UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA

FACULTAD DE LA SALUD HUMANA

CARRERA DE LABORATORIO CLÍNICO

TÍTULO

Identificación genética de cepas de *Leishmania.*

MACROPROYECTO:

"Identificación genética de especies de *Leishmania* en zonas endémicas de la Región Sur del Ecuador"

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

AUTORA:

Gina Stefany Jaramillo Balcázar

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 todo el proceso de la elaboración del trabajo investigativo titulado: **"Identificación genética de cepas de *Leishmania*",** de autoría de la Srta. **Gina Stefany Jaramillo Balcázar**, previo a la obtención del título de Licenciada en Laboratorio Clínico, ha sido desarrollada, corregida y orientada bajo mi dirección y en el marco del reglamento del régimen académico de la Universidad Nacional de Loja vigente.

Loja, 19 de Marzo del 2019

Atentamente,

Dr. Luis Alberto Morocho Yaguana, Mg. Sc.

DIRECTOR DE TESIS

AUTORÍA

Yo, **Gina Stefany Jaramillo Balcázar** con **Cl. 1105535668** declaro ser autora del presente trabajo de investigación: "**Identificación genética de cepas d*e Leishmania*"**; 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 de mi tesis en el Repositorio Digital Institucional- Biblioteca Virtual como documento de lectura y consulta.

Autora: Gina Stefany Jaramillo Balcázar

Firma: ……

Cédula: 1105535668

Fecha: Loja, 19 de Marzo del 2019

CARTA DE AUTORIZACIÓN

Yo, **Gina Stefany Jaramillo Balcázar**, autora del trabajo de investigación **"Identificación genética de cepas de *Leishmania*"**, 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 su visibilidad del contenido de la siguiente manera en el Repositorio Digital Institucional:

Los usuarios pueden consultar el contenido de este trabajo de investigación en el RDI, en las redes de información del país y del exterior, con los cuales tenga 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 19 días del mes de marzo del dos mil diecinueve, firma de la autora.

Firma: …….
Autora: Gina Stefany Jaramillo Balcázar
Cedula de identidad: 1105535668
Correo electrónico: ginastefany@hotmail.es
Celular: 0993952987
Dirección: José Picoita y Ramón Pinto

DATOS COMPLEMENTARIOS

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

Tribunal de Grado:

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

Vocal: Lic. Iliana Alicia Delgado, Mg, Sc.

Vocal: Lic. Ivanova del Cisne Zuñiga Román, Mg, Sc.

DEDICATORIA

A Dios:

Por todas las bendiciones que derrama sobre mi vida, sobre todo por las fuerzas que me da día a día para seguir adelante y haber logrado conseguir este sueño tan anhelado.

A mis padres:

Por todo el cariño, apoyo, paciencia y palabras llenas de sabiduría para poder culminar este camino.

A mis abuelitos:

Leonorcita y Enrique por ser unas personas tan comprensivas, tener un consejo para cada momento, una ayuda idónea en mi vida y nunca dejarme sola. Mi abuelita Dorita por ser la estrella más bonita y la que más brilla en el cielo en una noche por más obscura que parezca; mi abuelito Eliberio por ser un hombre ejemplar para su familia.

A mis hermanos:

Por entenderme en cada momento, ser unos excelentes compañeros de aventuras y despejar esos pequeños indicios de estrés con sus locuras.

A mi familia y amigos:

Por todo su afecto y palabras de aliento para poder lograr una meta más en mi vida.

AGRADECIMIENTO

Primeramente, agradezco a Dios por ser mi guía en cada momento de mi vida; a mis padres José Jaramillo y Yoni Balcázar que en cada paso que he venido dando ellos siempre han estado apoyándome y animándome para ver lograr mis sueños y anhelos, aunque no han sido del todo fácil.

A la Universidad Nacional de Loja, carrera de Laboratorio Clínico por permitirme formar parte de su personal estudiantil, estudiar y lograr ser una profesional. De igual manera agradecer a mi Director de tesis, Dr. Luis Alberto Morocho Yaguana que con su conocimiento, apoyo, confianza y paciencia me ayudaron a lograr este sueño con satisfacción.

Finalmente, mis agradecimientos al Dr. Franklin Román, mi familia, amigos y personas que han estado presente durante el desarrollo de mi carrera, les quedo muy agradecida. Seguro vendrán sueños que cumplir y muchas metas que lograr.

