos.
6. Lavar la lámina con agua de chorro, dejando caer el agua suavemente para quitar el exceso de colorante.
7. Dejar secar a temperatura ambiente.
8. Leer al microscopio con objetivo de 100X y aceite de inmersión.

ANEXO 9. PREPARACIÓN DE SOLUCIONES

1. Solución amortiguadora de pH TE (Tris 10 Moll/l, EDTA 1 mmol/1).

Diluir la solución 100X hasta alcanzar la concentración deseada sea esta 1X o 0,1X.

2. Solución de lisozima.

Pesar 10 mg de lisozima y disolver en 1 ml de agua destilada. Almacenar a -20°C.

3. Solución de proteinasa K.

Pesar 10 mg de proteinasa K y disolver en 1 ml de agua destilada estéril. Almacenar a -20°C.

4. Solución de CTAB/NaCl.

Pesar 4.1g de NaCl y 10g de CTAB (Bromuro de N-hexadecil N,N,N-trimetil amonio) y disolver en 80ml de agua destilada (calentando a 65°C). Ajustar a 100 ml con agua destilada y almacenar a temperatura ambiente.

5. Etanol al 70%.

Mezclar 70 ml de etanol absoluto con 30 ml de agua bidestilada. Almacenar a 4°C.

6. Solución amortiguadora de pH TAE (Tris-borato-EDTA).

Diluir 10 ml de Solución amortiguadora de pH TAE 10X en 90 ml de agua destilada.