UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA
FACULTAD DE LA SALUD HUMANA
CARRERA DE LABORATORIO CLÍNICO

TÍTULO

Identificación genética de especies de leishmania circulantes en los cantones de Centinela del Cóndor y Nangaritza, de la provincia de Zamora Chinchipe.

MACROPROYECTO

Identificación genética de especies de leishmania en zonas endémicas en la Región Sur del Ecuador.

Tesis previa a la obtención del título de Licenciada en Laboratorio Clínico

AUTORA:
Janeth Alexandra Ochoa Romero

DIRECTOR:
Dr. Luis Alberto Morocho Yaguana, Mg. Sc.

LOJA – ECUADOR
2019

Certificación

Dr. Luis Alberto Morocho Yaguana, Mg. Sc.

DIRECTOR DE TESIS

CERTIFICO:

Que he revisado y orientado en el marco del Reglamento de Régimen Académico de la Universidad Nacional de Loja vigente, todo el proceso de desarrollo del trabajo investigativo titulado: **"Identificación genética de especies de leishmania circulantes en los cantones de Centinela del Cóndor y Nangaritza, de la provincia de Zamora Chinchipe."** de autoría de la Srta. **Janeth Alexandra Ochoa Romero**, previo a la obtención del título de Licenciada en Laboratorio Clínico.

Loja, 13 de marzo del 2019

Atentamente,

Dr. Luis Alberto Morocho Yaguana, Mg. Sc.

DIRECTOR DE TESIS

Autoría

Yo, **Janeth Alexandra Ochoa Romero** con CI. 1900613397 declaro ser autora del presente trabajo de investigación, y eximo expresamente a la Universidad Nacional de Loja y a sus representantes jurídicos de posibles reclamos o acciones legales por el contenido de la misma.

Adicionalmente acepto y autorizo a la Universidad Nacional de Loja la publicación del presente trabajo en el Repositorio Institucional de la Biblioteca Virtual.

Autora: Janeth Alexandra Ochoa Romero

Firma: _____

Cédula: 1900613397

Fecha: 13 de marzo de 2019

Carta de Autorización

Yo, Janeth Alexandra Ochoa Romero, declaro ser autora de la tesis titulada: **"Identificación genética de especies de leishmania circulantes en los cantones de Centinela del Cóndor y Nangaritza, de la provincia de Zamora Chinchipe"** como requisito para optar al grado de Licenciada en Laboratorio Clínico; autorizo al sistema bibliotecario de la Universidad Nacional de Loja para que con fines académicos muestre al mundo la producción intelectual de la Universidad, a través de la visibilidad en su contenido de la siguiente manera en el Repositorio Digital Institucional.

Los usuarios pueden consultar el contenido de este trabajo en el RDI, en las redes de información del país y del exterior, con las cuales tengan convenio la Universidad.

La Universidad Nacional de Loja no se responsabiliza por el plagio o copia de la tesis que realice un tercero.

Para constancia de esta autorización, en la ciudad de Loja, a los 13 días del mes de marzo del dos mil diecinueve, firma la autora.

Firma*:* …….

Autora*:* Janeth Alexandra Ochoa Romero

Cédula: 1900613397

Correo electrónico: jalexita.2896@gmail.com

Teléfono: dom. 072315506 Cel. 0981109184

DATOS COMPLEMENTARIOS

Director de tesis: Dr. Luis Alberto Morocho Yaguana, Mg. Sc.

Tribunal de Grado:

Presidenta: Lic. María del Cisne Loján González, Mg. Sc.

Vocal: Dra. Diana Alexandra Montaño Peralta, Mg. Sc.

Vocal: Dra. Elsa Cumanda Ramírez Sanmartín, Mg. Sc.

Dedicatoria

La presente tesis se la dedico a mi madre quien ha sido mi ejemplo a seguir y mi pilar fundamental para salir adelante, por el apoyo incondicional que siempre me da a pesar de los malos momentos, todo lo que tengo es por ella y todos mis logros son para ella, gracias mamá por educarme de la mejor manera y hacer de mi la mujer que soy ahora, no dejándome caer cuando parecía que todo se venía abajo, fuiste y serás la fortaleza de mi vida.

A Dios y la Virgen del Cisne, gracias por escucharme y permitirme llegar a culminar una de las muchas etapas de mi vida y poner en mi vida a todas esas personas tan maravillosas que me ayudaron y apoyaron para ser mejor persona.

A toda mi familia que me supo brindar sus consejos y palabras de aliento para seguir adelante, especialmente a mi Tía Amparito R. que supo ser mi segunda madre cuando pensaba que no iba a lograrlo y por su apoyo durante toda mi carrera Universitaria.

A mis amigos y todos quienes supieron ayudarme y aconsejarme cuando más lo necesitaba, y que pese a nuestros conflictos siempre estuvieron ahí para mí, brindándome palabras de aliento.

Gracias a todos por su apoyo incondicional.

Agradecimiento

Agradezco a Dios por permitirme alcanzar un propósito más en mi vida, a mi madre, familiares y amigos por apoyarme y aconsejarme a cada momento.

Expreso mi agradecimiento a los docentes de la carrera de Laboratorio Clínico que supieron dirigirme y transmitirme sus conocimientos y enseñanzas al largo de mi carrera.

Al Dr. Luis Morocho director de mi proyecto de tesis por haberme dado la oportunidad de formar parte de su proyecto y por transmitirme sus conocimientos y el entusiasmo por la investigación. Al Dr. Franklin Román encargado del laboratorio de Biología Molecular por la ayuda, apoyo, paciencia y la dedicación a lo largo de todo este tiempo para llegar a la culminación de este trabajo de investigación.

Índice

Carátula i
Certificación ii
Autoría..... iii
Carta de Autorización iv
Dedicatoria v
Agradecimiento vi
1 Título.....1
2 Resumen.....2
Abstract 3
3 Introducción 4
4 Revisión literaria.....8
4.1 Leishmaniasis 8
4.1.1. Definición.....8
4.2 Tipos de Leishmaniasis 8
4.2.1 Leishmaniasis cutánea localizada (LCL) o úlcera de los chicleros 8
4.2.2. Leishmaniasis mucocutánea (LMC) o espundia.....8
4.2.3 Leishmaniasis visceral (LV) o Kala-azar.....9
4.3 Agente causal.....9
4.3.1 Morfología. 9
4.3.2 Ciclo de vida. 10
4.3.3 Hábitat del vector.....10
4.3.4 Especies de Leishmania. 10
4.4 Transmisión 12
4.4.1 Vectores. 13
4.4.2. Reservorios. 13
4.5 Epidemiología.....13
4.6 Factores de riesgo 14
4.6.1 Movilidad de la población. 14
4.6.2 Cambios ambientales. 15
4.6.3 Cambio climático.....15
4.7 Diagnóstico.....15
4.7.1 Diagnóstico en Laboratorio. 15

4.7.2 Diagnóstico Molecular. 17
4.7.3 Pruebas Inmunológicas. 19
4.8 Árboles filogenéticos 20
5 Materiales y métodos 21
5.1 Tipo de estudio 21
5.2 Área de estudio 21
5.3 Universo 21
5.4 Muestra 21
5.5 Técnicas e instrumentos de recolección de datos: 21
5.6 Criterios de inclusión 22
5.7 Criterios de exclusión 22
5.8 Materiales y Métodos para cada uno de los objetivos específicos. 22
5.8.1 Metodología para el primer objetivo. 22
5.8.2 Metodología para el segundo objetivo. 23
5.8.3 Metodología para el tercer objetivo 24
5.8.4 Metodología para el cuarto objetivo 24
6 Resultados 25
7 Discusión 31
8 Conclusiones 33
9 Recomendaciones 34
10 Bibliografía 35
11 Anexos 39
Anexo 1. Encuesta aplicada a los moradores de los cantones de Centinela del Cóndor y Nangaritza de la provincia de Zamora Chinchipe 39
Anexo 2. Aprobación del protocolo de investigación por el Comité de Investigaciones en Seres Humanos del Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública Dr. Leopoldo Izquieta Pérez 41
Anexo 3. Consentimiento Informado 43
Anexo 4. Protocolo de toma de muestras por raspado para tinción y microscopia 46
Anexo 5. Protocolo de toma de muestra de linfa por aspirado y cultivo. 49
Anexo 6. Preparación de medios de cultivo NNN/ Schneider 52
Anexo 7. Registro paciente con lesiones presuntivas de leishmaniasis. 54
Anexo 8. Protocolo de extracción de DNA de leishmania 55
Anexo 9. Protocolo PCR convencional. 58

Anexo 10. Protocolo de electroforesis en geles de agarosa normales.....62
Anexo 11. Resultados de procesamiento de muestras Macrogen Inc. 66
Anexo 12. Difusión de resultados 67
Anexo 13. Resultados de secuenciación 70
Anexo 14. Certificación de traducción.....71
Anexo 15. Proyecto de tesis 72

1 Título

Identificación genética de especies de leishmania circulantes en los cantones de Centinela del Cóndor y Nangaritza, de la provincia de Zamora Chinchipe

2 Resumen

La leishmaniasis es una enfermedad causada por especies del protozoo *Leishmania*, se transmite por la picadura de la mosca infectada perteneciente al género Lutzomyia. El agente causal presenta un flagelo en el insecto por lo que se denomina promastigote, y carece de este al parasitar a los macrófagos de huéspedes vertebrados por lo que recibe el nombre de amastigote. La leishmaniasis presenta reservorios domésticos y silvestres como perros, zorros, roedores, lobos. En Ecuador se han identificado lesiones ocasionadas por *L. braziliensis, L. panamensis, L. guyanensis, L. mexicana, y L. amazonensis*. Su epidemiología depende de las características de la especie del parásito, características ecológicas y locales de los lugares donde se transmite, exposición previa y actual de la población humana. En el presente estudio se planteó realizar una búsqueda activa de casos sospechosos, realizar el muestreo e identificar las especies de leishmania circulantes en los cantones de Centinela del Cóndor y Nangaritza de la provincia de Zamora Chinchipe. La muestra la constituyeron las personas con sintomatología presuntiva para leishmaniasis de 100 familias encuestadas en dichos cantones. Se tomaron muestras de raspado para microscopia y de aspirado de linfa para cultivo de tres personas que presentaban una lesión en miembro inferior izquierdo, cara y miembro inferior izquierdo respectivamente, en forma de úlcera de bordes irregulares e indoloras , con el fin de identificar Leishmania,*spp*; para identificar la especie se realiza la amplificación de un fragmento del gen que codifica la proteína de choque térmico HSP70, se identificó *L.braziliensis* realizando alineamientos en el programa MEGA y comparando con especies disponibles en GenBank, utilizando las secuencias obtenidas se elaboró el árbol filogenético, los resultados se socializaron a estudiantes y docentes de la carrera de Laboratorio Clínico.

Palabras claves: leishmaniasis, PCR, identificación, hsp70, Zamora.

Abstract

Leishmaniasis is a disease caused by protozoan species Leishmania, it is transmitted by the bite of the infected fly belonging to the genus Lutzomyia. The causal agent presents a flagellum in the insect for what is called a promastigote, and it lacks this when parasitizing the macrophages of vertebrate hosts for what is called amastigote. Leishmaniasis has domestic and wild reservoirs such as dogs, foxes, rodents, wolves. In Ecuador, lesions caused by *L. braziliensis, L. panamensis, L. guyanensis, L. mexicana,* and *L. amazonensis* have been identified. Its epidemiology depends on the characteristics of the parasite species, ecological and local characteristics of the places where it is transmitted, previous and current exposure of the human population. In the present study, an active search for suspected cases, sampling and identification of circulating leishmania species in the cantons of Centinela del Cóndor and Nangaritza in the province of Zamora Chinchipe was proposed. The sample consisted of people with presumptive symptoms for leishmaniasis of 100 families surveyed in those cantons. Samples were taken for microscopy scraping and lymphatic aspirate for culture of three people who presented a lesion in left lower limb, face and left lower limb respectively, in the form of an ulcer with irregular and painless edges, in order to identify Leishmania, spp; to identify the species, a fragment of the gene encoding the HSP70 heat shock protein was amplified, L. braziliensis was identified, making alignments in the MEGA program and, comparing with available species in GenBank, using the obtained sequences, the phylogenetic tree was elaborated , the results were socialized to students and teachers of the career of Clinical Laboratory.

KEY WORDS: leishmaniasis, PCR, identification, hsp70, Zamora.

3 Introducción

La leishmaniasis se presenta en forma cutánea, mucocutánea y visceral, causadas por un protozoo del género *Leishmania*, la enfermedad es transmitida por diferentes especies de flebótomos o lutzomyias, y el reservorio son los animales vertebrados. Estas enfermedades se caracterizan por comprometer la piel, mucosas y vísceras, según la especie de leishmania y la respuesta inmune del huésped. Son enfermedades crónicas de patogenicidad baja y morbilidad relativa (OMS, 2017).

Se encuentra asociada con un amplio espectro de manifestaciones clínicas que pueden variar desde lesiones cutáneas ulcerosas que cicatrizan, leishmaniasis cutánea (LC); las no ulcerosas o difusas que no curan fácilmente, leishmaniasis cutáneo difusa (LCD); hasta notorias desfiguraciones en la forma mucosa, leishmaniasis mucocutánea (LMC) y una forma sistémica fatal, leishmaniasis visceral (LV) (Chena L, 2012).

La leishmania cutánea y mucocutánea tiene una alta prevalencia en muchas áreas tropicales y subtropicales del mundo. Lo que constituye un grave problema para la salud pública a nivel psicológico, socio- cultural y económico. Estos aspectos son de gran impacto para que la leishmaniasis sea considerada por la OMS como una de las enfermedades tropicales de mayor importancia que requiere investigar nuevos métodos de prevención, diagnóstico y tratamiento (OPS, 2014).

En nuestro país se ha identificado la distribución de las especies de Leishmania por región ecológica (subtropical en la costa del Pacífico, zona montañosa andina y áreas tropicales de la Amazonía), en la zona tropical de la amazonia se ha identificado tres especies como agentes causantes de leishmaniasis: *L. guyanensis, L. braziliensis, L. Naiffi*, estas dos últimas han sido identificados recientemente en la Amazonía ecuatoriana (Kato et al., 2016).

El método común de diagnóstico se realiza mediante microscopia de la lesión con coloración de Giemsa o mediante cultivos, se emplean también pruebas indirectas con el fin de identificar anticuerpos específicos contra el parásito. El método de Inmunofluorescencia Indirecta (IFI) mide anticuerpos contra antígenos de *Leishmania* mediante una reacción *in-vitro*; la presencia de anticuerpos no significa un caso positivo, se debe tomar en cuenta además la sintomatología clínica y la posibilidad de reacciones cruzadas. La intradermorreacción de Montenegro (IDRM) es una prueba cutánea empleada como prueba complementaria mas no como prueba de diagnóstico ya que puede presentar falsos negativos y reacciones cruzadas con la enfermedad de Chagas (D'Suze, 2012).

En la identificación de especies se utilizan los métodos moleculares debido a su gran sensibilidad para detectar el parásito infeccioso en muestras de humanos, animales vertebrados e insectos vectores. Las amplificaciones basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) han utilizado diversos blancos moleculares, como los espaciadores internos de la transcripción del ARN ribosómico (ITS-rRNA), el ADN del cinetoplasto (kDNA) y el gen que codifica la proteína de choque térmico de 70 kDa (hsp70), cuya utilidad se ha comprobado ampliamente en años recientes (Montalvo et al., 2016).

La evolución de la enfermedad y su forma clínica están directamente relacionadas con la especie de Leishmania, por este motivo, su identificación es un factor determinante en las etapas de diagnóstico, tratamiento y manejo epidemiológico de esta parasitosis (Montalvo, Fraga, & Monzote, 2012)

En las provincias tropicales de la Amazonía: Orellana, Pastaza, Sucumbíos, Zamora-Chinchipe, se han identificado *L. Braziliensis*, *L. Guyanensis*, *L. Naiffi* y *L. Lainsoni* causantes de la infección. Casos de *L. Naiffi* se identificaron en Shangrila en la provincia de Orellana y *L . Lainsoni* en la provincia de Sucumbíos. En el sur de la provincia amazónica en

Zamora Chinchipe, *L. Braziliensis* ha sido identificado como especie causante de la enfermedad (Kato et al., 2016).

Por lo tanto, se considera importante identificar las especies de Leishmania causantes de la infección utilizando métodos de biología molecular, mediante ADN extraído de muestras clínicas de lesiones de pacientes, PCR convencional y electroforesis en gel, obteniendo como resultados predecir la especie causante de la infección y circulante en las áreas endémicas de la provincia de Zamora Chinchipe en los cantones de Centinela del Cóndor y Nangaritza.

En definitiva, en la provincia de Zamora Chinchipe, siendo una de las provincias endémicas y donde no se ha realizado la identificación genética de leishmania y desconociendo la especie causante de la enfermedad, existiendo pocas investigaciones realizadas en esta zona del país con respecto a esta infección, razón por la cual se propuso el presente tema de investigación titulado "Identificación genética de especies de leishmania circulantes en los cantones de Centinela del Cóndor y Nangaritza, de la provincia de Zamora Chinchipe" el grupo de estudio lo constituyeron la población de los cantones, obteniendo muestras de pacientes con sospecha clínica de leishmaniasis.

Para el desarrollo y cumplimiento de la presente investigación se planteó como objetivos: 1) Buscar de manera activa y realizar cultivo de muestras presuntivas de casos de leishmaniasis en el cantón Centinela del Cóndor y Nangaritza de la provincia de Zamora Chinchipe, 2) Identificar genéticamente las cepas aisladas en los cantones Centinela del Cóndor y Nangaritza usando proteína HPS70, 3) Elaborar un árbol filogenético de las cepas identificadas y 4) Difundir los resultados a los estudiantes de la carrera de Laboratorio Clínico de la Universidad Nacional de Loja.

Para el cumplimiento de los objetivos se realizó encuestas a 100 familias de los cantones en estudio, encontrándose 3 personas con sintomatología presuntiva de leishmaniasis,

realizando la toma de muestra de raspado para microscopia y de aspirado de linfa para cultivo, aplicándose protocolos para la extracción de DNA, PCR y electroforesis en la muestra donde la microscopia indicaba presencia del parásito; muestra que fue secuenciada identificando la especie de *L. braziliensis* y elaborando el árbol filogenético comparando con especies disponibles en GenBank y la secuencia obtenida. Resultados que fueron socializados a los docentes y estudiantes de la carrera de Laboratorio Clínico.

4 Revisión literaria

4.1 Leishmaniasis

4.1.1. Definición. Espectro de enfermedades causadas por especies del protozoo Leishmania, de la familia *Trypanosomatidae*; se transmite a los humanos por la picadura de mosquitos de género *Phlebotomus* en el viejo mundo y *Lutzomyia* en el nuevo mundo. Es conocida por varios nombres: en América Central y Sudamérica es conocida como botón doloroso, úlcera del chiclero, úlcera de la playa, tubérculo de los bosques, tubérculo de los arbustos, buba y uta. Enfermedad, que afecta a las poblaciones más pobres del planeta, está asociada a la malnutrición, los desplazamientos de población, las malas condiciones de vivienda, la debilidad del sistema inmunitario y la falta de recursos (D'Suze, 2012).