¡GRACIAS!

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 de literatura 7
4.1 Leishmaniasis 7
4.1.1 Definición 7
4.1.2 Vector 7
4.1.3 Reservorio.....7
4.2 Formas clínicas de la Leishmaniasis 8
4.2.1 Leishmaniasis Cutánea 8
4.2.2 Leishmaniasis mucocutánea 8
4.2.3 Leishmanisis Visceral.....9
4.3 Agente causal 9
4.3.1 Morfología 9
4.4. Ciclo biológico 10
4.5 Hábitat del vector 11
4.6 Especies.....11
4.6.1 Leishmania (Suprapilarya).....11
4.6.2 Viannia (Perypilaria) 12
4.7 Especies identificadas en Ecuador y en la zona 7 13
4.8 Transmisión. 13
4.8.1 Vectores 13
4.9 Reservorios.....13
4.10 Epidemiología.....13
4.11 Diagnóstico en el laboratorio.....14

4.11.1 Parasitológico. 14
4.11.2 Diagnóstico molecular. 15
4.12 Identificación de especies. 18
4.13 Pruebas inmunológicas 19
4.13.1 Montenegro. 19
4.13.2 Detección de anticuerpos 19
4.14 Otras 20
4.14.1 Diagnóstico molecular 20
4.15 Árbol filogenético 20
4.15.1 Anatomía de un árbol filogenético 21
5. Materiales y métodos 23
5.1 Tipo de estudio 23
5.2 Área de estudio 23
5.3 Universo 23
5.4 Muestra 23
5.5 Técnicas e instrumento de recolección de datos. 23
5.6 Criterios de Inclusión 23
5.7 Criterios de exclusión 23
5.8 Materiales y métodos para cada uno de los objetivos específicos. 24
5.8.1 Metodología para el primer objetivo 24
5.8.2 Metodología para el segundo objetivo 24
5.8.3 Metodología para el tercer objetivo 25
5.8.4 Metodología para el cuarto objetivo 26
6. Resultados 27
6.1 Resultados del primer objetivo. 27
6.2 Resultados del segundo objetivo. 29
6.3 Resultados del tercer objetivo. 32
6.4 Resultados del cuarto Objetivo 32
7. Discusión 33
8. Conclusiones 36
9. Recomendaciones 37
10.Bibliografía 38
11.Anexos 44

Anexo Nº 1: Aprobación por el comité de bioética del INSPI 44
Anexo Nº 2: Entrevista 46
Anexo Nº 3: Consentimiento informado 48
Anexo Nº 4: Hoja de registro de muestras de pacientes con diagnóstico presuntivo de Leishmaniasis. 55
Anexo Nº 5: Protocolo para la toma de muestras por raspado para tinción y microscopía. 56
Anexo Nº 6: Protocolo para la toma de muestra de linfa por aspirado y cultivo. 59
Anexo Nº 7: Protocolo para preparación de medios de cultivo NNN. 62
Anexo Nº 8: Protocolo de extracción de ADN. 64
Anexo Nº 9: Protocolo de extracción ADN de placa teñidas con Giemsa 66
Anexo Nº 10: Protocolo para PCR convencional. 68
Anexo Nº 11: Protocolo para Electroforesis en geles de agarosa normales. 71
Anexo Nº 12: Resultados de secuenciación. 74
Anexo Nº 13: Difusión de resultados. 76
Anexo Nº 14: Registro de asistencia a la difusión de resultados. 77
Anexo Nº 15: Certificado de traducción. 81

1. Título

Identificación genética de cepas de *Leishmania*.

2. Resumen

La Leishmaniasis es una enfermedad cutánea, mucocutánea y visceral, causada por un protozoario del género *Leishmania*. Los datos del Ministerio de Salud Pública del Ecuador (MSP) y un estudio realizado por Kato et al., 2016 informan la presencia de estas especies: *L. amazonensis L. equatoriensis L. mexicana L. naiffi*, *L. panamensis*, *L. guyanensis*, *L. braziliensis*, *L. lainsoni* a nivel del país y en la provincia de Zamora Chinchipe únicamente de *L. braziliensis.* Se propuso realizar los siguientes objetivos: Búsqueda activa de casos de leishmaniasis en los cantones Palanda y Chinchipe, de la provincia de Zamora Chinchipe, obteniendo muestras para diagnóstico por microscopía y cultivo de los posibles casos para realizar la identificación genética de la especie en base al gen que codifica la hsp70; elaborar un árbol filogenético y socializar los resultados a los estudiantes de la Carrera de Laboratorio Clínico. Se entrevistó a 101 familias que permitió la localización de dos posibles casos, de los cuales se obtuvieron dos muestras, uno de las cuales fue positiva por microscopía y negativa en cultivo y la otra fue negativa en microscopía, pero positiva en cultivo. De las muestras positivas se obtuvo el ADN y se amplificó el gen que codifica a la proteína hsp70 por PCR. La secuenciación de los amplicones permitió identificar las dos muestras como pertenecientes a *L naiffi*, con un 99% de identidad; luego se elaboró un árbol filogenético para compararla con otras especies y, finalmente, se realizó la difusión de los resultados a los estudiantes y docentes de la carrera de Laboratorio Clínico.

Palabras claves: *Leishmania naiffi*, PCR convencional, proteína hsp70, Leishmaniasis.

Abstract

Leishmaniasis is a skin disease, mucocutaneous and visceral, caused by a protozoan of the genus Leishmania. Data from the Ministry of Public Health of Ecuador (MSP) and a study by Kato et al., 2016 report the presence of these species: *L. amazonensis L. equatoriensis L. mexicana L. naiffi, L. panamensis, L. guyanensis, L. braziliensis, L. lainsoni* at the level of the country and in the province of Zamora Chinchipe only of L. braziliensis. The project was proposed to carry out the active search of cases of leishmaniasis in the cantons Palanda and Chinchipe of the province of Zamora Chinchipe, obtaining samples for diagnosis by microscopy and by culture of the possible cases to carry out the genetic identification of the species based on the gene that codifies the hsp70, elaborate a phylogenetic tree and socialize the results to the students of the Clinical Laboratory Career. We interviewed 101 families that allowed the location of two possible cases and from which two samples were obtained, one of which was positive by microscopy and negative in culture and the other was negative in microscopy but positive in culture. DNA was obtained from the positive samples, the gene coding for the hsp70 protein was amplified by PCR and sequenced. The sequencing of the amplicons allowed identifying the two samples as belonging to *L. naiffi*, with 99% identity; then a phylogenetic tree was elaborated to compare it with other species and, finally, the socialization of the results was made to the students and teachers of the Clinical Laboratory career.

Keywords: *Leishmania naiffi*, conventional PCR, hsp70 protein, Leishmaniasis.

3. Introducción

La Leishmaniasis es una parasitosis de distribución mundial, causada por especies del género *Leishmania*, transmitida por la picadura de las hembras de los mosquitos del género *Phlebotomus* en el Viejo Mundo y *Lutzomyia* en el Nuevo Mundo (Uribarren, 2017).

El género *Leishmania* se divide en dos subgéneros; *Leishmania (L) y Viannia* (*V*) de acuerdo con el lugar de desarrollo en el intestino del vector. *Leishmania* se localiza en el área suprapilórica (próxima a la probóscide) y *Viannia* se encuentra en el intestino medio y posterior (Becerril, 2014)

El ciclo vital de *Leishmania* spp. se desarrolla entre animales silvestres, vector, y el ser humano, causando un amplio espectro de enfermedades en el hombre, las cuales varían desde la forma visceral, cutánea o mucocutánea. Estas manifestaciones dependen no solamente al estado inmunológico del paciente sino también a especies del parásito (Chena et al., 2012).

La evolución de la enfermedad y su forma clínica están relacionadas con la especie de *Leishmania*, su identificación es un factor preciso en las etapas de diagnóstico, tratamiento y manejo epidemiológico (Montalvo A. , Fraga, Monzote, García, & Fonseca, 2012). Para el diagnóstico de Leishmaniasis se realiza un examen microscópico, histopatológico, cultivo de aspirados, biopsia, prueba cutánea de Montenegro, detección de anticuerpos (IFI, ELISA, rK39, electroinmunotransferencia), detección de anticuerpos por ensayo de aglutinación directa (DAT) (Montalvo et al., 2012).