4.2 Tipos de Leishmaniasis

4.2.1 Leishmaniasis cutánea localizada (LCL) o úlcera de los chicleros. El periodo de incubación es desde dos semanas a seis meses o más. Comienza por una mácula en el sitio de la picadura que dura 1 a 2 días, la mácula evoluciona a pápula, que dura unos 4 días como promedio. La lesión continúa creciendo y se desarrolla un nódulo, el cual consiste en una masa dérmica que contiene macrófagos vacuolados con abundantes parásitos de leishmania y un infiltrado linfocitario. Dando como resultado una úlcera indolora, redondeada, de fondo limpio, color rosado, tejido granuloso y bordes indurados. (Morelos, 2015).

4.2.2. Leishmaniasis mucocutánea (LMC) o espundia. El periodo de incubación va desde una semana a varios meses. Es la extensión a las mucosas de una lesión de LC en la cara presentándose en forma simultánea con las lesiones cutáneas iniciales, o por metástasis invaden vía linfática o hemática las mucosas e incluso el cartílago (Uribarren, 2017).

El proceso puede extenderse al paladar en donde produce lesiones infiltrativas en el paladar blando y faringe; la úvula se infiltra, se hipertrofia y luego se amputa. Pese al poder destructivo, las lesiones no suelen ser muy dolorosas, pero provoca graves destrucciones y mutilaciones, afectando la calidad de vida del paciente. No evolucionan a la cura espontáneamente. Son resistentes a la terapia convencional y las infecciones bacterianas secundarias son la causa más común de la muerte (OMS, 2017).

4.2.3 Leishmaniasis visceral (LV) o Kala-azar. Su periodo de incubación es de 10 días a 24 meses. Se caracteriza al inicio por fiebre intermitente, malestar general, pérdida de peso, anorexia y pancitopenia, todo lo cual se va acentuando gradualmente. Los signos clínicos habituales son esplenomegalia indolora a la presión, hepatomegalia moderada, palidez de las mucosas y pérdida de peso. En casos avanzados suele haber oscurecimiento de la piel, caquexia y pelo quebradizo; la presentación de neumonía, diarrea mucosanguinolenta y tuberculosis pulmonar intercurrente, son a menudo causas directas de muerte. Afecta comúnmente a niños (Morelos, 2015).

4.3 Agente causal

4.3.1 Morfología. El agente causal es un parásito perteneciente al género *Leishmania* que presenta un flagelo en el vector y se denomina promastigote, y carece de este al parasitar a los macrófagos de huéspedes vertebrados y recibe el nombre de amastigote (Uribarren, 2017).

El promastigote se encuentra en el huésped invertebrado y es la forma que inocula al vertebrado. Son parásitos alargados que miden entre 10µ y 15µ de longitud, presenta un núcleo en la parte media del cuerpo, cerca del extremo anterior de este parásito está el cinetoplasto, que puede ser terminal o sub-terminal, y de donde sale un flagelo que le confiere movimiento. Este flagelo es casi de igual tamaño que el cuerpo(Botero & Restrepo, 2012).

El amastigote**,** la forma replicativa**,** redondo u oval, intracelular, reside y se multiplica en fagolisosomas dentro de fagocitos mononucleares de los hospederos. Mide 2 - 4 µm, contiene gran núcleo y un cinetoplasto pequeño y un filamento delgado que une cinetoplasto y cuerpo basal. El cinetoplasto es una subestructura de la gran mitocondria, con DNA único y se encuentra asociado estrechamente al bolsillo flagelar y al cuerpo basal del flagelo (Uribarren, 2017).

4.3.2 Ciclo de vida. La hembra vectora se infecta al picar un vertebrado y succionar amastigotes con la sangre y macrófagos infectados. En el tubo digestivo de los mosquitos, los amastigotes se alargan y desarrollan rápidamente el flagelo para dar origen a los promastigotes. Los promastigotes de las diferentes especies de leishmania se reproducen por división binaria, el tiempo que toma el vector para ser infectante es de aproximadamente diez días. Al penetrar los promastigotes libres por la picadura a la piel, son englobados por las células de Langehrans y otros macrófagos, dentro de los fagosomas se transforman en amastigotes. Estos se reproducen intracelularmente, rompen las células y entran a nuevas células hasta causar lesiones ulcerativas por destrucción del tejido (Botero & Restrepo, 2012).

4.3.3 Hábitat del vector. Los flebotomos se distribuyen en regiones tropicales, subtropicales y cálidas, en hábitats que pueden variar desde selva húmeda hasta zonas muy áridas. Hay varios hospederos vertebrados de leishmania. algunos son naturales mientras que otros como el humano son accidentales, los hospederos naturales de este parásito son roedores, marsupiales, osos perezosos, cánidos y primates no humanos (Vela, 2014).

4.3.4 Especies de Leishmania. Incluye un conjunto de parásitos protozoarios del filo Sarcomastigóforos, familia *Trypanosomatidae.* Es un parásito intracelular obligado dimórfico; en los hospederos mamíferos se localiza en macrófagos y células dendríticas (Uribarren, 2017).

Dentro del género *leishmania* se describen dos subgéneros en función del lugar de multiplicación de los promastigotes en el tracto digestivo del vector: subgénero *Leishmania* presente en el viejo mundo con reproducción suprapilorica y subgénero *Viannia* en el nuevo mundo con reproducción peripilórica. Cada subgénero comprende varios complejos separados por características bioquímicas y moleculares, cada uno a su vez con una o varias especies, de las cuales al menos veinte se consideran patógenas para el hombre (Tomás, 2014).

La infección humana se produce por el complejo *Leishmania donovani* con dos especies *L. donovani*, *L. infantum*, también conocida como *L. chagasi* en el Nuevo Mundo, el complejo *L. mexicana* con tres especies principales: *L. mexicana, L. amazonensis y L. venezuelensis; L. tropica, L. major, L. aethiopica* y el subgénero viannia con 4 especies principales: *L. braziliensis, L. guayanensis, L. panamensis y L.peruviana* (Uribarren, 2017).

- **Especies identificadas en Ecuador**

En Ecuador se han demostrado 8 especies, los datos del Ministerio de Salud Pública del Ecuador (MSP) demuestran una tendencia estable de casos humanos, media de 1.500 casos anuales, desde hace 15 años atrás, así como su distribución tanto en las provincias de la Costa, Amazonia y algunos valles de provincias Andinas. El mantenimiento en las tasas de infección humana es debido a que el vector se adapta a las nuevas condiciones ecológicas creadas por el hombre y la invasión de éste al ciclo natural de transmisión del parásito (Calvopina, Armijos, & Hashiguchi, 2004).

En Ecuador, la leishmanias es un importante problema de salud pública reportado en 21 de las 24 provincias del país y ocho especies de leishmania: *L. mexicana, L.amazonensis,L. guyanensis, L. panamensis, L. braziliensis , L, naiffi y L. lainsoni* han sido identificadas como agentes causante de leishmaniasis cutánea y leishmaniasis mucocutánea (Kato et al., 2016).

En provincias tropicales de la Amazonía (Orellana, Pastaza, Sucumbíos, Zamora-Chinchipe), *L. braziliensis* fue identificado como la especie dominante. Casos de *L. naiffi* la se identificaron en la provincia de Orellana, y *L. lainsoni* se identificó en la provincia de Sucumbíos. En el sur de la provincia amazónica en Zamora Chinchipe, solamente *L. braziliensis* ha sido identificado (Kato et al., 2016).

4.4 Transmisión

El período de incubación en los seres humanos es de 2 a 3 meses en promedio, pero puede tener períodos de incubación más cortos de 2 semanas o largos de dos años (OMS, 2017).

- **Entrada del parásito**

La picadura del vector es muy dolorosa y se describe popularmente como “pringadura de manteca hirviente”. La mayoría de los infectados son asintomáticos, otros desarrollan la enfermedad según la especie del parásito, la virulencia, respuesta inmune y los factores genéticos (Botero & Restrepo, 2012).

- **Úlcera cutánea**

Las lesiones pueden comenzar como una pápula que evoluciona a nódulo redondeado, indoloro, que aumenta progresivamente de tamaño y se ulcera. Inicialmente las úlceras están cubiertas por una costra y al desprenderse, se observa la úlcera típica de fondo limpio, color rosado y tejido granuloso, redondeada, de bordes regulares y elevados, indolora y de base indurada. En ocasiones las úlceras pueden infectarse secundariamente con otros agentes microbianos y pueden cambiar de tamaño y apariencia con el tiempo (OPS, 2014).

- **Compromiso mucoso**

Se presenta en lesiones nasales que se inician en la piel, se propagan a la mucosa y puede producir perforación del tabique nasal. Esta invasión es causada por los parásitos del complejo *L. braziliensis.* Aparece después de varios meses de iniciada la lesión cutánea y aun después de su cicatrización. La diseminación se hace por vía sanguínea o linfática, algunas veces por extensión de una lesión en la cara. El 50% de este compromiso en mucosas ocurre entre el primer y tercer año de la lesión en la piel (Botero & Restrepo, 2012).

4.4.1 Vectores. Los vectores de todas las especies de *Leishmania* son hembras hematófagas de la familia *Psychodidae*, subfamilia *Phlebotominae* y de las 500 especies conocidas, solo 31 se identifican como vectores de especies patógenas y 43 como vectores probables, pertenecientes a los géneros *Phlebotomus* en el Viejo Mundo y *Lutzomyia* en el Nuevo Mundo (Montalvo, Fraga, & Monzote, 2012).

4.4.2. Reservorios. La leishmaniasis es una zoonosis mantenida por reservorios domésticos y silvestres como perros, zorros, roedores, chacales, lobos, perezosos. En zonas andinas, se ha encontrado infectado al perro doméstico y a una gran variedad de roedores. Varios estudios concuerdan, que los parásitos aislados en el hombre y en la rata pertenecen a la misma especie. En América del Sur se han encontrado como reservorios de la *L. amazonensis* a los marsupiales y principalmente a los roedores; de la L. guyanensis, al perezoso y marsupiales; de la *L. brasiliensis*, a perros y equinos (Morales, Pérez, & Caballero, 2009).

4.5 Epidemiología

En el mundo, se estima que cada año se producen entre 0,9 a 1,6 millones de nuevos casos de leishmaniasis, y entre 20.000 y 30.000 defunciones. En las Américas, actualmente se

registra un promedio de 56.000 casos de leishmaniasis cutánea y mucosa y 3.800 casos de leishmaniasis visceral al año. La leishmaniasis cutánea se registra en 20 países, siendo endémica en 18 de ellos (Colombia, Costa Rica, Brasil, Argentina, Ecuador, Venezuela, Bolivia, Perú, Paraguay, El Salvador, Honduras, Nicaragua, Panamá, Guyana, Surinam, Guatemala, Guyana Francesa y México (Organizacion Panamericana de la Salud, 2017)

La leishmaniasis visceral está presente en 12 países, aunque el 96% de los casos se concentra en Brasil. Además, se han registrado casos frecuentes en Argentina, Paraguay, Colombia y Venezuela, siendo que esporádicamente son registrados casos en Costa Rica, El Salvador, Guatemala, Honduras, Nicaragua, Bolivia, y México (OMS, 2017)

Durante el 2018 en Ecuador se han reportado 1073 casos de leishmaniasis distribuidos en las diferentes provincias, cuyo porcentaje mayor de casos se dio en las provincias de Pichincha con 218 casos, Santo Domingo de los Tsanchilas con 143 casos, Morona Santiago con 141 casos y Esmeraldas con 111 casos, del total de casos presentados 1051 fueron leishmanias cutánea y 22 casos de leishmaniasis mucocutánea respectivamente (MSP, 2018).

En la zona 7 (El Oro, Loja y Zamora Chinchipe) en el año 2018 se han presentado 45 casos de leishmaniasis cutánea, con un numero predominante de casos en la provincia de Zamora Chinchipe, 28 casos correspondientemente distribuidos en los cantontes de Palanda, Centinela del Cóndor, Yanzatza, Nangaritza, Zamora y Chinchipe (MSP, 2018).

4.6 Factores de riesgo

4.6.1 Movilidad de la población. Las epidemias de las formas principales de Leishmaniasis se asocian con la migración y el desplazamiento de personas no inmunizadas a zonas donde ya existen ciclos de transmisión. La exposición en el trabajo y el aumento de la deforestación siguen siendo factores importantes (OMS, 2017).

4.6.2 Cambios ambientales. Los cambios ambientales que pueden influir en la incidencia de leishmaniasis son la urbanización, la integración del ciclo de transmisión en el hábitat humano y la incursión de las explotaciones agrícolas y los asentamientos en las zonas boscosas (Lloveras, Moreno, Bava y Orduna, 2011)

4.6.3 Cambio climático. La leishmaniasis es sensible a las condiciones climáticas, los cambios de temperatura, precipitaciones y humedad pueden tener efectos importantes en los vectores y los reservorios animales, al alterar su distribución e influir en las tasas de supervivencia y el tamaño de la población, pequeñas fluctuaciones en la temperatura pueden tener un acusado efecto en el ciclo de desarrollo de los promastigotes de Leishmania en los flebótomos, y permitir que el parásito se transmita en zonas donde la enfermedad no era previamente endémica (OMS, 2017).

4.7 Diagnóstico

El diagnóstico por lo general depende de la forma clínica de presentación y de las posibilidades tecnológicas existentes en el servicio médico que recibe al paciente. Una vez que se presenta un paciente con las características clínicas o epidemiológicas que hagan sospechar una leishmaniasis, pueden realizarse una serie de exámenes que se describirán más adelante, en relación con la forma de presentación de la enfermedad (Montalvo, Fraga, & Monzote, 2012).

4.7.1 Diagnóstico en Laboratorio.

4.7.1.1 Método parasitológico. Son métodos específicos y se aplican en todas las formas clínicas de la enfermedad, estos incluyen el examen microscópico de extendidos, raspados, biopsias o aspirados, tomados por lo general del borde de las lesiones y teñidos con Giemsa. También se realiza el examen histopatológico para la búsqueda de amastigotes en distintos

tejidos. En la forma visceral la muestra para el examen parasitológico directo se toma del aspirado de bazo, nódulos linfáticos o médula ósea, proceso muy invasivo para el paciente que requiere alta pericia en estos procederes y otras condiciones técnicas. (Montalvo, Fraga, & Monzote, 2012)

4.7.1.2 Microscopia. La muestra para el frotis se puede obtener a través de la escarificación de la superficie o del borde de la lesión (surco dérmico), utilizando un bisturí; también algunos utilizan un palito de madera con una de sus extremidades en bisel o con un escarificador, todos previamente esterilizados. La compresión de la lesión lleva a una isquemia y aumento de la linfa dérmica, lo que puede mejorar el rendimiento de la prueba. El diagnóstico se confirma cuando los amastigotes de *Leishmania sp.* se reconocen microscópicamente en las preparaciones teñidas con Giemsa, realizadas con material clínico obtenido de las lesiones por raspado, aspirado (tomado con jeringa y solución fisiológica estéril) o biopsia del borde de las lesiones (Susana Lloveras, 2011).

4.7.1.3 Biopsia. Permite observar la presencia de amastigotes intracelulares. En las formas crónicas no siempre se logra demostrar los parasitos, pero el cuadro histopatológico hace sospechar de la enfermedad. Cuando se forman granulomas se observan células epiteloides y celulas gigantes de Langerhans. La biopsia se puede partir en tres segmentos: uno para impresiones, otro para el estudio histológico y el tercero para cultivo o PCR. (Meryem Lemrani, 2008)

4.7.1.4 Cultivo. Del material obtenido en condiciones asépticas, el medio más empleado es Novy-MacNeal-Nicolle, conocido como medio NNN. También se emplea el medio de Senekje y el medio de *Drosofila* de Schneider para el crecimiento masivo para hacer las clasificaciones isoenzimáticas o para estudios moleculares. La incubación se hace a temperatura ambiente entre 20°C y 30°C. Después de ocho días se revisan los cultivos para

buscar los promastigotes en la fase liquida, que con frecuencia están aglomerados y entrelazados por los flagelos, formando algunas rosetas que son características (Botero & Restrepo, 2012).

4.7.2 Diagnóstico Molecular.

4.7.2.1 PCR, reacción de la cadena de la polimerasa. La información acerca de secuencias de ADN de *Leishmania*, disponibles en la actualidad en las redes de información, constituye un aporte fundamental para desarrollar ensayos basados en la reacción en cadena de la polimerasa (RCP), con aplicaciones que incluyen el diagnóstico. Para este propósito se utilizan varios genes, de preferencia secuencias multicopias, con la finalidad de desarrollar una máxima sensibilidad en la detección (Montalvo, Fraga, & Monzote, 2012).

La técnica consiste en amplificar una región específica del ADN del parásito mediante el uso de secuencias de oligonucleótidos que funcionan como indicadores para la extensión de las nuevas cadenas de ADN que se amplifican. Es un procedimiento cuya sensibilidad y especificidad es elevada si se utilizan primers apropiados. El material que se utiliza se puede obtener de raspado o aspirado de la lesión, biopsia o sangre total (Orué, De Abreu, Martínez & Mendoza, 2008).

4.7.2.2 Identificación de especies.

- **Proteína de choque térmico HSP70**

Es un grupo de chaperonas involucradas en diversos procesos celulares, incluido el plegamiento de proteínas y la degradación de proteínas. Además de mantener la homeostasis celular normal mediante el procesamiento de proteínas recién sintetizadas, la familia Hsp70 también es importante para controlar las vías de señalización intracelular mediante la

regulación del plegamiento y la actividad de las proteínas de señalización (Novus Biologicals, 2015).

Se localizan en una gran variedad de compartimentos celulares. En el RE se localiza la proteína BiP de eucariotas, responsable de la translocación de proteínas desde el citoplasma a este orgánulo celular. En *L. donovani* se ha caracterizado el gen homólogo al gen BiP, denominado GRP78. Los miembros de la familia HSP70 localizados en la mitocondria han sido estudiados en *L. major*. La proteína HSP70 representa un 2,1% de la proteína total celular en los parásitos del género Leishmania. Además, la síntesis de esta proteína aumenta durante la exposición de los promastigotes a temperaturas de choque térmico (35-37ºC) (Montalvo et al., 2016).

- **ADN del Kinetoplasto (kNDA)**

La técnica de ADN del Kinetoplasto cuenta con genes altamente polimórficos y presentes en un gran número de copias. En la enfermedad mucocutánea, la utilización del ADN del kinetoplasto (*k*DNA) como diana genética resulta muy sensible para detectar los parásitos. Se consigue también la detección de *k*DNA de parásitos del subgénero *L.* (*Viannia*) en tejidos de la mucosa de 81 % de pacientes con enfermedad cutánea, lo cual pudiera indicar que este es un hecho común en infecciones con parásitos de este subgénero (Orué, De Abreu, Martínez & Mendoza, 2008).

- **Gen codificante de la subunidad menor 18S del RNA ribosomal**

En el ADN del parásito existen secuencias que presentan múltiples copias, como es el caso del gen codificante para la subunidad menor 18S del ARN ribosomal (18S rRNA), que cuenta con aproximadamente 160 copias (Meryem Lemrani, 2008). La amplificación del gen del 18S

rRNA permite únicamente la identificación de Leishmania a nivel de género más no de especie (Guerbouj, Mkada - Driss & Guizani, 2014.

4.7.3 Pruebas Inmunológicas.

4.7.3.1 Prueba cutánea de Montenegro. La medición de la respuesta de hipersensibilidad tardía, como manifestación de la respuesta inmune mediada por células, consiste en la inyección de 0,1 mL de antígeno de Leishmania en el antebrazo. Si la induración local que produce tras 2 o 3 d es igual o mayor que 5 mm, la reacción se considera positiva y la observación de la reacción epidérmica que se genera a consecuencia de la estimulación celular. (Montalvo, Fraga, & Monzote, 2012).

4.7.3.2 Inmunofluorescencia indirecta (IFI). Este método detecta anticuerpos específicos contra Leishmaniasis. La toma de muestra es por medio de recolección de sangre, con posterior separación del suero. Consiste en emplear como antígeno un cultivo de Leishmania mexicana y un conjugado fluoresceinado de anti-IgG humanas. Se llevan a cabo diluciones del suero del sospechoso que se ponen en contacto con el antígeno y el conjugado. Se leen con el microscopio de fluorescencia, todo suero con título 1:4 se considera positivo para Leishmaniasis cutánea y Leishmaniasis mucocutánea y 1:32 para la Leishmaniasis viceral (Montalvo et al., 2016).

4.7.3.3 ELISA. Detecta anticuerpos específicos contra Leishmania en sangre,la lectura de la prueba se hace en un espectrofotómetro. La muestra se considera positiva cuando la densidad óptica es igual o superior a la densidad óptica media de los sueros controles negativos más dos desviaciones estándar. Las pruebas serológicas tienen una sensibilidad del 90-100 % en Leishmaniasis Cutánea Difusa y Leishmaniasis Visceral, mientras que para Leismaniasis Mucocutánea sólo es sensible en un 50-60 %. No se recomienda para Leismaniasis cutánea localizada (Morelos, 2015).

4.8 Árboles filogenéticos

Un árbol filogenético muestra las relaciones entre varias especies, grupos taxonómicos mayores y otras entidades que se cree que tienen una descendencia común. Se crean a partir de datos moleculares ya sea ADN, ARN o proteínas. Se tiende a usar ADN cuando se analizan especies cercanamente emparentadas, porque proveen mayor información; mientras que las secuencias de aminoácidos son usadas para análisis filogenéticos de especies más lejanamente emparentadas (Mendoza, 2012).

En la filogenia molecular los nodos terminales son las secuencias génicas de individuos concretos y el resto del árbol se obtiene a partir del análisis comparativo de dichas secuencias. Los nodos interiores representan antecesores hipotéticos de los que a menudo no tenemos información. El árbol así construido es, una inferencia que ofrece una idea del camino seguido por la evolución (López, 2012).

5 Materiales y métodos

5.1 Tipo de estudio

El tipo de estudio tuvo enfoque experimental, de tipo descriptivo y corte transversal.

5.2 Área de estudio

El estudio se realizó en los cantones Centinela del Cóndor y Nangaritza de la provincia de Zamora Chinchipe en moradores que presentaron sintomatología compatible para leishmania.

5.3 Universo

El presente estudio fue realizado en la población de los cantones Centinela del Cóndor y Nangaritza, consideradas zonas endémicas debido a la incidencia de casos de leishmaniasis presentados en estas localidades.

5.4 Muestra

La muestra la constituyeron las personas sospechosas de leishmaniasis de 100 familias encuestadas en los cantones de Centinela del Cóndor y Nangaritza de la provincia de Zamora Chinchipe durante el periodo Marzo-Julio 2018; habitantes de lugares en los que antes se han reportado casos de leishmaniasis.

5.5 Técnicas e instrumentos de recolección de datos:

Para la recolección de datos se aplicó una encuesta a los participantes en el estudio **(Anexo N°1).**

5.6 Criterios de inclusión

- Personas encuestadas con diagnóstico presuntivo de leishmaniasis que no hayan recibido tratamiento y personas que hayan recibido tratamiento y presentan ulceras activas.
- Personas que aceptaron formar parte del estudio y firmaron el consentimiento informado.

5.7 Criterios de exclusión

- Pacientes que retiren su consentimiento informado.

5.8 Materiales y Métodos para cada uno de los objetivos específicos.

5.8.1 Metodología para el primer objetivo. La búsqueda activa estuvo dirigida a encuestar 100 familias en los cantones de Centinela del Cóndor y Nangaritza de la provincia de Zamora Chinchipe, en los sectores en donde se han reportado casos de leishmaniasis con la intensión de localizar posibles casos; actividad que fue aprobada por el Comité de Investigaciones en Seres Humanos del Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública Dr. Leopoldo Izquieta Pérez de Bioética del INSPI (**Anexo 2)**.

La toma de muestra se realizó de acuerdo a protocolos y previo consentimiento informado **(Anexo 3)** y consistió de raspado de la lesión **(Anexo 4)** y una muestra de aspirado de linfa de los bordes de las úlceras con ayuda de una pequeña cantidad de solución salina **(Anexo 5)** la cual fue sembrada en medios de cultivo NNN/ Schneider (**Anexo 6).**

Para cada individuo identificado con lesiones presuntivas de leishmaniasis se realizó un registro de muestras. **(Anexo 7)**

5.8.2 Metodología para el segundo objetivo. El fragmento del gen a identificar es HSP70 de muestras que resultaron positivas para leishmania, de acuerdo a los siguientes procedimientos:

a) **Extracción de ADN de *Leishmania* spp.**

Para la extracción ADN se utilizó reactivos en base al kit comercial Pure Link^{TM} Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen®), aplicando el protocolo descrito por (Motazedian, Karamian, Noyes & Ardehali, 2002) aplicando modificaciones **(Anexo 8).**

b) Pruebas de PCR convencional

Se amplificó un fragmento de 1422 pb de una región de proteína de choque térmico (hsp70) del citoplasma **(Anexo 9).**

Los cebadores utilizados para la amplificación fueron: HSP70sen: (GACGGTGCCTGCCTACTTCAA) y HSP70ant: (CCGCCCATGCTCTGGTACATC) (Montalvo et al., 2016)**.**

c) Electroforesis en gel de agarosa.

Los productos de PCR fueron corridos en gel de agarosa al 2% en buffer TBE 1X **(Anexo 10)**.

d) Análisis de amplificación (fotodocumentador)

Los geles fueron visualizados con tinción de Syber Safe y visualizados en luz ultravioleta, se utilizaron marcadores de peso molecular de 100-3000 pb.

e) Secuenciación.

Los amplicones fueron enviados a secuenciar al laboratorio Macrogen Inc. de Korea del Sur, Seoul **(Anexo 11).**

f) Análisis de secuencias.

Los productos de secuenciación fueron sometidos a Blast versión 2.8.1 que permitió comparar la secuencia obtenida con las secuencias que se encuentran en una base de datos (GenBank).

5.8.3 Metodología para el tercer objetivo

a) Edición de árboles filogenéticos.

Se realizaron alineamientos en el programa MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) versión 6.0, de las diferentes especies de leishmania disponible en GenBank.

5.8.4 Metodología para el cuarto objetivo

Organización e invitación a la difusión de los resultados obtenidos en la investigación, a estudiantes y docentes de la carrera de Laboratorio Clínico. **(Anexo 12)**

6 Resultados

Resultados del primero objetivo

Encuesta realizada a los moradores de los cantones Centinela del Cóndor y Nangaritza de la provincia de Zamora Chinchipe.

Tabla 1

Ubicación geográfica de personas encuestadas, según lugar de residencia de los cantones Centinela del Cóndor y Nangaritza.

Cantón	Urbano	%	Rural	%
Centinela del Cóndor	5	36	46	53
Nangaritza	9	6	40	47
Total	14		86	

Fuente: Encuesta realizada a la población de los cantones Centinela del Cóndor y Nangaritza.
Elaborado por: Janeth Alexandra Ochoa Romero.

Interpretación

Del total de personas encuestadas el 53% corresponde al sector rural del cantón Centinela del Cóndor y el 47% representa el sector rural del cantón Nangaritza, cubriendo gran parte de la zona rural, siendo la más habitada y encontrando a los moradores en la mayoría de sus domicilios.

Resultados de búsqueda realizada en los cantones Centinela del Cóndor y Nangaritza.

La búsqueda activa se realizó en el periodo marzo-junio del 2018 en los cantones Centinela del Cóndor y Nangaritza donde se encuestaron a un miembro de cada familia (100 familias) obteniéndose 3 muestras con sintomatología presuntiva de leishmaniasis los mismos que se describen a continuación:

Tabla 2

Resultados búsqueda activa

Identificación	Cantón	Parroquia	Evolución de la lesión	Lugar probable de infección	Numero de lesiones	Localización de la lesión
1	Centinela del Cóndor	Zumbi	4 meses	Lugar de residencia (peridomiciliario)	1	Pierna izquierda
2	Centinela del Cóndor	Zumbi	3 meses	Lugar de residencia(labores agricolas)	1	Mejilla derecha
3	Centinela del Cóndor	Panguintza	2 meses	Lugar de residencia(labores agricolas)	1	Pierna izquierda

Fuente: Encuesta realizada a la población de los cantones Centinela del Cóndor y Nangaritza.
Elaborado por: Janeth Alexandra Ochoa Romero.

De los casos encontrados se realizó la toma de muestra de aspirado de linfa para cultivo y raspado para microscopía de la lesión ubicada en pierna izquierda, mejilla derecha y pierna izquierda para su posterior análisis en el laboratorio.

Resultados del segundo objetivo

Se analizó frotis y cultivo de cada una de las lesiones sospechosa de leishmaniasis, obtenidas durante la búsqueda activa. Obteniéndose los siguientes resultados:

Muestra 1: La muestra corresponde a persona de sexo femenino, ama de casa de 76 años, lesión localizada en el miembro inferior izquierdo; se analizó **f**rotis y cultivo sin evidenciarse la presencia del parasito. Esta muestra fue tomada de un paciente con co-morbilidad (diabetes) que presentaba la lesión posterior al tratamiento terminado.

Muestra 2: Persona de sexo masculino, agricultor de 22 años, con localización de lesión a nivel de mejilla derecha; en el cultivo realizado no se observó el parasito sin embargo al observar el frotis de la misma se evidencia la presencia de amastigotes.

Muestra 3: Persona de sexo masculino, agricultor, 22 años con lesión localizada a nivel del miembro inferior izquierdo; se procede a observar frotis y cultivo de lesión sin evidencia del parásito.

Extracción de ADN de *Leishmania, cuantificación* y determinación de la pureza de DNA

El ADN se extrajo de la muestra #2, se cuantificó el ADN obtenido con un volumen final de 1µL, usando como blanco TE (10mM Tris,1mM EDTA, ph 8) debido a que fue utilizado para resuspender el DNA extraído en los protocolos antes mencionado. Se tomó 1 µL de ADN para medir la concentración con una absorbancia a 260/280 por espectrofotometría y se almacenó a -20ºC para su procesamiento.

Tabla 3

Cuantificación de ADN

ID de muestra	Cantidad	Concentración
Muestra 2	47.1 ng/ul	0.8

Fuente: Lectura en NanoDroop.
Elaborado por: Janeth Alexandra Ochoa Romero.

Las muestras #1 y #3 no se realizó la extracción de DNA debido a que resultó negativo para microscopía.

PCR y electroforesis en geles de agarosa.

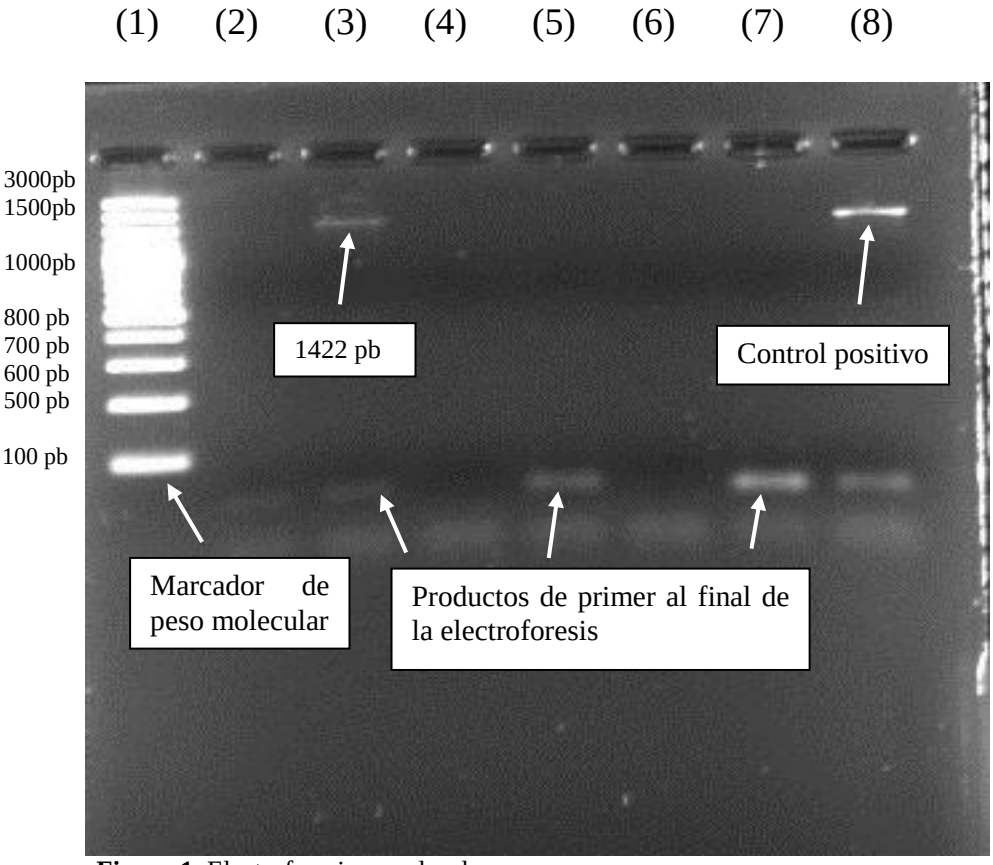


Figura 1. Electroforesis en geles de agarosa
Fuente: Elaboración autora

Resultado de PCR basados en la extracion de ADN de la muestra #2 de frotis de lesión. Análisis electroforético de productos de PCR de *Leishmania* en geles de agarosa.

Las bandas corresponden a: 1: marcador de peso molecular de tamaño de ADN-ladder (100-3000pb), 3: muestra #2, 8: control positivo.

Identificación de la especie.

Los productos amplificados del gen que codifica la proteína de choque térmico hsp70 de la muestra 2 fueron purificados y secuenciados con la finalidad de identificar la especie de *Leishmania.*

Se envió a secuenciar en un laboratorio de referencia Macrogen, Inc. en Corea del Sur **(Anexo13).** Una vez obtenidas las secuencias, utilizando el programa BLAST, se determinó que la muestras 2 obtenida de la lesión pertenece a una infección por *Leishmania braziliensis* con un 91% de identidad.

Alineamientos y árboles filogenéticos para las diferentes especies de *Leishmania.*

Se realizó alineamientos en el programa MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) versión 6.0, de las diferentes especies de *Leishmania* disponible en el GenBank y empleando las secuencias obtenidas se elaboró el árbol filogenético.

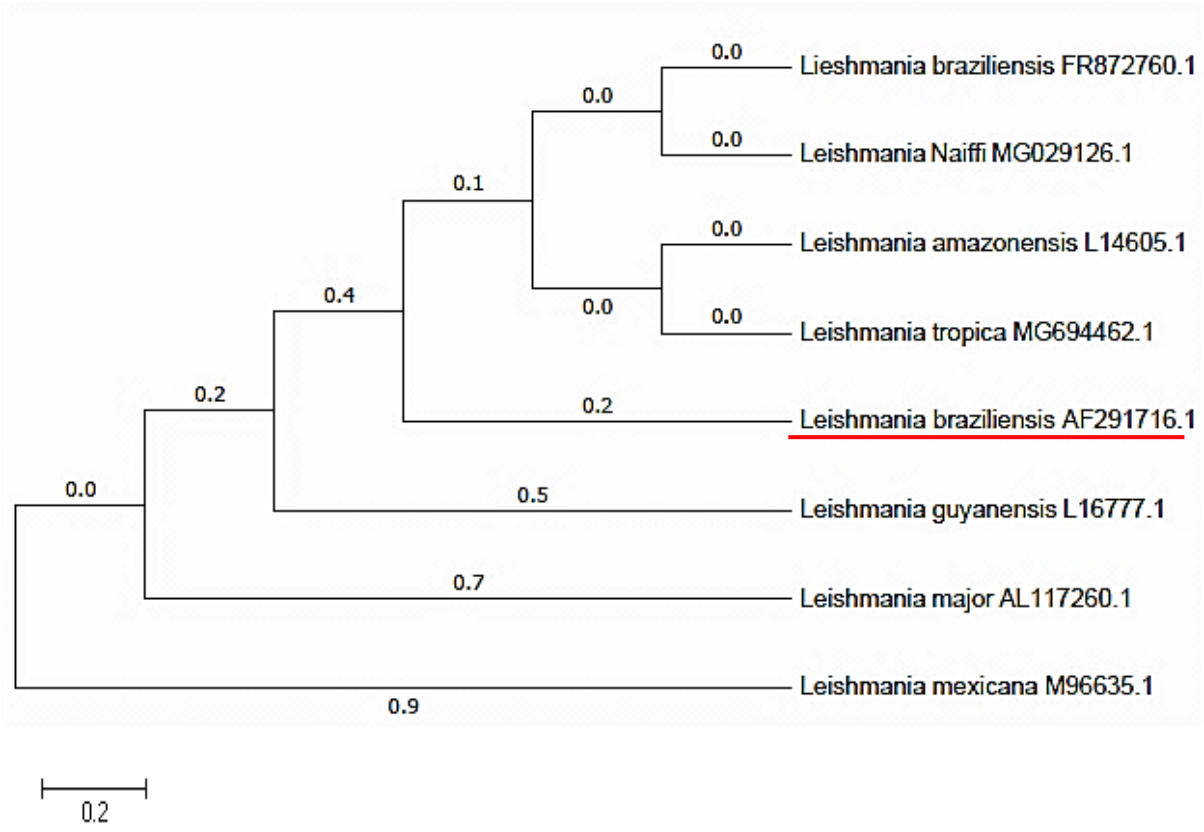


Figura 2. Árbol filogenético
Fuente: Elaboración autora

El fragmento del gen HSP70 de Leishmania se amplificó y secuenció, realizando el árbol filogénetico se comparó con la secuencia de *L. braziliensis* y especies disponibles en GenBank notándose una divergencia del 0,2% entre nucleótidos de las especies teniendo un mismo punto de ramificación del genero Leishmania. Los valores que se muestran corresponden al porcentaje de divergencia entre las secuencias.