En Ecuador, la Leishmaniasis es un importante problema de salud pública reportado en 21 de las 24 provincias del país, se han identificado nueve especies como agentes causantes de Leishmaniasis cutánea humana (CL) y Leishmaniasis mucocutánea (MCL*)*,

Leishmania (Leishmania) mexicana, L. (L.) amazonensis, L. (L.) major-like, L. (Viannia) guyanensis, L. (V.) panamensis, L. (V.) braziliensis, L. (V.) naiffi, y L. (V.) lainsoni, Leishmania shawi. Especies de parásitos causantes de CL se han identificado como *L. (V.) guyanensis, L. (V.) panamensis, L. (V.) braziliensis, y L. (L.) amazonensis* en zonas de la costa del pacifico, *L. (L.) mexicana y L. (L.) major-like en áreas del altiplano andino, y L. (V.) guyanensis, L. (V.) braziliensis, L. (V.) naiffi, y L. (V). lainsoni* en áreas amazónicas (Kato et al., 2016).

Existen pocos estudios realizados sobre la identificación de especies de *Leishmania* circulantes en la zona, por ejemplo, un estudio realizado por Kato et al., 2016 demuestra la presencia de *L. brasilienses,* comprobando la existencia en un estudio publicado anteriormente por Calvopiña, Armijos, & Hashiguchi, 2004.

La presente investigación se ejecutó como parte del Macroproyecto titulado: "Identificación genética de especies de *Leishmania* circulantes en la Zona 7 de Ecuador"; es de suma importancia generar una identificación adecuada de especies de *Leishmania* empleando la técnica de PCR desde muestras clínicas, con resultados que contribuyan a predecir la intensidad de la infección y la tasa de riesgo de expansión de la enfermedad, en las áreas endémicas de la provincia de Zamora Chinchipe, para reducir notablemente el riesgo de efectos adversos graves, así como la duración del tratamiento, especialmente en niños. Planteándose como objetivos identificar genéticamente las cepas de *Leishmania* usando la proteína hsp70, una de las dianas más utilizadas por su alta sensibilidad y especificidad en la amplificación del parásito. La identificación se realizó mediante PCR convencional; empleando primers específicos; Buscar de manera activa y realizar el cultivo de casos de *Leishmania* en el Distrito 07 de un Nº de 101 familias, a través de entrevistas; Identificar genéticamente las cepas aisladas en los cantones de Palanda y Chinchipe, usando la técnica de PCR para la amplificación de *Leishmania*, secuenciación

del amplicón e identificación de la cepa a través del programa BLAST; elaborar un árbol filogenético de las cepas identificadas, usando el programa MEGA versión 6.0, de las diferentes especies de *Leishmania* disponible en el GenBank, comparándolas con la especie resultante *L. naiffi* y finalmente se realizó la difusión de los resultados a docentes y estudiantes de la carrera de Laboratorio Clínico.

4. Revisión de literatura

4.1 Leishmaniasis

4.1.1 Definición. Enfermedad de piel, mucosas o vísceras causadas por protozoarios unicelulares del género Leishmania, transmitido al hombre mediante la picadura de dípteros de los géneros *Phlebotomus* y *Lutzomyia* (Cárdenas Alegría et al., 2012).

4.1.2 Vector. Son pequeñas moscas de 2 a 5 mm de longitud, que habitan sobre todo en las zonas boscosas y se caracterizan por tener el cuerpo cubierto de pelos color cenizo, patas largas y alas blanquecinas terminadas en punta siempre erectas (Caballero, 2017), conocidos como el único vector en la transmisión de la Leishmaniasis a través de la picadura de los flebótomos hembras (Traviezo, 2012).

El vector tiene que ser: antropofílico, (picar al ser humano); ezoofílico, (picar a animales domésticos y silvestres); se le debe encontrar infectado naturalmente con la misma especie de *Leishmania* encontrada en el hospedero; favorecer el desarrollo del parásito en su tubo digestivo y ser capaz de transmitirlo al hospedero por picadura (Zorrilla, Vásquez, Espada, & Ramírez, 2017).