7 Discusión

La leishmaniasis es un grupo de enfermedades parasitarias con distribución mundial. La leishmaniasis cutánea es la forma más extendida que causa lesiones primarias localizadas de la piel que pueden curarse por sí mismas, pero a partir de las cuales los parásitos pueden diseminarse a la mucosa nasofaríngea y causar lesiones secundarias típicas de la leishmaniasis mucocutánea o diseminarse a todo el cuerpo en forma de lesiones nodulares en leishmaniasis cutánea difusa (Monroy, Nasereddin, Monteon, Guzmán & Jaffe, 2014).

En Ecuador la leishmaniasis es endémica en las zonas de las tierras altas subtropicales, amazónicas y andinas de la costa del Pacífico, se han identificado especies *de Leishmania; L. mexicana, L .Amazonensis,L.guyanensis , L . Panamensis , L . Braziliensis* ,y *L . Naiffi* que están asociados con leishmaniasis cutáneas y mucocutáneas (Kato et al., 2016).

Los resultados obtenidos en la presente investigación se lograron mediante la búsqueda activa en los cantones de Centinela del Cóndor y Nangaritza de la provincia de Zamora Chinchipe, de un total de tres muestras obtenidas, una presentó amplificación para un fragmento del gen HSP70 de leishmania, se obtuvo un amplicon de la muestra y se envió a Macrogen, Inc. empresa pública de biotecnología de Corea del Sur; obteniendo la secuencia que fue sometida a Blast determinando que la muestra de la lesión es una infección por *Leishmania braziliensis* con un 91% de identidad. Se hizo alineamientos en el programa MEGA utilizando diferentes especies de *Leishmania* disponible en el GenBank y empleando las secuencias obtenidas se elaboró el árbol filogenético.

En un estudio realizado por Calvopina (2004) esta investigación se basó en un estudio epidemiológico de la leishmaniasis en Ecuador, se reportaron infecciones en humanos en 20/22 provincias del país; en la región amazónica se identificó la especie de *L.braziliensis*. Estos resultados se asemejan a los obtenidos en el presente estudio en cuanto a la especie

identificada*;* esto puede estar asociado a la zona endémica donde se dio la enfermedad, debido a las situaciones climáticas de la zona cálido-húmedo que influyen en gran medida en la enfermedad.

En los resultados obtenidos por Kato H y colaboradores (2016), las muestras fueron provenientes de pacientes sospechosos de tener leishmaniasis cutánea que asistían al centros de salud de las provincias de Sucumbios y Orellana, realizando amplificaciones de secuencias del gen del citocromo b, se identificó *L.guyanensis, L.braziliensis* y *L.lainsoni* , este estudio tiene similitud con la investigación realizada,permitiendo identificar una misma especie en comparación con los dos estudios, *L.braziliensis;* esto puede deberse a condiciones climáticas como la temperatura y la humedad que pueden tener efectos en los vectores y los reservorios animales.

En un estudio realizado por Kato H y colaboradores (2016) en el Ecuador, se realizó la identificación de especies causantes de leishmaniasis cutánea para establecer la distribución geográfica, basándose en el análisis del gen *cyt* b; obteniendo como resultados que la *L. Guyanensis* y *L. Braziliensis* están distribuidas en la costa del Pacífico, en la zona andina se identificó L. *Mexicana* y distribuciones de *L. Braziliensis*, *L. Naiffi)* y *L. Lainsoni* fueron identificadas en la Amazonia. Los resultados de identificación de la especie se asemejan a los del presente estudio puesto que la distribución geográfica de las mismas concuerda con lo obtenido, dado que lesiones causadas por la especie *L. Braziliensis* pueden estar asociado a antecedentes genéticos, patogenicidad de las cepas de parásitos, vectores, reservorios y lo más evidente el clima sub-tropical y tropical.

8 Conclusiones

- Realizada la búsqueda activa se detectó 3 personas con lesiones presuntivas de leishmaniasis en zonas rurales cuyas edades fluctúan de 15-24 años y de 65 años y más, quienes adquirieron la infección en su lugar de trabajo, lesiones que se encontraban localizadas a nivel de rostro y miembro inferior izquierdo respectivamente; se procesó frotis y cultivo identificando la presencia del parásito en uno de tres muestras analizadas, para lo cual se aplicó protocolos para la identificación de la especie.
- Se realizó la extracción de ADN de frotis positivo, con los productos se realizó la PCR convencional utilizando los cebadores que amplifican el gen que codifica la proteína HSP70 y con los resultados obtenidos se realizó la electroforesis en gel de agarosa, observándose la presencia de bandas; los productos fueron purificados y secuenciados identificando como especie *Leishmania braziliensis.*
- Se elaboró el árbol filogenético empleando las secuencias obtenidas, realizando alineamientos en el programa MEGA, de las diferentes especies de Leishmania disponible en GenBank.
- Los resultados obtenidos fueron difundidos a los estudiantes y docentes de la carrera de Laboratorio Clínico.

9 Recomendaciones

- En caso de no requerir cultivos tomar muestra de raspado de la lesión, debido a que es un método parasitológico factible para la observación del parásito.
- Suplementar la fase liquida del medio de cultivo preferentemente con antibióticos y antimicóticos para evitar la contaminación por hongos y bacterias.

10 Bibliografía

Botero, D., y Restrepo, M. (2012). *Parasitosis humanas* (5ª ed., Pp. 316-333). Colombia: Corporación para Investigaciones Biológicas (CIB).

Calvopina, M., Armijos, R., y Hashiguchi, Y. (2004). Epidemiología de la leishmaniasis en Ecuador: estado actual del conocimiento - Una revisión. *Memorias del Instituto Oswaldo Cruz* , *99*(7), 663-672. doi: 10.1590 / s0074-02762004000700001

Centro para la Prevencion y Control de Enfermedades. (2016). CDC - Leishmaniasis - Resources for Health Professionals. Retrieved from https://bit.ly/2BrdAWB

Chena, L., Nara, E., Canese, A., Oddone, R., Morán, M. y Russomando, G. (2012). Caracterización de cepas de Leishmania, por medio de la técnica de PCR-RFLP de la región del Miniexon de Líderes Empalmados (SLME), de humanos y caninos en Paraguay. *Memorias Del Instituto De Investigaciones En Ciencias De La Salud* , *10* (1), 14-23. Recuperado de https://bit.ly/2BstNLd

Córdova, O., Vargas, F., Hashiguchi, Y., Kato, H., y Gómez, E. (2011). Identificación de especies de Leishmania en pacientes y flebotominos en áreas de transmisión en una región del Perú. *Revista Peruana De Medicina Experimental Y Salud Publica* , *28* (3), 446-453. Recuperado de https://bit.ly/2I2mzTU

D'Suze, C. (2012). Leishmaniasis: generalidades históricas | Bitácora Médica. Recuperado de https://bit.ly/2I0hTxP

Departamento del Meta. (2016). Procedimiento técnico de leishmania. Obtenido de https://bit.ly/2TEwu3r

García, C., Fernandes, J., Azevedo, A., Rodrigues, L., Katsuragawa, T., y Motta, L. et al. (2015). CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LA LEISHMANIASIS

CUTÁNEA AMERICANA EN EL ÁREA TRI-FRONTERA DE ASSIS BRASIL, ESTADO DE ACRE, BRASIL. *Revista Do Instituto De Medicina Tropical De São Paulo* , *57* (4), 343-347. doi: 10.1590 / s0036-46652015000400012

Guerbouj, S., Mkada - Driss, I., y Guizani, I. (2014). Herramientas moleculares para comprender la eco-epidemiología, diversidad y patogénesis de los parásitos de Leishmania. Obtenido de https://bit.ly/2DlenIR

Kato, H., Bone, A., Mimori, T., Hashiguchi, K., Shiguango, G., & Gonzales, S. et al. (2016). First Human Cases of Leishmania (Viannia) lainsoni Infection and a Search for the Vector Sand Flies in Ecuador. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, *10*(5), e0004728. doi: 10.1371/journal.pntd.0004728

Kato, H., Gomez, E., Martini-Robles, L., Muzzio, J., Velez, L., & Calvopiña, M. et al. (2016). Geographic Distribution of Leishmania Species in Ecuador Based on the Cytochrome B Gene Sequence Analysis. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, *10*(7), e0004844. doi: 10.1371/journal.pntd.0004844

Lloveras, S., Moreno, D., Bava, A. y Orduna, T. (2011). El diagnóstico de la leishmaniasis cutánea: a propósito de un caso. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana* , *45* (1), 133-136. Obtenido de https://bit.ly/2RP7hBQ

Mendoza, J. (2012). Aportes de la filogenética a la investigación médica. *Revista Medica Herediana* , *23* (2), 119-127. Obtenido de https://bit.ly/2Ipk5iO

Monroy, A., Nasereddin, A., Monteon, V., Guzmán-Bracho, C., y Jaffe, C. (2014). ITS1 PCR-RFLP Diagnóstico y caracterización de Leishmaniain en las consultas clínicas y los casos de leishmaniasis cutánea humana en los estados del sureste mexicano. Obtenido de https://bit.ly/2TFKn1l

Montalvo, A., Fraga, J., Montano, I., Monzote, L., Van der Auwera, G., Marín, M., & Muskus, C. (2016). Identificación molecular de aislamientos clínicos de Leishmania spp. procedentes de Colombia con base en el gen hsp70. *Biomédica*, *36*, 37-44. doi: 10.7705/biomedica.v36i2.2688

Montalvo, A., Fraga, J., Monzote, L., García, M., & Fonseca, L. (2012). Diagnóstico de la leishmaniasis: de la observación microscópica del parásito a la detección del ADN. *Revista Cubana De Medicina Tropical*, *64*(2), 108-131. Obtenido de https://bit.ly/2Si04PE

Morales, H., Pérez, E., & Caballero, M. (2010). Leishmaniais. Retrieved from https://bit.ly/2DYYBoP

Motazedian, H., Karamian, M., Noyes, H., & Ardehali, S. (2002). DNA extraction and amplification ofLeishmaniafrom archived, Giemsa-stained slides, for the diagnosis of cutaneous leishmaniasis by PCR. *Annals Of Tropical Medicine & Parasitology*, *96*(1), 31-34. doi: 10.1179/000349802125000484

Morelos, J. M. (2015). Subsecretaría de Prevención y Promoción de la Salud. Obtenido de Centro Nacional de Programas Preventivos y Control de Enfermedades: https://bit.ly/2TBYyV6

Ministerio de Salud Pública. (2018). Gacetas del vector 2018 - Ministerio de Salud Pública. Obtenido de https://www.salud.gob.ec/gacetas-vectoriales-2018/

Muñoz, E. (2015). *Identificación de especies de leishmania, a partir de muestras de pacientes infectados con leishmaniasis.* (Licenciatura). Universidad de las Américas.

Novus Biologicals. (2015). Hsp70 / Hsc70 - Un acompañante para el plegamiento de proteínas y la autofagia | Noticias de anticuerpos: Novus Biologicals. Obtenido de https://bit.ly/2GxM9yB

Organización Mundial de la Salud. (2018). OMS | Enfermedades tropicales desatendidas: preguntas más frecuentes. Retrieved from https://bit.ly/2UQDKcW

OMS. (2017). Obtenido de Organización Mundial de la Salud: https://bit.ly/1iieHpm

Organización Mundial de la Salud. (2014). Obtenido de OMS: https://bit.ly/2ULOFEz

Organizacion Panamericana de la Salud. (2017). *OPS*. Obtenido de https://bit.ly/2TDSEmz

Orué, A., De Abreu, N., Martínez, C. y Mendoza, A. (2008). Identificación de una secuencia de ADN genómico de Leishmania especificado del subgénero Leishmania. Obtenido de http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1315-25562008000100003

Tomás, M. (2014). *Genotipado de las especies de Leishmania y variabilidad intraespecífica de L.infantum. Aportaciones al diagnóstico molecular y la epidemiología de la leishmaniosis.* (Doctorado). Universidat de Barcelona.

Uribarren, T. (2017). Universidad Nacional Autónoma de México. Obtenido de http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/parasitologia/leishmaniosis.html

Vela, M. (2014). *Variación genética de Nyssomyia trapidoi (Diptera: Psychodidae) en tres zonas endémicas de leishmaniasis cutánea en el Ecuador* (Licenciatura). Universidad San Francisco de Quito

Zapata, W. (2013). La leishmaniasis está presente en 22 de las 24 provincias del Ecuador. Obtenido de http://ecuadoruniversitario.com/noticias_destacadas/la-leishmaniasis-esta-presente-en-22-de-las-24-provincias-del-ecuador/

11 Anexos

Anexo 1. Encuesta aplicada a los moradores de los cantones de Centinela del Cóndor y Nangaritza de la provincia de Zamora Chinchipe.

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA
FACULTAD DE LA SALUD HUMANA
CARRERA DE LABORATORIO CLÍNICO

ENTREVISTA

Introducción.

Somos investigadores de la Universidad Nacional de Loja, y le pedimos nos autorice la realización de una entrevista, con el fin de investigar la presencia de la enfermedad leishmaniasis o "grano malo" en su localidad.

Su ayuda para nuestra investigación es absolutamente importante, pero usted es libre de elegir si participar o no.

Por favor lea o escuche toda las preguntas que se le plantea en este documento y haga todas las preguntas que necesite al investigador que se lo está explicando, antes de responder.

Fecha 11 de Junio del 20

1. DATOS GENERALES

1.1 Barrio/localidad Yavi
1.2 Parroquia Nuevo Paraiso
1.3 Sector Nangaritza
1.4. Punto de referencia —
1.5 No. Familia 57
1.6 Tiempo de Residencia 16 años
1.7 Nombre: [redacted]
1.8 Sexo Femenino [X] Masculino [ ]
1.9 Edad 70 (años + meses)
1.10 Estado civil Soltero
1.11 Instrucción Primaria
1.12 Ocupación Agricultor
1.13 Teléfono de contacto —

2. NIVEL DE CONOCIMIENTOS ACERCA DE LEISHMANIASIS

2.1. ¿Usted ha escuchado hablar de picaduras de mosca o mosquito que no sanan?
Si ( ) Sabe como la llaman..... No (x)

2.2. ¿Usted ha escuchado hablar sobre la mosca llamada arenilla, manta blanca o palomilla?
Si ( ) No (x)

2.3. ¿Usted ha escuchado hablar sobre la enfermedad de la leishmaniasis o grano malo?
Si ( ) No (x)

3. INFORMACIÓN SOBRE INFECCIÓN ACTUAL.

3.1 ¿Tiene usted Grano malo (leishmania)?
No (x)
Si ( )

Versión: 18 abril 2018

3.2 ¿Recuerda hace qué tiempo se originó el grano o llaga? _____

3.3 ¿Recuerda exactamente el sitio dónde la adquirió (lugar geográfico)?

_____

3.4 ¿Cuantos granos (llagas) tiene? _____

3.5 ¿En qué partes del cuerpo? _____

4. **INFORMACIÓN SOBRE EL PADECIMIENTO DE LA ENFERMEDAD ANTERIORMENTE**

4.1 ¿Tuvo usted Leishmania? Si ( ) No ( )

4.2 Si tuvo leishmaniasis, ¿Hace qué tiempo? _____

4.3 ¿Conoce a alguien que tenga ahora Leishmania? Si ( ) No ( )

4.4 ¿Como se llama? _____

4.5 ¿Dónde vive? _____

Sitio de referencia: _____

Firma entrevistado: _____

GRACIAS POR SU COLABORACIÓN

Versión: 18 abril 2018

Anexo 2. Aprobación del protocolo de investigación por el Comité de Investigaciones en Seres Humanos del Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública Dr. Leopoldo Izquieta Pérez

INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIÓN EN SALUD PÚBLICA
Dr. Leopoldo Izquieta Pérez

MINISTERIO DE SALUD PÚBLICA

COMITÉ DE ÉTICA DE INVESTIGACIÓN EN SERES HUMANOS (CEISH) DEL INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIÓN EN SALUD PÚBLICA (INSPI)

Notificación de la revisión del Comité de Ética de Investigación en Seres Humanos (CEISH) del Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública INSPI Dr. Leopoldo Izquieta Pérez

Para: Dr. Luis Morocho Yaguana, MSc.
DOCENTE DE LABORATORIO CLÍNICO
UNIVESRSIDAD NACIONAL DE LOJA

Título del Protocolo: "IDENTIFICACIÓN GENÉTICA DE ESPECIES DE LEISHMANIA EN ZONAS ENDÉMICAS EN LA REGIÓN SUR DEL ECUADOR"

Tipo de estudio: Observacional
Protocolo #: CEISH-INSPI-009
Versión: 3
Fecha de revisión: viernes 22 de junio del 2018
Resolución: APROBADO

Por medio de la presente se certifica que el estudio de investigación, *"IDENTIFICACIÓN GENÉTICA DE ESPECIES DE LEISHMANIA EN ZONAS ENDÉMICAS EN LA REGIÓN SUR DEL ECUADOR"*, fue revisado por el Comité de Ética de Investigación en Seres Humanos (CEISH) del Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública INSPI Dr. Leopoldo Izquieta Pérez.

Los miembros del CEISH del INSPI dictaminan que una vez efectuada la evaluación del protocolo, mediante una reunión ordinara el día jueves 24 de mayo del 2018, donde se emitió *Pendiente de Aprobación,* en la cual se solicitaba incluir una hoja de información al sujeto, donde se explique el proyecto en que consiste – Consentimiento Informado; y así mismo que luego de haber receptado y aprobado todas las modificaciones pertinentes emiten su resolución final de *APROBADO.*

Cabe mencionar que la aprobación emitida mediante este documento comprende el período de duración prevista para la investigación en cuestión. Asimismo se le informa que, todo promotor e investigador está en la obligación de reportar cualquier evento adverso grave (esperado o no esperado) al CEISH del INSPI. En caso de existir, se realizará el seguimiento de los eventos adversos graves con el investigador principal para garantizar la seguridad de los pacientes. Con este fin se podrán solicitar los informes necesarios, en caso de presentarse eventos adversos graves o inesperados.

Avisos importantes:

- No realice modificaciones al protocolo que no son solicitados específicamente en este oficio.
- Si se requieren cambios adicionales, estos deben ser presentados como una enmienda.
- Hasta que todas las aclaraciones que solicita el comité sean clarificadas, las actividades de investigación no podrán iniciarse. Esto incluye la participación de sujetos, recopilación de datos y análisis.

GOBIERNO DE LA REPÚBLICA DEL ECUADOR

Iquique N° 14-285 y Yaguachi
Teléfono: 022568041 - 022552715 - 022565858
http://www.investigacionsalud.gob.ec/

INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIÓN EN SALUD PÚBLICA
Dr. Leopoldo Izquieta Pérez

MINISTERIO DE SALUD PÚBLICA

COMITÉ DE ÉTICA DE INVESTIGACIÓN EN SERES HUMANOS (CEISH) DEL INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIÓN EN SALUD PÚBLICA (INSPI)

El Comité de Ética de Investigación en Seres Humanos (CEISH) del Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública INSPI Dr. Leopoldo Izquieta Pérez, solicita que después de haber obtenido la resolución de Aprobación, el Investigador Principal proporcione el Protocolo final, y un informe de inicio de ejecución del estudio para fines de seguimiento. Adicionalmente, una vez concluida la ejecución del estudio, requiere de la entrega del informe final del mismo.

El CEISH del INSPI informa que los protocolos de estudios observacionales que cumplan con uno o varios de los criterios señalados a continuación, deberán ser aprobados previo a su ejecución, por la Dirección Nacional de Inteligencia de la Salud o Agencia de Regulación, Control y Vigilancia Sanitaria, según corresponda.

- Requieran el uso, importación o exportación de muestras biológicas de cualquier índole o insumos químicos / biológicos que no posean registro sanitario en el país.
- Utilicen financiamiento parcial o total de fondos públicos, incluidos aquellos financiados a través de SENESCYT o INSPI – LIP.
- Involucren sujetos de estudio que pertenecen a poblaciones vulnerables o que se encuentren en situación de vulnerabilidad.
- Cuyo promotor sea una empresa o institución internacional, en cuyo caso deberá contar con una contraparte nacional.
- Cuyo fin sea la definición de política pública en salud.
- Cuando la investigación se desarrolle en 5 o más establecimientos de salud del Ministerio de Salud Pública (MSP).

Por favor enviar el informe de inicio de ejecución del estudio a la oficina del CEISH del INSP en la Coordinación Zonal 9 localizada en la calle Iquique N14-285 y Yaguachi, Sector el Dorado, Quito – Ecuador.

Cualquier pregunta directa, correspondencia y formas (por ejemplo, revisiones de la continuación, modificación, efectos adversos, etc.) diríjalas al CEISH del INSPI-LIP, a la dirección anteriormente especificada. Puede encontrar información adicional en el sitio web del CEISH, http: //www.investigacionsalud.gob.ec/webs/ceish/, o de manera directa su Secretaria Ejecutiva, Ing. Verónica Toaquiza, al teléfono 022552715.

INSPI-LIP
Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública INSPI
Dr. Leopoldo Izquieta Pérez
COMITÉ DE ÉTICA DE INVESTIGACIÓN EN SERES HUMANOS

Cordialmente,

Ana Lucía Ruano Nieto Phd.
Presidente del Comité de Ética de Investigación en Seres Humanos (CEISH) del Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública INSPI Dr. Leopoldo Izquieta Pérez.

25 de junio del 2018
Fecha de Correspondencia

Anexo 3. Consentimiento Informado

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA
Área de la Salud Humana
Carrera de Laboratorio Clínico

Proyecto: Identificación genética de cepas circulantes en zonas endémicas de la Zona 7 de Ecuador

Consentimiento informado para recolección y uso de muestras biológicas

B) Consentimiento Informado (Hoja de firmas):

He recibido una explicación satisfactoria sobre el procedimiento del estudio, su finalidad, riesgos, beneficios y alternativas.

He quedado satisfecho/a con la información recibida, la he comprendido, se me han respondido todas mis dudas y comprendo que mi participación es voluntaria.

Presto mi consentimiento para el procedimiento propuesto y conozco mi derecho a retirarlo cuando lo desee, con la única obligación de informar mi decisión al responsable del estudio.

Nombre: ..... Número de cédula: .....

Firma: ..... Fecha: 01/03/2018

Referencia.
Documento elaborado en base a *Consentimiento informado para recolección, uso y almacenamiento de muestras biológicas y datos personales,* Universidad Austral. Buenos Aires. Argentina. Disponible en:
http://www.austral.edu.ar/cienciasbiomedicas/files/2012/05/CIparausodemuestrasbiologicasfarmacogenetica2.doc

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA
Área de la Salud Humana
Carrera de Laboratorio Clínico

Proyecto: Identificación genética de cepas circulantes en zonas endémicas de la Zona 7 de Ecuador

Consentimiento informado para recolección y uso de muestras biológicas

B) Consentimiento Informado (Hoja de firmas):

He recibido una explicación satisfactoria sobre el procedimiento del estudio, su finalidad, riesgos, beneficios y alternativas.

He quedado satisfecho/a con la información recibida, la he comprendido, se me han respondido todas mis dudas y comprendo que mi participación es voluntaria.

Presto mi consentimiento para el procedimiento propuesto y conozco mi derecho a retirarlo cuando lo desee, con la única obligación de informar mi decisión al responsable del estudio.

Nombre: ..... Número de cédula: .....

Firma: ..... Fecha: 12/04/2018.....

Referencia.
Documento elaborado en base a *Consentimiento informado para recolección, uso y almacenamiento de muestras biológicas y datos personales,* Universidad Austral. Buenos Aires. Argentina. Disponible en:
http://www.austral.edu.ar/cienciasbiomedicas/files/2012/05/CIparausodemuestrasbiologicasfarmacogenetica2.doc

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA
Área de la Salud Humana
Carrera de Laboratorio Clínico

Proyecto: Identificación genética de cepas circulantes en zonas endémicas de la Zona 7 de Ecuador

Consentimiento informado para recolección y uso de muestras biológicas

B) Consentimiento Informado (Hoja de firmas):

He recibido una explicación satisfactoria sobre el procedimiento del estudio, su finalidad, riesgos, beneficios y alternativas.

He quedado satisfecho/a con la información recibida, la he comprendido, se me han respondido todas mis dudas y comprendo que mi participación es voluntaria.

Presto mi consentimiento para el procedimiento propuesto y conozco mi derecho a retirarlo cuando lo desee, con la única obligación de informar mi decisión al responsable del estudio.

Nombre: [redacted] Número de cédula: [redacted]

Firma: ..... Fecha: 17/04/2018

Referencia.
Documento elaborado en base a *Consentimiento informado para recolección, uso y almacenamiento de muestras biológicas y datos personales*, Universidad Austral. Buenos Aires. Argentina. Disponible en:
http://www.austral.edu.ar/cienciasbiomedicas/files/2012/05/CIparausodemuestrasbiologicasfarmacogenetica2.doc

Anexo 4. Protocolo de toma de muestras por raspado para tinción y microscopia.

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA LABORATORIO DE FITOQUÍMICA	**Toma de muestras por raspado para tinción y microscopía.**	**Código**: PROT-LEISHMANIA	
		Revisión: 01	**Edición:** 01
		Fecha: 01-03-2018	

1. Objetivos

- Aprender a realizar una correcta toma de muestra, especialmente para aquellos pacientes sospechoso de *Leishmania*.
- Desarrollar la habilidad en la identificación de los promastigotes.

2. Alcance

Conocer la morfología de la Leishmania y se emplea para los procedimientos de análisis que se realizan para el diagnóstico de Leishmaniasis presentes en el frotis realizado.

3. Introducción

El examen directo es un método rápido, económico y de fácil realización. Su sensibilidad es de un 85% a 90%, varía de acuerdo con el tiempo de evolución de la lesión (a menor tiempo de evolución mayor sensibilidad) lo ideal es de tres días y de acuerdo con la técnica de la toma y coloración de la muestra. Se recomienda la toma de más de una muestra de una misma lesión, como mínimo tres preparaciones, con tres frotis en cada una, tanto del borde activo como del centro de la úlcera, lo cual aumenta la sensibilidad (META, 2016)

4. Equipos y materiales

- Torundas de algodón.
- Agua destilada.

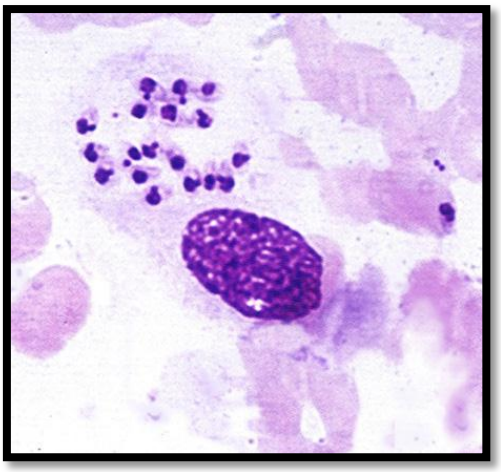
- Gasas estériles
- Lancetas.
- Tres láminas portaobjetos.
- Marcador.
- Elementos de protección personal
- Microscopio
- Colorante GIEMSA

5. Procedimiento

- Lavar la lesión con agua y jabón para eliminar las secreciones; también se puede utilizar una compresa de agua para quitar las costras.
- Elegir los sitios para la toma de muestras (los más prominentes, con bordes vivos)
- Raspar con el palillo o la lanceta por debajo del borde de la lesión de la zona seleccionada
- Extender la escasa muestra cuidadosamente en el portaobjetos haciendo pequeños círculos
- Dejar secar la lámina a temperatura ambiente, luego fijarlas con Metanol.

- Teñir mediante la técnica de GIEMSA.

- Observar al microscopio con el objetivo de inmersión (1OO X), buscando formas parasitarias (amastigotes) iniciando en un extremo y cubriendo toda la muestra en forma de zigzag, por el tiempo mínimo de 30 minutos por muestra.



6. Interpretación de resultados

- El examen es considerado negativo cuando NO se ha observado formas promastigotes en todo el extendido. Es positivo cuando se observan al menos 1 o más promastigotes**.**

Referencia:

Mollinedo, S., Monasterios, H., Magne, M., Vallejos, E., Velarde, J., Chuquimia, G., … Muñoz, B. (2007). *Leishmaniosis Guía Operativa para el control en Bolivia* (Primera). La Paz, Bolivia. Retrieved from www.ops.org.bo/textocompleto/nleis30576.pdf

Redactado por:	Revisado y aprobado:
Dr. Luis Morocho	Dr. Luis Morocho

Anexo 5. Protocolo de toma de muestra de linfa por aspirado y cultivo.

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA LABORATORIO DE FITOQUÍMICA	**Toma de muestra de linfa por aspirado y cultivo.**	**Código**: PROT-LEISHMANIA	
		Revisión: 01	**Edición:** 01
		Fecha: 01-03-2018	

1. Objetivos

- Realizar la toma de muestra apropiada para garantizar el diagnóstico de leishmania.
- Desarrollar la destreza para obtener muestras de buena calidad y lograr la identificación de la especie.

2. Alcance

El material obtenido a partir del aspirado se siembra en medio de cultivo bifásico con base de agar sangre Novy-MacNeal-Nicolle (NNN), el cultivo permitirá identificar la especie, facilitará observar el número mayor de promastigotes móviles; se requiere técnicas de asepsia rigurosa.

3. Introducción

El cultivo de biopsia permite buscar e identificar al patógeno en una muestra de aspirado de linfa. Se utiliza una aguja fina colocada en una jeringa para extraer (aspirar) una pequeña cantidad de tejido o líquido de la región que causa sospecha. La principal ventaja consiste en que no es necesario hacer un corte en la piel, por lo que no se requiere de puntadas y por lo general, no se deja cicatriz.

4. Equipos y materiales

- Jeringuilla de 2-3 ml.

- Solución salina estéril
- Gasas estériles
- Alcohol
- Medios de cultivo
- Marcador.
- Elementos de protección personal

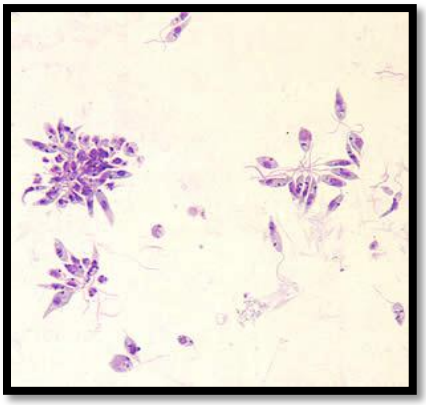
5. Procedimiento

- Lavar la lesión con abundante agua
- Elegir una zona representativa y desinfectar esta con el alcohol al 70%
- Se carga la jeringa de 3 cc con 0,3 ml de solución salina estéril; estando lista la jeringa, se escoge un área decolorada de la pápula o del borde no necrotizado de la úlcera, procediéndose a punzar e inyectar suavemente el contenido de la jeringa
- Inmediatamente se aspira, haciendo girar suavemente la aguja en abanico, la obtención de escasas gotas debe manejarse cuidadosamente tratando de no contaminarlas
- Se procede al sembrado en los tubos de cultivo de medios NNN, Drosophila y RPMI 1640 (éstos últimos suplementados con suero fetal bovino), con la protección del mechero (condiciones asepsia en el campo), una gota por tubo con tapa rosca, a la cual se le añade 0,1 ml de solución salina con antimicrobianos.
- Los tubos sembrados son almacenados en termos sin refrigeración, de tal manera que se conserven a no más de 25 ºC y luego son remitidos al laboratorio de Biotecnología de la Universidad Nacional de Loja.
- Los tubos se cultivan a 25 ºC, revisándolos cada día, en caso de no contar con una estufa de cultivo, se puede mantener los tubos a temperatura ambiente, remitiéndolos

a la brevedad posible al laboratorio. (Prevention, 2016)

6. Interpretación de resultados

- Si se cuenta con microscopio invertido se puede leer los tubos de cultivo diariamente sin temor a contaminarlos en el proceso; si se cuenta con microscopios normales se utiliza la protección del flujo laminar o mechero y con una asa de platino se revisan los tubos cada 48 horas a partir del tercer día (un tubo a la vez por días); se toma una gota (20 -30 uL) del sobrenadante para su observación al microscopio en búsqueda de promastigotes.



- La presencia de formas móviles indica positividad, debiéndose informar detalladamente en la hoja de resultados. (+) Presencia de promastigotes. Los cultivos que permanecen negativos, se los descarta a los 30 días.

Referencia:

Mollinedo, S., Monasterios, H., Magne, M., Vallejos, E., Velarde, J., Chuquimia, G., … Muñoz, B. (2007). *Leishmaniosis Guía Operativa para el control en Bolivia* (Primera). La Paz, Bolivia. Retrieved from www.ops.org.bo/textocompleto/nleis30576.pdf

Redactado por:	Revisado y aprobado:
Dr. Luis Morocho	Dr. Luis Morocho

Anexo 6. Preparación de medios de cultivo NNN/ Schneider

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA LABORATORIO DE ANÁLISIS QUÍMICO	**Protocolo para la preparación de medios de NNN**	**Código: LFQ-P-001** **Revisión:** 6 mayo 2018 / **Edición: V.3** **Fecha:** 4 junio 2018

1. **Objetivo**

- Permitir el crecimiento adecuado del parásito

2. **Alcance**

- Personal encargado, técnico, estudiantes y docentes

3. **Fundamento**

Son una mezcla de nutrientes que, en concentraciones adecuadas y en condiciones físicas óptimas, permiten el crecimiento de los microorganismos.

4. **Materiales y reactivos:**

Material biológico: 20ml sangre de conejo

- Agar base: BHI(Brain-Heart-Infution)
- Gentamicina
- Lámpara de alcohol
- Tubos plásticos cónicos con tapa rosca (estériles)
- Matraz de 100 mL
- Perlas de vidrio
- Agua destilada
- Pipeta serológica

- Pro-pipeta

Equipos:

- Autoclave
- Cámara de bioseguridad
- Estufa
- Balanza analítica

5. Procedimiento

- Realizar la asepsia de nuestras manos
- Colocarse el equipo de bioseguridad (guantes, mascarilla, traje protector, mandil)
- Preparar el material con el que se va a trabajar.
- Pesar la cantidad de 5,2g de agar base que se va a utilizar,
- Disolver el agar pesado en 84 ml de agua destilada y calentar hasta que hierva, se sella y se autoclava por 15 minutos a 121°C.
- Dejar enfriar hasta que se encuentre tibio, colocar 15 ml de sangre de conejo recién extraída, la cual se la desfibrina en un matraz con perlas de vidrio y se inactiva (56°C por 30 minutos).
- Agregamos 100ug/ml de Gentamicina o Estreptomicina, o los dos juntos.
- Mezclar y dispensar en los tubos a medida de 4cm.
- Dejar enfriar los medios para que se solidifiquen inclinados (pico de flauta).

Redactado por:	Revisado y aprobado:
Dr. Luis Morocho	Dr. Luis Morocho

Anexo 7. Registro paciente con lesiones presuntivas de leishmaniasis.

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA

Dirección de investigación
Facultad de la Salud Humana
Carrera de Laboratorio Clínico

Proyecto: Identificación genética de cepas circulantes en zonas endémicas de la Zona 7 de Ecuador
Registro de muestras de paciente con diagnóstico presuntivo de Leishmaniasis: cultivo NNN

Fecha	Unidad de Salud	Código tubo	Nombre y apellidos	Edad	Sexo		Lugar/Origen paciente	Localización herida	Duración herida	Localidad donde adquirió picadura
					M	F				
01/03/2018		001	[redacted]	76		X	Zumbi (Centinela del Cóndor)	Pierna Izquierda	4 meses	Peridomiciliaria
12/04/2018		002	[redacted]	22	X		Zumbi (Centinela del Cóndor)	Cara (mejilla derecha)	3 meses	Agricultor
17/05/2018		003	[redacted]	22	X		Panguintza (centinela del Cóndor)	Pierna Izquierda (parte lateral)	1 mes	Agricultor

Código: A-, aspirado; B-, biopsia; R-, raspado.

Firma Responsable: .....

Vers. 30-mar-2017

Anexo 8. Protocolo de extracción de DNA de leishmania

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA CENTRO DE BIOTECNOLOGÍA UNL	**Protocolo de extracción de ADN**	**Código :** PROT-LEISHMANIA	
		Revisión 01	**Edición** 01
		Fecha 29-06-2018	

1. **Objetivos**

- Realizar la extracción de DNA de leishmania
- Obtener cantidad y calidad de DNA

2. **Alcance**

El material obtenido a partir del frotis de la lesión, permitirá identificar la especie causante de la infección por leishmaniasis.

3. **Introducción**

El ADN o ácido desoxirribonucleico es el material hereditario de todos los organismos. La extracción de ADN es una de las herramientas usadas más precisas de identificación, precisamente es en la cadena de ADN donde se encuentra todo el código genético de un organismo

4. **Materiales**

- Buffer TE
- Buffer de lisis celular
- Buffer de lisis de núcleos
- Proteinasa K
- RNAsa

5. Equipos

- Microcentrifuga

6. Procedimiento

- Los frotis fueron cubiertos con 250 µL de buffer TE [10 mM Tris-HCl, 1mM EDTA (pH 7,6)] durante 5 minutos, y el material biológico es retirado con hojas de bisturí en un tubo Eppendorf de 1,5 mL.
- Se adicionó 900 µ L del Buffer de lisis celular, se mezcló 20 segundos por inversión y fue incubado 10 minutos a temperatura ambiente, luego fue llevado a centrifugación a 14000 rpm por 1,5 minutos en una microcentrifuga.
- Se desechó el sobrenadante y se agregó nuevamente al precipitado 900 µL de Buffer de lisis celular repitiendo el paso anterior de este protocolo.
- Al precipitado se le agregó 400 µL de Buffer de lisis de núcleos y 20 µL de RNAasa, luego fue incubado a 37ºC por 30 minutos.
- Después de la incubación se atemperó los tubos eppendorf por dos minutos y se le agregó 250 µL de Buffer de lisis de proteínas, fue mezclado por inversión y llevado a centrifugación a 14000 rpm por 10 minutos.
- El sobrenadante fue transferido cuidadosamente a un nuevo tubo eppendorf de 1,5 mL previamente etiquetado y se le adicionó 1 mL de etanol absoluto, se mezcló por inversión y fue incubado a menos 20ºC por 1 hora.
- El DNA fue precipitado por centrifugación a 10000 rpm por 15 minutos; el sobrenadante fue descartado, el pellet fue lavado con 1 mL de etanol 97% y se llevó a centrifugación a 14000 rpm por 1,5 minutos.
- El sobrenadante fue descartado y el pellet fue secado por incubación a 60ºC por 20 minutos, transcurrido este tiempo el producto fue resuspendido en 30 µL de buffer TE (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8).