En Ecuador, a la *Lutzomyia* se la conoce con el nombre de 'manta blanca'. Puede encontrarse en áreas desérticas, selva y en áreas peridomiciliarias, sin embargo, prefiere los lugares húmedos oscuros, en los que existe abundante vegetación. Descansa de día, y vuela al atardecer. Las hembras son las únicas hematófagas y más activas a la caída del día. Su forma de vuelo es muy particular, a manera de brincos o saltos y mantiene un vuelo bajo y silencioso (González et al., 2009)

4.1.3 Reservorio. Existen dos fuentes principales: *Leishmania* zoonóticas, en donde los huéspedes son animales salvajes, comensales, roedores, perros, gatos, zorros, chacales, lobos, murciélagos, primates, armadillos y otros animales domésticos se encuentran entre los reservorios para mantener la transmisión de Leishmaniasis en diferentes sitios, y

Leishmania antroponóticas, el hospedador del reservorio es humano (Alemayehu & Alemayehu, 2017).

4.2 Formas clínicas de la Leishmaniasis

4.2.1 Leishmaniasis Cutánea. Es causada por las especies *L. braziliensis, L. guyanensis, L. panamensis y L. peruviana* (Llanes et al., 2015). Inicialmente las úlceras se producen en el punto de la picadura, bordes levantados, indoloros, se puede formar una costra en el centro y de localización frecuente en las partes expuestas del cuerpo (cara, extremidades). El periodo de incubación varía entre una y dos semanas, casualmente varios meses o años (Botero & Restrepo, 2012).

Si hay una infección bacteriana sobre agregada, la úlcera se torna dolorosa, exudativa y purulenta. La piel alrededor de la lesión presenta aspecto y coloración normales. A medida que comienza a prevalecer la respuesta inmune del huésped, la enfermedad tiende a evolucionar hacia la curación espontánea o, se vuelve crónica (Caballero, 2017).

4.2.2 Leishmaniasis mucocutánea. Afecta con frecuencia en la nariz anterior, mucosa del tabique y brota como un nódulo hiperémico de tamaño pequeño y evoluciona rápidamente a una úlcera. El tabique nasal se invade, se perfora y se destruye si no se inicia un tratamiento temprano (Freites et al., 2015)

Las especies causantes son: *L. braziliensis, L.guyanensis, L.panamensis* y *L.peruviana.* Se desarrolla luego de desaparecer las lesiones cutáneas y puede manifestarse hasta 20 años después. Estas lesiones se caracterizan por tener escasos parásitos (Becerril, 2014).

Las lesiones se inician principalmente en mucosa nasal, inflamación de la mucosa e hipertrofia vascular, con ulceración posterior que compromete el tabique nasal cartilaginoso.

Los cuadros severos se asocian a dificultad para respirar, deglutir; también se presenta disfonía, afonía e incluso asfixia (Uribarren, 2017).

4.2.3 Leishmanisis Visceral. También conocida como Kala-Azar. El principal reservorio es el perro doméstico. Después de un período de incubación de dos a cuatro meses tras la picadura del flebótomo infectado con cepas del complejo *L. donovani* o *L. infantum* (Viejo Mundo) y *L. chagasi* (Nuevo Mundo) (Caballero, 2017).

Cursa con hepatoesplenomegalia, cuadro febril, anemia, pérdida de peso; es letal en el 100% de los casos sin tratamiento. Los parásitos se encuentran en macrófagos hepáticos (células de Kupffer), esplénico y médula ósea (Becerril, 2014).

La Leishmaniasis dérmica post-kala azar (PKDL) se presenta después de la recuperación en algunos casos de Leishmaniasis visceral, causada por *L. donovani*. Se caracteriza por una erupción máculopapular, macular o nodular alrededor de la boca, que luego se propaga (Uribarren, 2017).

4.3 Agente causal

4.3.1 Morfología. Es un protozoario del género *Leishmania*, que pertenece al reino *Protista*, y a la familia *Trypanosomatidae*.

El género *Leishmania* se divide en dos subgéneros, según su desarrollo en el intestino de los flebótomos*: Leishmania*, en el intestino medio o anterior, y *Viannia*, cuando incluye el intestino posterior, es necesario tomar en cuenta distintas variables: a) Biológicas: morfología, desarrollo, crecimiento; b) Bioquímicas: electroforesis de isoenzimas, análisis de material genético; c)Inmunológicas: reactividad del parásito con anticuerpos monoclonales- biclonales y serotipificación (Almedia, 2016).

Las moléculas más abundantes de la superficie del parásito son: glucoproteína de 63 kDa (gp63), lipofosfoglucano (LPG), glucofosfolípido fijado a la membrana mediante GPI (glucosiifosfatidil-inositol). Ambas moléculas ayudan en el proceso de adaptación del parásito a su complejo ciclo de vida en el insecto vector y su huésped (Becerril, 2014).

El promastigote (metacíclico), forma infectiva. Elongado, extracelular, se desarrolla y multiplica en el tracto digestivo de los insectos transmisores, pertenecientes al género *Lutzomyia* en América y *Phlebotomus* en el Viejo Mundo. Mide 10 - 20 µm, sin contar la longitud de un único flagelo, cuyo tamaño oscila entre 15 - 25 µm; presenta un gran 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 (Uribarren, 2017).

El amastigote, la forma replicativa. Redondo u oval, intracelular, reside y se multiplica en fagolisosomas dentro de fagocitos mononucleares de los hospederos, con tinción Giemsa se aprecian un gran núcleo y un cinetoplasto pequeño, ambos de color púrpura, y un filamento delgado que une cinetoplasto (subestructura de la gran mitocondria, con DNA único y se encuentra asociado estrechamente al bolsillo flagelar y al cuerpo basal del flagelo) y cuerpo basal (apenas un punto visible). La presencia del cinetoplasto da el nombre al grupo de protozoos incluidos en el orden Kinetoplastida (Uribarren, 2017).

4.4. Ciclo biológico

El ciclo biológico de Leishmania 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, ambos pertenecientes a la familia *Psychodidae***,** y un hospedador vertebrado que incluye una gran variedad de géneros (Gómez A. , 2013).

Durante su ciclo de vida, presenta dos estadios: el promastigote, que es la forma infectante flagelada y se desarrolla en el tracto digestivo de la mosca hembra; y el

amastigote, la forma replicativa del parásito, en el cual el flagelo disminuye de tamaño o está ausente (González, Osorio, & Talamás, 2017).

Inicia cuando una hembra del flebótomo parasitada toma sangre para alimentarse e ingiere amastigotes de un huésped vertebrado, a través de probóscide del insecto. La transformación de amastigote a promastigote ocurre dentro de las siguientes 24 a 48 horas dentro del insecto vector. Una vez transformado, el parásito se replica en el intestino y migra a la faringe y al esófago. Cuando esta mosca hembra infectada pica a un nuevo hospedero, inocula entre 10 y 100 promastigotes, estos viven en el interior de los macrófagos y de las células dendríticas del hospedero y en el interior se transforman en amastigotes que se reproducen por fisión binaria. Los macrófagos cargados de amastigotes, son lisados y estos se liberan para colonizar células adyacentes. El vector será infectante en aproximadamente 10 días (Grill & Zurmendi, 2017).

4.5 Hábitat del vector

El hábitat más frecuente lo constituyen madrigueras, cuevas y grietas del terreno, bosques secos tropicales, casas en ruinas, vertederos, alcantarillas, en sótanos mal ventilados, en áreas rurales, clima cálido y humedad alta (Uribarren, 2017).

4.6 Especies

Existen numerosas especies y subespecies, con igual morfología, pero con diferencias en cuanto a distribución geográfica, comportamiento biológico, molecular e inmunológico y características clínicas de la enfermedad. El género *Leishmania* tiene dos subgéneros: *Leishmania* y *Viannia*, cada uno comprende varios complejos separados (Botero & Restrepo, 2012).

4.6.1 *Leishmania* (*Suprapilarya*)

Género: *Leishmania*

Subgénero: *Leishmania*

Complejo: *L. donovani*

Especies*:* *L. donovani*

L. infantum

L. chagasi

Complejo*:* *L. tropica*

Especies*:* *L. tropica*

L. major

L. aethiopica

L. killicki

Complejo*:* *L. mexicana*

Especies*:* *L. mexicana*

L. amazonensis

L. garnhami

L. pifanoi

L. venezuelensis

4.6.2 *Viannia* (*Perypilaria*)

Género: *Leishmania*

Subgénero: *Viannia*

Complejo*:* *L. braziliensis*

Especies*:* *L. braziliensis*

L. guyanensis

L. panamensis

L. peruviana

L. lainsoni

L. shawi

L. naiffi

L. colombiensis

L. equatorensis. (Botero & Restrepo, 2012).

4.7 Especies identificadas en Ecuador y en la zona 7

Ecuador: *L. amazonensis L. equatorensis L. mexicana L. naiffi, L. panamensis, L. guyanensis, L. braziliensis, L. lainsoni,* (OPS/OMS, 2018; Kato et al., 2016).