Referencias:

Motazedian, H., Karamian, M., Noyes, H., y Ardehali, S. (2002). Extracción de ADN y amplificación de leishmania a partir de diapositivas teñidas con Giemsa archivadas, para el diagnóstico de la leishmaniasis cutánea mediante PCR. - PubMed - NCBI

Redactado por:	Revisado y aprobado:
Srta. Janeth Ochoa	Dr. Luis Morocho

Anexo 9. Protocolo PCR convencional.

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA CENTRO DE BIOTECNOLOGÍA UNL	**Protocolo para PCR convencional**	**Código** CBT-011	
		Revisión 01	**Edición** 01
		Fecha 18-12-2018	

1. Objetivo

- Optimizar la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para identificar cepas de leishmania en base al gen que codifica la Hsp70.

2. Alcance

- Personal encargado, docentes y estudiantes pertenecientes al Macro-proyecto "Identificación genética de especies de leishmania circulantes en la Zona 7 del Ecuador".

3. Fundamento

Esta PCR se dirige a una región conservada entre todas las especies de Leishmania, el gen SSR rRNA, y se utiliza para la detección directa, sin cultivo previo, del género Leishmania en diferentes tipos de muestras.

4. Materiales

Muestras:

- ADN de *L. braziliensis, L. ecuatoriensis, L. guyanensis, L. major-like, L. mexicana* y *L. naiffi* para controles positivos.
- Control negativo (agua).
- Control del mix (todos los componentes del mix excepto ADN)

Reactivos:

- La mezcla de dNTP.
- Cloruro de magnesio
- 10x tampón de amplificación.
- Taq polimerasa.

Equipos:

- Cabina de bioseguridad.
- Termociclador
- Pipetas

5. Procedimiento

- **Paso 1:** Prepare el mix (MM) como se indica en la siguiente tabla. Vórtice y centrifugue el MM brevemente y dispense la MM en tubos de PCR marcados y previamente refrigerados.

	Concentración Stock	**Concentración requerida**	**1 Muestra**
Buffer de PCR	10X	1X	5ul
Cl2Mg	50Mm	2.5mM	2.5ul
DNTPs	10Mm	0.2mM	1ul
Primer Forward	15Um	0.4uM	1.3ul
Primer Reverse	15Um	0.4uM	1.3ul
Taq DNA polimerasa	5U/ul	1U	0.2ul
DNA	-	-	80ng
Volumen de reacción	-	-	50ul

Sugerencia: Multiplique la cantidad mostrada por el número de muestras que tiene. Preparar siempre el MM para una muestra extra, es decir, si tiene 5 muestras, prepare 6 para que tenga MM en exceso para corregir los errores de pipeteo.

- **Paso 2:** Añadir 80 ng de ADN molde. El volumen de reacción total es de 50 µl, agitar en vórtex y centrifugar la mezcla brevemente.
- **Paso 3:** Preparar controles positivos, negativos y del mix como se indica en la siguiente tabla.

	Muestras Control	**Control Negativo (agua)**	**Control del Mix**
MM	21.3 µl	--	21.3 µl
Muestra de DNA	80 ng	--	--
H20 ultra pura	--	50 µl	23.7 µl

Sugerencia: Cada conjunto de PCR debe siempre incluir controles positivos (para controlar la eficacia de la PCR) y controles negativos (para detectar la contaminación).

- **Paso 4:** Ejecute el siguiente programa del termociclador:

Pasos	**Nro. de ciclos**	**Tiempo**	**Temperatura**
Desnaturalización inicial	1	5min	94°C
Desnaturalización	33	30seg	94°C
Hibridación	33	1min	65°C
Extensión	33	3min	72°C
Extensión final	1	10min	72°C
Infinito	-	-	4°C

- **Paso 5:** Compruebe su producto de PCR en geles de agarosa. Examine el gel por luz UV y fotografíe el gel. Tamaño esperado del producto 1422 pb (Instituto Oswaldo Cruz, 2009)

Referencias

Instituto Oswaldo Cruz. (2009). Manual de Procedimientos moleculares.

Elaborado por	**Revisado por**	**Aceptado por**
Srta.Cristina Manzaba	Dr. Franklin Román	Dr. Luis Morocho

Anexo 10. Protocolo de electroforesis en geles de agarosa normales.

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA CENTRO DE BIOTECNOLOGÍA UNL	**Protocolo para Electroforesis en geles de agarosa normales**	**Código** CBT-012	
		Revisión 01	**Edición** 01
		Fecha 18-12-2018	

1. Objetivo

Separar fragmentos de ácidos nucleicos, ADN y ARN, y detectarlos mediante tinción con Sybr Safe y visualización bajo luz UV. El proceso de separación es facilitado por corriente y basado en el peso molecular y la carga. El medio más comúnmente utilizado en los geles horizontales es la agarosa.

2. Alcance

Personal encargado, docentes y estudiantes pertenecientes al Macro proyecto "Identificación genética de especies de leishmania circulantes en la Zona 7 del Ecuador".

3. Fundamento

Esta PCR se dirige a una región conservada entre todas las especies de Leishmania, el gen Hsp70, y se utiliza para la detección directa, sin cultivo previo, del género Leishmania en diferentes tipos de muestras clínicas.

4. Materiales

Muestras:

- Diferentes muestras de ADN o PCR y estándares de tamaño de ADN (Marcadores de peso molecular).

Reactivos:

- Agarosa
- TBE (Tris-borato-EDTA) tampón (1 X)
- Blue juice.
- Sybr Safe.

Equipos:

- Microondas
- Balanza analítica.
- Pipetas automáticas.
- Cámara electroforética y fuente de alimentación.
- Transiluminador.
- Cámara fotográfica.
- Matraz Erlenmeyer.

5. Procedimiento

- **Paso 1**. Preparar suficiente cantidad de tampón de electroforesis para llenar el tanque de electroforesis y para moldear el gel (TBE 1X).
- **Paso 2.** Pesar la cantidad apropiada de polvo de agarosa (por ejemplo, 2 g para gel de agarosa al 2%) en un matraz Erlenmeyer.
- **Paso 3.** Agregar 100 ml de tampón TBE 1X a temperatura ambiente. El buffer debe ocupar máximo 40% del volumen del matraz.
- **Paso 4.** Tapar ligeramente el cuello del matraz con un tapón.
- **Paso 5.** Calentar el matraz en el microondas hasta verificar la disolución completa de la agarosa, logrando una solución transparente**.**

- **Paso 6:** Añadir 8ul de Sybr Safe al matraz y homogenizar.
- **Paso 7**: Elegir el peine adecuado para formar las ranuras de muestra en el gel. Colocar el peine 0.5-1 mm por encima de la placa para que se forme un pozo completo cuando la agarosa se agrega al molde.
- **Paso 8:** Verter la agarosa enfriada en la bandeja de gel (molde) y esperar 20 minutos hasta que solidifique.

  Sugerencia: el gel debe tener un grosor de entre 3 mm y 5 mm. Verificar que no haya burbujas de aire debajo o entre los dientes del peine.
- **Paso 9:** Retirar las dos reglas de separación de ambos extremos. Monte la bandeja que contiene el gel en el tanque de electroforesis, agregue el tampón de electroforesis suficiente (TBE 1X) para cubrir el gel a una profundidad de 1 mm, y retire cuidadosamente el peine.
- **Paso 10.** Mezcle 8ul de muestra con 2ul de colorante de carga hasta un volumen de 10 µl.
- **Paso 11.** Cargar lentamente la mezcla de muestra en las ranuras del gel sumergido usando una pipeta.
- **Paso 12.** Cerrar la tapa del tanque de gel y acoplar las flexiones eléctricas para que el ADN migre hacia el ánodo positivo (flexión roja). Aplique un voltaje de 80 V (medido como la distancia entre los electrodos positivo y negativo) durante 1 hora o hasta que el tinte azul haya migrado a una distancia adecuada a través del gel.
- **Paso 13** Apagar la corriente eléctrica al final de la corrida y retirar las flexiones y la tapa del tanque.

  Sugerencia: La migración del colorante de carga depende del tipo de agarosa y su concentración, así como del tampón de ejecución utilizado (TBE o TAE).

- **Paso 14:** Examinar el gel y la fotografía bajo luz ultravioleta (Instituto Oswaldo Cruz, 2009).

Referencias

Instituto Oswaldo Cruz. (2009). Manual de Procedimientos moleculares.

Elaborado por	**Revisado por**	**Aceptado por**
Srta.Cristina Manzaba	Dr. Franklin Román	Dr. Luis Morocho

Anexo 11. Resultados de procesamiento de muestras Macrogen Inc.

[MACROGEN] Commented on Result_181031FN-038 Recibidos x

support@macrogen.com vie., 9 nov. 2018 1:08
para ginastefany, mí

inglés > español Traducir mensaje Desactivar para: inglés x

Dear GINA Jaramillo,

Thank you using Macrogen's sequencing service.
Your sequencing results for the order #181031FN-038 have just become available.

User ID : Ginastefany7
Order Number : 181031FN-038
Total Reactions : 6
Completed Reactions : 6

Comment : Result with PCR1,PCR2 and PCR3 has been discarded from our system. Please do not use them when you analyze. Thank you.

Result:
http://dna.macrogen.com/download/admin/access_inv.jsp?invkey=78BF21039C7EA92B03AC9D0EB8BBDA7A&ul=Ginastefany7&oN=181031FN-038&fn=181031FN-038.zip

Nota Aclaratoria: Se enviaron a secuenciar tres muestras, creando una sola cuenta para realizar un solo pedido a nombre de la Srta. Gina Jaramillo con copia a la Sta. Janeth Ochoa.

Anexo 12. Difusión de resultados

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA

FACULTAD DE MEDICINA

CARRERA DE LABORATORIO CLÍNICO

TEMA: Difusión de resultados de Identificación genética de especies de leishmania circulantes en los cantones de Centinela del Cóndor y Nangarizta, de la provincia de Zamora Chinchipe.

FECHA: 14 de febrero del 2019

REGISTRO DE ASISTENCIA: DOCENTES

NOMBRES Y APELLIDOS	CICLO	CÉDULA	FIRMA
Elsa Ramírez Samaniego	IV	1102001193	
María del Cisne Loján	III y V	1103797112	
Glenda [illegible]	I-II-IV	1102055405	
Diana Montaño P	II	1102062051	
Luis Morocho	I	1102507953	
Sandra Fiallo Castillo	II	1103402545	

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA

FACULTAD DE MEDICINA

CARRERA DE LABORATORIO CLÍNICO

TEMA: Difusión de resultados de Identificación genética de especies de leishmania circulantes en los cantones de Centinela del Cóndor y Nangarizta, de la provincia de Zamora Chinchipe.

FECHA: 14 de febrero del 2019

REGISTRO DE ASISTENCIA: ESTUDIANTES

NOMBRES Y APELLIDOS	CICLO	CÉDULA	FIRMA
Dara Thalia Rulova C.	III	1150021507	
Amy Gisella Guamán Q	III	1105851198	
Thalia Lozano Minga	III	1900709591	
Naylea Merino Córdova	III	1150761045	
Geover Ludeña Merino	III	1150010706	
Oscar López Granda	III	1150231821	
Stephany Orellana	III	0750463023	
Kerly Jiménez	III	1900844174	
Maleni Y. Armijos S.	III	1900878602	
Dámaris Harley Quichimbo Armijos	III	1900635832	
Ana Janela Castillo Vélez	III	1105204489	
Cristian Alexander Jumbo Masache	IV "A"	1104136344	
Jennifer Alexandra Riera Yanza	IV "A"	1105699753	
Lisa Stefany Tours Ruiz	IV "A"	1150850063	
María Esther Arreondo Capa	4º "A"	1105456543	
Jessenia Esperanza Muñez Jungo	4to "A"	0922866454	
Jhoselyn Estefanía Beldumo J.	4to "A"	1900746486	
Allison Loretho Ochoa P.	4to "A"	1150352541	

Edita Mariela Hernandez M	4to "A"	1150051447	
Daniel Alejandro Vera G.	4to "A"	1105366254	
Gladys Germania Guamán Lojano	4to "A"	1105130551	
Carmen Lilibeth Macas Jaramillo	4to "A"	1900873520	
Cecilia María Jiménez Jiménez	4to "B"	1105276156	
Daniela Elizabeth Ruiz Ruiz	4to "B"	1105097664	
Leoneta Melissa Saez Maza	4to "B"	1105504854	
Betsaida Corazón Vera Barreo	4to "B"	1600475410	
Jordan Alexander Sánchez Pineda	3ro "A"	1105833238	
Kerly Siomara Poma Soka	3ro "A"	1100886076	
Yulady Lizbeth Cando Canedo	3ro "A"	1150017661	
Johanna Michelle Guaman Gacno	3ro A	1104540938	
Miller Gabriela Ludeña Ordoñez	3ro "A"	1150496071	
Viviana Quezada Ordóñez	Egresada	0705642890	
Yadira Lapo Paredes	Egresada	1150012332	
María José Lalangui	7mo	1150235636	
Gina Jaramillo	Egresada	1105535668	
Cristina Manzaba	Egresada	1900851690	

Anexo 13. Resultados de secuenciación

	Especie identificada	Secuencia
Muestra 2 (1333pb)	*Leishmania* *braziliensis*	ATTGACTCAACATGGCAGAGGCCGGACGATTGCGGGCCTGGAGGTGCTGC GCATCATCAACGAGCCGACGGCCCCTTTTCATCGCGTACGGGCTGGACAA GGGCGACGACGGCAAGGAGCGCAACGTGCTGATCTTCGACCTTGGCGGCG GTACGTTCGATGTGACGCTGCTGACGATCGACGGCGGCATCTTCGAGGTG AAGGCGACGAACGGCGACACCCACCTCGGCGGCGAGGACTTCGACAACCG CCTGGTCACCTTCTTCACCGAGGAGTTCAAGCGCAAGAACAAGGGCAAGG ACCTGTCGTCGAGCCACCGCGCGCTGCGCCGCCTGCGCACCGCGTGCGAG CGCGCGAAGCGCACGCTGTCCGCCGCGACGCAGGCGACGATCGAGATCGA CGCGCTGTTCGACAACGTGGACTTCCAGGCCACGATCACGCGCGCGCGCT TCGAGGAGCTGTGCGGCGACCTGTTCCACAGCACAGGCCACCCCAAGGAG CGCGTGCTGCAGGACGCGAAGATGGACAAGCGCTCCGTGCACGACGTCGT GCTGGTGGGCGGGTCCACGCGCATCCCGAAGGTGCAGAGCCTGGTGTCCG ACTTCTTCGGCGGCAAGGAGCTGAACAAGAGCATCAACCCCGACGAGGCT GTGGCGTACGGCGCGGCGGTGCAGGCGTTCATCCTGACGGGCGGAAAGAG CAAGCAGACGGAGGGCCTGCTGCTGCTGGACGTGACGCCCGCTGACGCTG GGGCATTGAGACGGCCCGGTGGGCGTGGATGACGGGCGCTGAATCAAGCG CCAACACGAACAATCCCCGAACCAAGAAAGAGCCCAGAATCTTTCTCGGA CGTTACGCGGGACAACCCAGCCCCGGGCGTTGCAACATCCCAGGGTGTTA CGAAGGGGCGAAGCGCCGCGAATGAACGAAAGGAACTGCCCACTTCGCCT GGGCCACGTTTCGAACCTGTTCCGGGCATCCCCGCCGGGCGCCCGCCGCG GTGGTGCCCGCCAGAATCGGAGGGTGAACCTTTCGAACCCTGGGACGCCG AAACGGGCATTCCTTGAAACGTTGTCCCGCCGGAAGGAAGAAAGGGGCAC CGGGGCAAAGCCGCCAACCCAGGATTCACCCATTCCCCGAAACCGAACAA AGGGGCCCGTTCTTGAAGCCAAAGGGACCGAACATTCCGAAGCCGCCATT GGGTGGAAACCGAACGCCGTTCCCAAAGTTACCGAAGCCAGGGCCGGAAC AAAGGGAAGCCAACCCGCCGAAAGCCCCCTTTGGGAACCGGCGAAAAGAA AACGGGGGCCTTGGGAAAAAACCTTAACGCCCC

Anexo 14. Certificación de traducción

Dr. Luis Alberto Morocho Yaguana

Docente de la Carrera de laboratorio Clínico de la Universidad Nacional de Loja

CERTIFICA

Haber revisado la traducción al inglés del resumen de la Tesis, titulada **"Identificación genética de especies de leishmania circulantes en los cantones de Centinela del Cóndor y Nangaritza, de la provincia de Zamora Chinchipe"**, el cual es correcto y hace referencia al contenido del citado trabajo.

Loja, 11 de marzo de 2019

Dr. Luis Alberto Morocho Yaguana
Docente de la Carrera de laboratorio Clínico

Anexo 15. Proyecto de tesis

1. TEMA:

IDENTIFICACIÓN GENÉTICA DE CEPAS DE LEISHMANIA

2. PROBLEMÁTICA

La leishmaniasis son enfermedades cutáneas, mucocutáneas y viscerales, causadas por un protozoo parásito del género *Leishmania*, transmitido por la picadura de flebótomos infectados. Hay tres formas principales de leishmaniasis: visceral (la forma más grave de la enfermedad, a menudo conocida como kala-azar), cutánea (la más común) y mucocutánea.

Su epidemiología depende de las características de la especie del parásito, las características ecológicas locales de los lugares donde se transmite, la exposición previa y actual de la población humana al parásito y las pautas de comportamiento humano. Hay unas 70 especies animales, entre ellas el hombre, que son reservorios naturales de *Leishmania* (OMS, 2017).

Es prevalente en más 98 países. Se estiman más de 350 millones de personas en riesgo y 12 millones de casos, con una incidencia anual (estimado) de 0.7–1.2 millones de casos de leishmaniasis cutánea y 0.2–0.4 millones de la forma visceral (Berrueta, 2017).

Existe poco conocimiento acerca de la distribución geográfica del vector y sus reservorios, que de acuerdo a predicciones por el calentamiento global, estas enfermedades vectoriales se incrementarían en el futuro (OMS, 2017).