Zona 7: *L. guyanensis,* • *Leishmania braziliensis* (Kato et al., 2016).

4.8 Transmisión

4.8.1. Vectores. En Europa, Asia y África el principal vector es del género *Phlebotomus*, a diferencia del continente americano donde el género *Lutzomya* predomina, mientras que a nivel nacional las moscas hembras del género *Lutzomya*: *L. flaviscutellata, L. ayacuchensi, L. hartmanni, L. tortuta, L. trapidoi, L. cruciata* son los principales vectores, al igual que en la zona 7 el género *Lutzomya* prevalece en esta región como principal vector transmisor del parásito (Zorrilla, Vásquez, Espada, & Ramírez, 2017).

4.9 Reservorios

Son aquellos que sirven como fuente de infección para los vectores del foco endémico y llega al ser humano. Dentro de los reservorios se encuentran los mamíferos silvestres como roedores y cánidos salvajes, en cuanto a la especie más importante de la epidemiología de esta enfermedad, se considerada dentro de los animales domésticos al perro (Dawit, Girma, & Simenew, 2013). De igual manera en Ecuador y en la Zona 7 existen reservorios domésticos y silvestres como oso hormiguero, conejo del monte, armadillo, rata, puerco espín, guatusa y el hombre y en algunos casos el hombre (Almedia, 2016; Dawit et al., 2013).

4.10 Epidemiología

Se estima que cada año se producen en el mundo entre 50 000 y 90 000 nuevos casos de leishmaniasis visceral, entre 600 000 y 1 millón de casos nuevos de leishmaniasis cutánea (OPS/OMS, 2018). En Ecuador según la Dirección Nacional de Vigilancia_MSP, en el año 2017 se reportó un caso en Manabí un total de 1668 casos; de los cuales en la costa

existe un reporte de 988 casos, en la sierra 236 casos y en el oriente 421 casos (Granda, 2018).

En el año 2017 en la Zona 7, se reportó un total de 247 casos, de los cuales pertenecían: 228 casos a la provincia de El Oro, 19 casos a Loja y en Zamora Chinchipe no hubo la presencia de estos casos; en relación al año anterior (2016) existe un incremento de casos, El Oro 12 casos, Loja 6 casos y Zamora Chinchipe 14 casos (Granda, 2018).

4.11 Diagnóstico en el laboratorio

4.11.1 Parasitológico.

4.11.1.1.Microscopia. Consiste en el examen microscópico de frotis de exudado de la lesión o de la extensión tras punción-aspiración con aguja fina de la misma, para comprobar la existencia de amastigotes. La tinción con Giemsa del frotis permite observar los amastigotes dentro o fuera de los macrófagos como cuerpos redondeados u ovales, de color azul claro, con un núcleo y un quinetoplasto puntiforme, ambos de color púrpura, en el interior de su citoplasma (Montalvo et al., 2012), la sensibilidad es de 86% y la especificidad del 100% aproximadamente (Gómez, Battistini, & Roe, 2016)

4.11.1.2 Biopsia. La tinción con Giemsa se utiliza para teñir el aspirado de las biopsias obtenidas de pacientes que presentan sospecha de leishmaniosis en sus diferentes formas clínicas (leishmaniosis cutánea localizada (LCL), leishmaniosis visceral (LV), leishmaniosis mucocutánea (LMC) y leishmaniosis cutánea diseminada (LCD). Esta técnica es considerada como la de mayor eficacia y confiabilidad ya que se observan directamente a los amastigotes causantes de la enfermedad (Rojas et al., 2010), permiten detectar el ADN presente en una biopsia aún en cantidades mínimas lo que es igual, hasta un solo parásito, esta técnica ha demostrado ser la más sensible y específica (Montalvo et al., 2012).

4.11.1.3 Cultivo. El cultivo de muestras biológicas, por lo general en medio bifásico Novy, Mc Neal, Nicolle (NNN); facilita la identificación y caracterización de especies por métodos isoenzimáticos o moleculares, pero demanda de mayores condiciones técnicas y necesita tiempo para ofrecer el resultado. La observación de promastigotes móviles en la fase líquida del medio cultivo, producto de la transformación de los posibles amastigotes presentes en la muestra sembrada, constituye el resultado positivo (Montalvo et al., 2012), con una sensibilidad de 72% y especificidad del 100% (Gómez et al., 2016).