El mantenimiento en las tasas de infección humana es debido a que el vector se adapta a las nuevas condiciones ecológicas creadas por el hombre y la invasión de éste al ciclo natural de transmisión del parásito.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo general

- Identificar genéticamente las cepas circulantes de leishmania en la Región 7 de Ecuador: Loja, Zamora y El Oro

3.2 Objetivos específicos:

- Buscar de manera activa y realizar el cultivo de casos de leshmania en los cantones de Centinela del Cóndor y Nangaritza pertenecientes a la provincia de Zamora Chinchipe, en número de 100 familias.
- Identificar genéticamente las cepas aisladas en el distrito
- Elaborar un árbol filogenético
- Difundir los resultados obtenidos a los estudiantes de la carrera de laboratorio clínico.

4. JUSTIFICACIÓN

La Leishmania es un organismo diploide organizado en 34-36 cromosomas,en la actualidad se contabilizan 8.272 genes codificantes de proteínas, de los cuales no se conoce su función en aproximadamente la mitad de los mismos. Sin embargo, la disponibilidad de la secuencia de estos genes facilitará en un futuro la búsqueda de factores de virulencia, enzimas clave, vías de regulación y candidatos a vacuna, lo que permitirá conocer en profundidad los mecanismos de acción del parásito y desarrollar métodos de control de las leishmaniosis.

La presente investigación se enfocará en la identificación genética de cepas de leishmania en zonas endémicas del Sur del Ecuador, ya que la incidencia de leishmaniasis ha aumentado con la apertura de nuevas vías, deforestación, urbanización y pobreza, existe una distribución tanto en las provincias de la Costa, Amazonia y algunos valles de provincias Andinas.

Sin embargo, poco se conoce sobre la distribución geográfica del vector y sus reservorios, y por ende la aparición de nuevos casos en áreas consideradas libres de la enfermedad. Así, el presente trabajo de investigación permitirá identificar cepas de Leishmania mediante evaluación genética, obtenidas de la búsqueda activa en el distrito para obtener microorganismos de diversas cepas y elaborar un árbol filogenético , permitiendo observar las relaciones evolutivas entre varias especies u otras entidades que se cree que tienen una ascendencia común y conocer el mecanismo de acción del parasito .

5. MARCO TEÓRICO

5.1. Leishmaniasis

5.1.1. Definición

La leishmaniasis es conocida por varios nombres: en América Central y Sudamérica es conocida como botón doloroso, úlcera del chiclero, úlcera de la playa, tubérculo de los bosques, tubérculo de los arbustos, buba y uta. Es una enfermedad antigua 2000 años antes de Cristo, era conocido como Botón del Nilo (D'Suze, 2012).

5.1.2 Agente Causal

Causada por un parásito perteneciente al género Leishmania que es un protozoo que presenta un flagelo en el insecto por lo que se denomina promastigote, y carece de este al parasitar a los macrófagos de huéspedes vertebrados por lo que recibe el nombre de amastigote. Es un parásito intracelular obligado dimórfico; en los hospederos mamíferos se localiza en macrófagos y células dendríticas (Berrueta, 2017).

Los protozoos causantes de la infección en el hombre pertenecen a la familia Trypanosomatidae y genero Leishmania que tiene numerosas especies con igual morfología pero con diferencias en cuanto a distribución geográfica comportamiento biológico e inmunológico y características clínicas de la enfermedad. En el género Leishmania existen dos subgéneros Leishmania y Viannia cada subgénero comprende varios complejos separados por características bioquímicas y moleculares.

La infección humana se produce por el complejo Leishmania donovani con dos especies L. donovani, L. infantum, también conocida como L. chagasi en el Nuevo Mundo, el complejo L. mexicana con tres especies principales:L. mexicana, L. amazonensis y L. venezuelensis; L. tropica, L. major, L.aethiopica y el subgénero viannia con 4 especies principales: L. braziliensis, L. guayanensis, L. panamensis y L.peruviana (Berrueta, 2017).

5.1.3 Vectores

Los vectores de todas las especies de *Leishmania* son hembras hematófagas de la familia Psychodidae, subfamilia Phlebotominae y de las 500 especies conocidas, solo 31 se identifican como vectores de especies patógenas y 43 como vectores probables,

pertenecientes a los géneros *Phlebotomus* en el Viejo Mundo y *Lutzomyia* en el Nuevo Mundo (Ana Montalvo, 2012).

5.1.4 Morfología

El promastigote (metacíclico), la forma infectiva, elongado, extracelular, se desarrolla y multiplica en el tracto digestivo de los insectos transmisores.Mide 10 - 20 µm, contien un flagelo cuyo tamaño oscila entre 15 - 25 µm; presenta núcleo central, ribosomas, retículo endoplásmico, aparato de Golgi, vesículas y una mitocondria. El cinetoplasto aparece como una banda granular electrodensa dentro de la extensión de la mitocondria, localizado a 1 - 2 µm del extremo anterior del parásito, de donde emerge el flagelo. El axonema que se origina en el cuerpo basal está contenido dentro del bolsillo flagelar.

El amastigote**,** la forma replicativa**,** redondo u oval, intracelular, reside y se multiplica en fagolisosomas dentro de fagocitos mononucleares de los hospederos. Mide 2 - 4 µm, contiene gran núcleo y un cinetoplasto pequeño y un filamento delgado que une cinetoplasto y cuerpo basal. El cinetoplasto es una subestructura de la gran mitocondria, con DNA único y se encuentra asociado estrechamente al bolsillo flagelar y al cuerpo basal del flagelo (Berrueta, 2017).

5.1.5 Manifestaciones clínicas

El período de incubación en los seres humanos es de 2 a 3 meses en promedio, pero puede tener períodos de incubación más cortos (2 semanas) o largos (dos años). Las personas con Leishmaniasis Cutánea tienen una o más lesiones en la piel y las úlceras pueden cambiar de tamaño y apariencia con el tiempo. Las lesiones pueden comenzar como una pápula que evoluciona a nódulo redondeado, indoloro, que aumenta progresivamente de tamaño y se ulcera. Inicialmente las úlceras están cubiertas por una costra y al desprenderse, se observa la úlcera típica de fondo limpio, color rosado y tejido granuloso, redondeada, de bordes regulares y elevados, indolora y de base indurada. En ocasiones las úlceras pueden infectarse secundariamente con otros agentes microbianos.

Cuando la enfermedad compromete el pabellón auricular se pueden producir mutilaciones del mismo. En las lesiones mucosas, el sitio inicial y más frecuentemente afectado es la mucosa del tabique nasal, que puede progresar hasta perforarse. El proceso puede extenderse al paladar y faringe; la úvula se infiltra, se hipertrofia y luego se amputa. Cuando acomete a

la nariz se puede presentar obstrucción, sangrado, secreción nasal y la aparición de costras y heridas. El compromiso de la laringe y la faringe puede ocasionar dolor, ronquera, disfonía y disfagia (OMS, 2017).

5.2 Ciclo biológico

El ciclo biológico tiene lugar en dos tipos de hospedadores: uno invertebrado que comprende numerosas especies de los géneros Phlebotomus en el Viejo Mundo y Lutzomyia en el Nuevo Mundo, y un hospedador vertebrado que incluye una gran variedad de géneros .

Los humanos son hospederos accidentales, cuando se ponen en contacto en el ciclo primario de transmisión animal-vector (zoonosis). El parásito adquiere formas bien diferenciadas, una móvil y flagelada denominada promastigote, en el hospedador invertebrado, y la otra inmóvil, intracelular y no flagelada, denominada amastigote, en el hospedador vertebrado. Cuando el vector (hospedador invertebrado) ingiere sangre del hospedador vertebrado, inocula los promastigotes infectivos, llamados metacíclicos, que penetran en los macrófagos de la piel, vísceras y membranas mucosas donde se transforman en amastigotes.

Los macrófagos cargados de amastigotes pueden volver a ser ingeridos por el vector en el transcurso de una nueva picadura, son lisados y liberan los amastigotes que se transforman en promastigotes en el tracto digestivo del vector. Estos promastigotes sufren transformaciones complejas y dan lugar a formas características aún no bien conocidas, que se conocen con los nombres de formas “paramastigotes”, „haptomonas‟ y “neptomonas‟, para dar lugar a los promastigotes metacíclicos, que son los infectivos para el hospedador (Hernández, 2007).

5.3 Factores de riesgo

5.3.1 Movilidad de la población

Las epidemias de las formas principales de Leishmania se asocian con la migración y el desplazamiento de personas no inmunizadas a zonas donde ya existen ciclos de transmisión. La exposición en el trabajo y el aumento de la deforestación siguen siendo factores importantes.

5.3.2 Cambios ambientales

Los cambios ambientales que pueden influir en la incidencia de leishmaniasis son la urbanización, la integración del ciclo de transmisión en el hábitat humano y la incursión de las explotaciones agrícolas y los asentamientos en las zonas boscosas.

5.3.3 Cambio climático

La leishmaniasis es sensible a las condiciones climáticas, los cambios de temperatura, precipitaciones y humedad pueden tener efectos importantes en los vectores y los reservorios animales, al alterar su distribución e influir en las tasas de supervivencia y el tamaño de la población, pequeñas fluctuaciones en la temperatura pueden tener un acusado efecto en el ciclo de desarrollo de los promastigotes de Leishmania en los flebótomos, y permitir que el parásito se transmita en zonas donde la enfermedad no era previamente endémica (OMS, 2017).

5.4 Tipos de Leismaniasis

5.4.1 Leishmaniasis cutánea localizada (LCL) o úlcera de los chicleros.

El periodo de incubación es variable, desde dos semanas a seis meses o más. La enfermedad comienza casi siempre por una mácula en el sitio de la picadura que dura 1 a 2 días, la mácula evoluciona a pápula, que dura unos 4 días como promedio.

La lesión continúa creciendo y se desarrolla un nódulo, el cual consiste en una masa dérmica que contiene macrófagos vacuolados con abundantes parásitos de Leishmania y un infiltrado linfocitario. Este persiste una o dos semanas, dando como resultado una úlcera indolora, redondeada, de fondo limpio, color rosado, tejido granuloso y bordes indurados. Cuando el parásito es eliminado, por una respuesta inmune efectiva o por acción del tratamiento específico, se inicia la resolución de la lesión, dando lugar la cicatrización.

5.4.2 Leishmaniasis cutánea difusa (LCD).

Se inicia siempre por una pápula en la piel, que después de varios meses se disemina por contigüidad o vía linfática a sitios cercanos de la lesión inicial, para luego difundirse lentamente por las vías linfática o hemática a prácticamente toda la piel del organismo ,donde se desarrolla en forma de nódulos hiperpigmentados o placas, con abundantes parásitos, que son más acentuadas en las salientes óseas. Es una forma

grave y anérgica de la enfermedad que por efecto directo del parásito o por una condición inmunológica subyacente, impide que el hospedero responda en forma adecuada ante la infección.

5.4.3 Leishmaniasis mucocutánea (LMC) o espundia.

El periodo de Incubación va desde una semana a varios meses. Es la extensión a las mucosas de una lesión de Leishmaniasis Cutánea en la cara presentándose en forma simultánea con las lesiones cutáneas iniciales, o por metástasis invaden vía linfática o hemática las mucosas e incluso el cartílago. Esta se presenta varios meses o muchos años después de haber cicatrizado la forma cutánea., las mucosas comúnmente afectadas son: faringe, paladar, laringe y labio superior.

El proceso puede extenderse al paladar en donde produce lesiones infiltrativas en el paladar blando y faringe; la úvula se infiltra, se hipertrofia y luego se amputa. Pese al poder destructivo, las lesiones no suelen ser muy dolorosas pero provoca graves destrucciones y mutilaciones afectando la calidad de vida del paciente ya que interfieren en la fonación y la deglución causando inanición.No evolucionan a la cura espontáneamente. Son resistentes a la terapia convencional y las infecciones bacterianas secundarias son la causa más común de la muerte.

5.4.4 Leishmaniosis visceral (LV) o Kala-azar.

Su periodo de Incubación es de 10 días a 24 meses. Se caracteriza al inicio por fiebre intermitente, malestar general, pérdida de peso, anorexia, molestias en el hipocondrio derecho y pancitopenia, todo lo cual se va acentuando gradualmente. Los signos clínicos habituales son: esplenomegalia indolora a la presión, hepatomegalia moderada y linfadenopatía, palidez de las mucosas y pérdida de peso.

En casos avanzados suele haber oscurecimiento de la piel, caquexia y pelo quebradizo; la presentación de neumonía, diarrea mucosanguinolenta y tuberculosis pulmonar intercurrente, son a menudo causas directas de muerte. Afecta comúnmente a niños (Morelos, 2015).

5.5 Diagnóstico

El diagnóstico por lo general depende de la forma clínica de presentación y de las posibilidades tecnológicas existentes en el servicio médico que recibe al paciente. Una vez que se presenta un paciente con las características clínicas o epidemiológicas que hagan sospechar una leishmaniasis, pueden realizarse una serie de exámenes que se describirán más adelante, en relación con la forma de presentación de la enfermedad (Ana Montalvo, 2012).

5.5.1 Diagnóstico en Laboratorio

5.5.1.1 Método parasitológico

Son métodos específicos y se aplican en todas las formas clínicas de la enfermedad, estos incluyen el examen microscópico de extendidos, raspados, biopsias o aspirados, tomados por lo general del borde de las lesiones y teñidos con Giemsa. También se realiza el examen histopatológico para la búsqueda de amastigotes en distintos tejidos.En la forma visceral la muestra para el examen parasitológico directo se toma del aspirado de bazo, nódulos linfáticos o médula ósea, proceso muy invasivo para el paciente que requiere alta pericia en estos procederes y otras condiciones técnicas.

5.5.1.2 Cultivo

El cultivo de esas mismas muestras biológicas, por lo general en medio bifásico, resulta más informativo, la observación de promastigotes móviles son fácilmente identificables en la fase líquida del medio cultivo, producto de la transformación de los posibles amastigotes presentes en la muestra sembrada, constituye el resultado positivo.

El cultivo microcapilar en medio monofásico, es más promisorio, porque se demostró que la utilización de una mezcla del aspirado de lesión y medio de cultivo a partes iguales, sembrada en pequeños volúmenes de 50 µL en tubos microcapilares no heparinizados, ocasiona un incremento de la sensibilidad y requiere menor tiempo de incubación para obtenerlos resultados.

5.5.1.3 Prueba cutánea de Montenegro

La medición de la respuesta de hipersensibilidad tardía, como manifestación de la respuesta inmune mediada por células, consiste en la inyección de 0,1 mL de antígeno de Leishmania en el antebrazo. Si la induración local que produce tras 2 o 3 d es igual o mayor

que 5 mm, la reacción se considera positiva y la observación de la reacción epidérmica que se genera a consecuencia de la estimulación celular. Se aplica fundamentalmente como método complementario en casos de sospecha de enfermedad cutánea y mucocutánea (Ana Montalvo, 2012).

5.5.1.4 PCR, reacción de la cadena de la polimerasa

La técnica consiste en amplificar una región específica del ADN del parásito mediante el uso de secuencias de oligonucleótidos que funcionan como indicadores para la extensión de las nuevas cadenas de ADN que se amplifican. Es un procedimiento cuya sensibilidad y especificidad es elevada si se utilizan primers apropiados. El material que se utiliza se puede obtener de raspado o aspirado de la lesión, biopsia o sangre total.

5.5.1.5 Inmunofluorescencia indirecta (IFI)

Este método detecta anticuerpos específicos contra Leishmaniasis. La toma de muestra es por medio de recolección de sangre, con posterior separación del suero. Consiste en emplear como antígeno un cultivo de Leishmania mexicana y un conjugado fluoresceinado de anti-IgG humanas. Se llevan a cabo diluciones del suero del sospechoso que se ponen en contacto con el antígeno y el conjugado. Se leen con el microscopio de fluorescencia, todo suero con título 1:4 se considera positivo para Leishmaniasis cutánea y Leishmaniasis mucocutánea y 1:32 para la Leishmaniasis viceral.

5.5.1.6 ELISA

Detecta anticuerpos específicos contra Leishmania en sangre,la lectura de la prueba se hace en un espectrofotómetro. La muestra se considera positiva cuando la densidad óptica es igual o superior a la densidad óptica media de los sueros controles negativos más dos desviaciones estándar. Las pruebas serológicas tienen una sensibilidad del 90-100 % en Leishmaniasis Cutánea Difusa y Leishmaniasis Visceral, mientras que para Leismaniasis Mucocutánea sólo es sensible en un 50-60 %. No se recomienda para Leismaniasis cutánea localizada (Morelos, 2015).

6. METODOLOGÍA

6.1.Tipo de estudio

El tipo de estudio es experimental-descriptivo. El estudio experimental, es un ensayo epidemiológico, analítico, prospectivo, caracterizado por la manipulación artificial del factor de estudio por el investigador y por la aleatorización de los casos. El objetivo de los estudios descriptivos es describir una enfermedad o característica en una/s población/es determinada/s, por lo tanto son útiles para posteriores investigaciones analíticas.

6.2.Universo

El proyecto de investigación se realizara mediante la búsqueda activa de casos de Leishmania en la Zona 7 del Ecuador, que corresponden las provincias de El Oro, Loja y Zamora Chinchipe.

6.3.Muestra

El proyecto de investigación se efectuará en moradores de los cantones de Centinela del Cóndor y Nangaritza de la provincia de Zamora Chinchipe pertenecientes a la Zona 7 del Sur del Ecuador.

6.4.Criterios de inclusión y exclusión

6.4.1. Criterios de inclusión

Pacientes con sintomatología presuntiva de Leishmania.

Casos nuevos de Leishmania.

Casos antiguos con remisión de la enfermedad.

Pacientes que no se encuentran en tratamiento para Leishmania.

Pacientes con microscopia positiva para Leishmania que no estén en tratamiento.

6.4.2. Criterios de exclusión

Pacientes que retiren su consentimiento informado.

Operacionalización de variables

Variables	Definición	Indicador	Escala
Lugar de residencia	Ciudad o localidad	Procedencia de las personas consideradas para la investigación.	Urbano Rural
Ocupación	Actividad o trabajo que ejerce una persona.	Actividad laboral.	Campesino Agricultor Otro
Ubicación de las lesiones	Sitio anatómico en que se detecta la lesión.	Lugar en que se encuentran las lesiones a través del examen físico.	Cara, Cuello, Tórax, Dorso, Otro.
Leishmaniasis	Infección provocada por el parásito Leishmania transmitido por el mosquito flebótomo.	Titulos/Diluciones séricas	<1/10 (Negativo)

6.5.Materiales y Métodos para alcanzar cada uno de los objetivos específicos.

6.5.1. Metodología para el primer Objetivo

6.5.1.1.Búsqueda activa y realización de cultivos de casos de Leishmania en la zona 7 de Ecuador.

La búsqueda activa está dirigida a localizar casos de lesihmania que no se han reportado al Ministerio de Salud Pública; para ello se extenderá la búsqueda a los 19 distritos de salud de la Zona 7, que comprende:

6 distritos de la provincia de El Oro: (Chilla - El Guabo – Pasaje, Máchala, Atahualpa - Porto Velo – Zaruma, Balsas - Marcabeli – Pinas, Arenillas - Huaquillas - Las Lajas, Santa Rosa).

9 distritos de la provincia de Loja: Loja, Catamayo - Chaguarpamba – Olmedo, Paltas, Célica - Pindal – Puyango, Espindola, Calvas - Gonzanama – Quilanga, Macara -Sozoranga, Saraguro, Zapotillo,

4 distritos de la provincia de Zamora: Yacuambi – Zamora, Centinela Del Cóndor - Nangaritza – Paquisha, Chinchipe – Palanda, El Pangui - Yantzaza

Previo al inicio de la etapa de muestreo, que se realizará con personal médico y estudiantes (tesistas y pasantes) se prevé la capacitación a todo el al personal de salud sobre la actividad de búsqueda activa Institucional y comunitaria, en base al sistema SIVE-Alerta. Una parte fundamental del proceso de captación de casos de leishmania es la socialización del proyecto a la Comunicación de los distritos de la zona 7 a investigar sobre búsqueda activa de casos de Leshmaniasis a través de entrega de trípticos y charlas informativas.

La búsqueda de casos de leishmania se la realizará con los Equipos de Atención Integral de Salud (EAIS): a través de instrumentos propios del sistema de vigilancia SIVE-alerta.La toma de muestra de casos de Leshmaniasis se realizará de acuerdo a protocolos validados y previo consentimiento informado de los pacientes afectados por la enfermedad y que fueron identificados en la búsqueda activa. (**Anexo 1)**

La muestra consistirá de una muestra de raspado (dos placas) y una muestra de aspirado de linfa de los bordes de las úlceras, con ayuda de una pequeña cantidad de solución salina.

a) Toma de muestras por raspado para tinción y microscopía. **(Anexo 2)**

b) Toma de muestra de linfa por aspirado y cultivo**. (Anexo 3)**

6.5.2. Metodología para el segundo objetivo

6.5.2.1. Identificar genéticamente las cepas aisladas en el distrito

Los genes a identificar son HSP7 (C.B Garcia Teles, 2015) de acuerdo al siguiente resumen del procedimiento.

- Obtención de ADN de leishmania Cultivo/ muestras de sangre (Muestras puras para evitar efectos inhibitorios de la PCR)
- Pruebas de PCR
- Obtención de amplicones PCR convencional.

- Secuenciación
- Análisis de secuencias
- Elaboración de árbol filogenético

g) Extracción de ADN de *Leishmania* spp., muestras cultivo.

Para la extracción de ADN de Leishmania spp., se utilizará los cultivos y mediante el Kit de extracción QIAamp DNA mini kit (QIAGEN). Ajustado a una concentración final de 10 ng/µl con el NanoDrop ND-1000 espectofotometro (NanoDrop Technologies). De los que para la reacción de PCR se usarán 5 µl de DNA de cada muestra.

h) Cuantificación y determinación de la pureza de DNA.

Mediante el NanoDrop ND-1000 espectofotometro (NanoDrop Technologies).

i) Pruebas de PCR (PCR; PCR convencional; PCR-hsp70/RFLP)

Para amplificar el gen hsp70 se usará una PCR convencional.Se amplificara un producto de PCR de 1422 pb a partir de las cepas enumeradas usando los cebadores HSP70sen y HSP70ant .

j) Electroforesis en gel de agarosa

Los productos de PCR serán corridos en gel de agarosa al 1,2 - 2% en buffer TBE 1X

k) Análisis de amplificación (fotodocumentador)

Los geles serán visualizados con tinción con Syber Safe y visualizados en luz ultravioleta. Se utilizarán marcadores para alto y bajo peso molecular (50pb y pb).

l) Obtención de amplicones

Las muestras positivas amplicones serán extraídos del gel de agarosa mediante el uso del kit QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN).

6.5.3. Metodología para el tercer objetivo

6.5.3.1.Elaborar un árbol filogenético.

Con las secuencias limpias se procederá a la comparación con la Base de datos GenBank®. Para la construcción de los arboles filogenéticos.

Análisis filogenético basado en el nucleótido Secuencias de la Leishmania ITS1 y ITS2 se realizará basado en la máxima parsimonia usando PHYLIP (PHYLogeny Inference Package),

versión 3.69 (Felsenstein, 2005). Para probar la robustez de la generación del árbol, se realizaáa un análisis bootstrap 10.000 repeticiones. Se incluirán secuencias de ADN recuperadas del GenBank.

6.5.4. Metodología para el cuarto objetivo.

6.5.4.1. Difundir los resultados obtenidos a los estudiantes de la carrera de Laboratorio Clínico.

La difusión de los resultados logrados del proyecto serán difundidos a los estudiantes de la carrera de Laboratorio de la Universidad Nacional de Loja.

7. CRONOGRAMA

Actividades/Meses	Septiembre				Octubre				Noviembre				Diciembre				Enero				Febrero			
Revisión bibliográfica																								
Actividades Administrativas																								
Compra de reactivos y materiales																								
Compra de reactivos y materiales																								
Trabajo de campo																								
Trabajo de laboratorio																								
Redacción de informe final																								
Difusión de resultados																								

8. PRESUPUESTO

Insumos para Biología Molecular		**Cantidad**	**Valor**
Materiales Biología Molecular			
Tubos PCR	0,5 ml estériles fundas x 500 unidades	1	64,00
Tubos PCR	x 0,2 ml estériles fundas x 1000 unidades	1	70,00
Tubos PCR	1,5 ml estériles fundas x 500 unidades	2	65,00
Puntas estériles Axigen	X 1000	1	82,00
Puntas con filtro	1-10 uL estériles fundas x 1000 unidades	2	66,00
Puntas con filtro	20 - 200 uL estériles fundas x 1000 unidades	2	138,00
Puntas con filtro	5 - 50 uL estériles fundas x 1000 unidades	1	70,00
Reactivos para Biología Molecular			
Primer Hsp70 sen	(5'- GACGGTGCCTGCCTACTTCAA 3') vial x 50 nanomoles	2	48,00
Primer Hsp70 ant	(5'-CCGCCCATGCTCTGGTACATC 3' vial x 50 nanomoles	2	48,00
Kit de extracción ADN	QIAamp DNA mini kit (QIAGEN) Kit 250 rex	1	250,00
Master mix	Kit x 50 rxn	2	765,00
Loading Buffer (Blue juice)	3 x 1 ml	1	64,00
TAE	10X 1 L	2	25,00
Agarosa	grado biología molecular. Funda 500 g	1	786,00
Syber Safe	vial x 400 Ul	1	96,00
Marcador Peso Molecular 1 kb	vial x 100 aplicaciones	5	300,00
Primers y Controles positivos Leishmania	*L. (V) guyanensis,*	1	100,00
	L. (V) panamensis y	1	100,00
	L. (V) brasiliensis	1	100,00
	; L. (L.) mexicana,	1	100,00
	L. (L.) amazonensis,	1	100,00
	L. (V) equatoriensis,	1	100,00

	L. (L) major, L. naiffi.	1	100,00
	L. like-mayor	1	100,00
Agua grado biología molecular	500 mL	1	25,00
Multiplex PCR Master mix	200 para 25 uL	1	765,00
Enhancen GC	part 4464265	1	80,00
TAQ polimerasa de alta fidelidad	500 unidades	1	1129,00
Proteinasa K	Caja para 3	1	170,00
Medios para cultivos celulares			
Medio Schneider Drosophila	x 500 mL	1	83,00
Suero fetal bovino	x 500 mL	1	1050,00
Reactivos para Microbiología			
Solución anfotericina B,	frasco 20 mL 250ug/mL	1	33,00
TOTAL			**7039,00**

9. BIBLIOGRAFÍA

Ana Montalvo, J. F. (2012). Diagnóstico de la leishmaniasis: de la observación microscópica del parásito a la detección del ADN. Revista cubana de medicina tropical · August, 25. Obtenido de http://www.bvs.sld.cu/revistas/mtr/v64n2_12/mtr02212.htm

Berrueta, D. T. (Marzo de 2017). Obtenido de Universidad Nacional Autonoma de Mexico : http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/parasitologia/leishmaniosis.html

Bustamante, W. Z. (Septiembre de 2013). EcuadorUniversitario.com. Obtenido de http://ecuadoruniversitario.com/noticias_destacadas/la-leishmaniasis-esta-presente-en-22-de-las-24-provincias-del-ecuador/

C.B Garcia Teles, J. M. (2015). Molecular Characterizacion Of American Cutaneous Leishmaniasis in the tri-border Area of Assis Brasil,Acre State,Brazil. Revista do Institute de Medicina Tropical de Sao Paulo, 6. Obtenido de http://dx.doi.org/10.1590/S0036-46652015000400012

D'Suze, C. (15 de Octubre de 2012). Bitácora Médica. Obtenido de http://bitacoramedica.com/leishmaniasis-generalidades-historicas/

Hernández, C. A. (1 de Octubre de 2007). Biomédica. Obtenido de http://www.redalyc.org/pdf/843/84309902.pdf

Morelos, J. M. (2015). SUBSECRETARÍA DE PREVENCIÓN Y PROMOCIÓN DE LA SALUD. Obtenido de Centro Nacional de Programas Preventivos y Control de Enfermedades: http://www.cenaprece.salud.gob.mx/programas/interior/vectores/descargas/pdf/ManualLeishmaniasis2015.pdf

OMS. (Abril de 2017). Obtenido de Organización Mundial de la Salud: http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/es/

Organización Mundial de la Salud. (1 de Mayo de 2014). Obtenido de OMS: http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=6417%3A

2012-leishmaniasis-cutanea-mucosa&catid=3940%3Anid-content-general&Itemid=39345&lang=es

Prevention, C. C. (9 de Diciembre de 2016). C.D.C Center for Disease Control and Prevention, Leishmaniasis- Resources for Health Professionals. Recuperado el 12 de Junio de 2017, de https://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/health_professionals/

10. ANEXOS

Anexo 1.

- **Consentimiento Informado**

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA
Área de la Salud Humana
Carrera de Laboratorio Clínico

Consentimiento informado para recolección y uso de muestras biológicas

Título del estudio:

Identificación genética de cepas circulantes en zonas endémicas de la Zona 7 de Ecuador

Investigador Principal:

Dr. Luis A. Morocho Yaguana.
Carrea de Laboratorio Clínico-Universidad Nacional de Loja,
Área de la Salud Humana
Teléfono: 07 2571379, est 124, Cel: 0991949639
Mail: luismorocho02@gmail.com, luis.morochoy@unl.edu.ec

A) Hoja de información:

Somos investigadores de la Universidad Nacional de Loja, del Ministerio de Salud y del Instituto de Investigaciones en Salud y le pedimos nos autorice la recolección y uso de una muestra de su herida, con el fin de comprobar la presencia de un parásito llamado leishmania y que causa el llamado “grano malo”.

Su ayuda para nuestra investigación es absolutamente importante pero usted es libre de elegir si participar o no, sin que ello le provoque inconveniente alguno en su atención médica.

Por favor lea toda la información que se le ofrece en este documento y haga todas las preguntas que necesite al investigador que se lo está explicando, antes de tomar una decisión.

1) ¿Por qué se realiza este estudio?

El propósito de esta investigación es identificar al microorganismo que causa el grano malo.

2) ¿Qué pasará si participo de esta investigación?

Luego de que firme este Consentimiento Informado:

Le sacaremos unas 10 gotitas de líquido del borde de su herida usando una jeringuilla pequeña y haremos un raspado de la misma usando un palillo.

3) ¿Qué estudios harán con mis muestras?

El líquido obtenido lo pondremos en un medio especial que permite el crecimiento del parásito que causa el grano malo y con el raspado haremos un diagnósticon con microscopio.

4) ¿Qué riesgos podría tener si participo?

En algunos casos dolor ligero y momentáneo por el pinchazo con una aguja fina.

5) ¿Qué se sabe de este tipo de estudios?

Es tipo de estudio se usa para aislar e identificar el parásito que causa el grano malo.

El grano malo es causado por un parásito microscópico, transmitido por un mosquito llamado arenilla o manta blanca, que no se cura a pesar de usarse medicamentos comunes. La herida crece permanentemente, a veces puede ser indolora y si se localiza en la cara puede ser deformante.

6) ¿Cuánto tiempo me tomará participar en esta parte del estudio?

La toma de muestra no demora más de 1 minuto.

7) ¿Tendré beneficios por participar?

Sí. Mayor probabilidad de identificar la causa de la herida y ayudar al médico en el tratamiento de la misma.

8) ¿Me darán información sobre los resultados del estudio, luego de su finalización?

Los resultados se los hará conocer a través del Centro de Salud donde se tomó la muestra.

9) ¿Qué gastos tendré si participo del estudio?

Ud. no tendrá gasto alguno relacionado a los procedimientos y materiales necesarios para esta investigación.

No se cubrirán otros estudios ni medicamentos que no estén relacionados con la toma de muestra.

10) ¿Qué pasará si sufro algún evento adverso mientras participo en el estudio?

No se espera complicaciones luego de tomar la muestra, excepto el pinchazo con una jeringuilla de aguja muy fina y la molestia del raspado de la herida.

Las muestras serán tomadas por personal médico especializado y en caso de presentarse alguna complicación luego de tomarse la muestra, por favor comuníquese de inmediato con el médico del Centro de Salud donde se tomó la muestra, quien le dirá cómo debe proceder.

Con la firma de este consentimiento informado usted **no renuncia** a ningún derecho establecido en nuestras leyes.

11) ¿Puedo dejar de participar en cualquier momento, aún luego de haber aceptado?

Usted es libre de retirar su consentimiento para participar en la investigación en cualquier momento sin que esto lo perjudique en su atención médica posterior; simplemente deberá notificar al investigador de su decisión.

12) ¿Puedo retirar mi consentimiento para la utilización de muestras biológicas, aún luego de haber aceptado?

Si usted ha dado su autorización para la toma de muestras biológicas, puede cambiar de opinión en cualquier momento. Debe notificar al responsable del estudio sobre su decisión.

13) ¿Cómo mantendrán la confidencialidad de mis muestras?

Sus muestras estarán **codificadas**, o sea tendrán una clave que hace que usted permanezca anónimo.

¿Cómo se almacenarán mis muestras)?

Sus muestras serán utilizadas de inmediato y no se prevé almacenamiento de las mismas.

14) ¿Me pagarán por participar?

No se le pagará por su participación en este estudio.

15) ¿Cómo mantendrán la confidencialidad de mis datos personales? ¿Cómo harán para que mi identidad no sea conocida?

Los datos que lo identifiquen serán tratados en forma confidencial, salvo para quienes estén legalmente autorizados.

En caso de que los resultados de este estudio sean publicados o presentados en congresos médicos, su identidad no será revelada.

El titular de los datos personales (o sea usted) tiene la facultad de ejercer el derecho de acceso a los mismos en forma gratuita.

16) ¿Quiénes tendrán acceso a mis datos personales?

Solo el Investigador Principal y laboratorista tendrán acceso a los resultados de sus estudios; también pueden ser revisados por el personal autorizado del Ministerio de Salud pública (MSP).

17) ¿A quiénes puedo contactar si tengo dudas sobre el estudio y mis derechos como participante en un estudio de investigación?

1) Responsable de la Investigación:
Dr. Luis A. Morocho Yaguana,
Carrera de Laboratorio Clínico,
Universidad Nacional de Loja, Loja, Área de la Salud Humana.
Teléfonos 0991949639, 07 2571379, ext 124.
2) Centro de Salud donde se tomó la muestra.

Gracias por su cooperación

B) Consentimiento Informado (Hoja de firmas):

He recibido una explicación satisfactoria sobre el procedimiento del estudio, su finalidad, riesgos, beneficios y alternativas.

He quedado satisfecho/a con la información recibida, la he comprendido, se me han respondido todas mis dudas y comprendo que mi participación es voluntaria.

Presto mi consentimiento para el procedimiento propuesto y conozco mi derecho a retirarlo cuando lo desee, con la única obligación de informar mi decisión al responsable del estudio.

Nombre: ……....…… Número de cédula: ……..…….

Firma: ……. Fecha: …….

Anexo 2.

- **Toma de muestras por raspado para tinción y microscopía.**

La primera actividad para la identificación de leishmania es la toma de muestras para microscopía y para ello se procede:

- El paciente debe lavarse la lesión con agua y jabón para eliminar las secreciones; también se puede utilizar una compresa de agua para quitar las costras.
- El personal de salud debe elegir los sitios para la toma de muestras (los más prominentes, con bordes vivos)
- Raspar con el palillo o la lanceta por debajo del borde de la lesión de la zona seleccionada
- La escasa muestra se la extiende cuidadosamente en el porta objetos haciendo pequeños círculos.
- Dejar secar la lámina a temperatura ambiente, luego fijarlas con Metanol.
- Teñir mediante la técnica de GIEMSA.
- Observar al microscopio con el objetivo de inmersión (1OO X), buscando formas parasitarias (amastigotes) iniciando en un extremo y cubriendo toda la muestra en forma de zigzag, por el tiempo mínimo de 30 minutos por muestra.

Interpretación de resultados

El examen es considerado negativo cuando NO se ha observado formas amastigotes en todo el extendido (2 láminas por lesión). Es positivo cuando se observan al menos 1 o más amastigotes.

Anexo 3

- **Toma de muestra de linfa por aspirado y cultivo.**

- Lavar la lesión con abundante agua
- Elegir una zona representativa y desinfectar esta con el alcohol al 70%
- Se carga la jeringa de 3 cc con 0,3 ml de solución salina estéril; estando lista la jeringa, se escoge un área decolorada de la pápula o del borde no necrotizado de la úlcera, procediéndose a punzar e inyectar suavemente el contenido de la jeringa
- Inmediatamente se aspira, haciendo girar suavemente la aguja en abanico, la obtención de escasas gotas debe manejarse cuidadosamente tratando de no contaminarlas
- Se procede al sembrado en los tubos de cultivo de medios NNN, Drosophila y RPMI 1640 (éstos últimos suplementados con suero fetal bovino), con la protección del mechero (condiciones asepsia en el campo), una gota por tubo con tapa rosca, a la cual se le añade 0,1 ml de solución salina con antimicrobianos.
- Los tubos sembrados son almacenados en termos sin refrigeración, de tal manera que se conserven a no más de 25 ºC y luego son remitidos al laboratorio de Biotecnología de la Universidad Nacional de Loja.
- Los tubos se cultivan a 25 ºC, revisándolos cada día, en caso de no contar con una estufa de cultivo, se puede mantener los tubos a temperatura ambiente, remitiéndolos a la brevedad posible al laboratorio. (Prevention, 2016)

Lectura e Interpretación de Resultados:

Si se cuenta con microscopio invertido se puede leer los tubos de cultivo diariamente sin temor a contaminarlos en el proceso; si se cuenta con microscopios normales se utiliza la protección del flujo laminar o mechero y con una asa de platino se revisan los tubos cada 48 horas a partir del tercer día (un tubo a la vez por días); se toma una gota (20 -30 uL) del sobrenadante para su observación al microscopio en búsqueda de promastigotes.

La presencia de formas móviles indica positividad, debiéndose informar detalladamente en la hoja de resultados. (+) Presencia de promastigotes.Los cultivos que permanecen negativos, se los descarta a los 30 días.