Una reciente modificación el cultivo microcapilar en medio monofásico, parece más prometedor, 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 a un incremento de la sensibilidad y requiere menor tiempo de incubación para obtener los resultados, lo que implica un avance en términos de costo y tiempo (Montalvo et al., 2012).

4.11.2 Diagnóstico molecular.

4.11.2.1 PCR. Es una técnica que sintetiza muchas veces un fragmento de ADN utilizando una polimerasa que puede trabajar a temperaturas muy elevadas, ya que proviene de la bacteria *Thermus aquaticus* que vive a altas temperaturas (79ºC a 85ºC), de ahí su nombre comercial más conocido: taq polimerasa; cuando se hace una reacción de PCR se representa lo que sucede en una célula cuando se sintetiza el ADN y en el tubo se mezclan todos los ingredientes necesarios para hacerlo: la polimerasa, el ADN del organismo que se pretende estudiar, donde se encuentra el fragmento que se quiere sintetizar, los oligonucleótidos (llamados también primers, iniciadores, cebadores, “oligos”, etc.) necesarios para que se inicie la transcripción, dinucleótidos (dNTPs), y las condiciones para que la enzima trabaje adecuadamente (cierto pH, determinadas cantidades

de magnesio en forma de MgCl2 , KCl, y pueden necesitarse otras sales o reactivos, dependiendo de cada polimerasa) (Espinoza, 2007).

Es un método de diagnóstico de mayor sensibilidad (entre el 92-98%, con una especificidad del 100%) que la microscopía convencional en la detección de parásitos; es una amplificación in vitro del ADN, de un gen o un fragmento de ADN, o indirectamente de un ARN. El requisito imprescindible es conocer la secuencia de la región de ADN (o ARN) de interés para amplificar. La reacción se puede llevar a cabo con ADN total extraído de muestras biológicas y solo se amplifica la región blanco del ADN de Leishmania que se desea, gracias a la especificidad de los cebadores (Gómez A. , 2013).

Los componentes se describen a continuación (Pérez, 2012)

ADN molde: a partir del cual queremos obtener una copia de un fragmento, es decir, el DNA que queremos amplificar.

Consiste en la lisis celular, luego separar las moléculas de ADN del resto de constituyentes, por el método de extracción de ADN por digestión, añadiendo proteínas, ARNasas para lograr un ADN de calidad (Motazedien et al., 2002)

Enzima DNA Polimerasa: Es encargada de la adición de nucleótidos en sentido 5’-3’, catalizando un ataque nucleofílico del átomo de fósforo del desoxirribonucleótido (dNTP) al terminal 3’ OH del primer, dando lugar a la unión covalente fosfodiester entre ambos, permitiendo la elongación de la cadena complementaria a la cadena molde en la reacción.

Cebadores, primers o iniciadores: Se debe seleccionar dos primers que hibriden regiones del DNA molde, y que estén localizados a los extremos de la región de interés y que sean “únicos” para obtención el fragmento deseado. La longitud del oligonucleótido debe ser de 15 a 30 nucleótidos. La distancia de los primers en la secuencia es variable, sin embargo, la experiencia muestra que fragmentos cortos amplifican mejor que fragmentos largos.

Nucleótidos: Las enzimas DNA polimerasas van a crear una cadena complementaria a la cadena molde mediante la incorporación de nucleótidos al extremo 3' libre del cebador que se ha unido a la cadena molde. Los nucleótidos se añaden en forma de desoxirribonucleósidos trifosfato (dNTPs).

Cloruro de Magnesio: el ion magnesio es un cofactor requerido para la reacción enzimática. La concentración del ion magnesio puede afectar al alineamiento de los primers, producción inespecífica de amplificados y formación de dímeros de primers influyendo sobre la actividad de la DNA polimerasa.

Solución tampón: la solución buffer estándar para la reacción comprende Tris-HCl en concentración 10 a 50 mM: El pH óptimo para la mayoría de las polimerasas termófilas se encuentra entre 8 a 9. La solución incluye una sal, que puede corresponder a un ion de potasio o sodio, para facilitar el correcto alineamiento de los cebadores

El proceso que tiene lugar durante la PCR se puede resumir de la siguiente forma: partiendo de un DNA molde, una enzima polimerasa incorpora nucleótidos complementarios a partir de la zona de doble cadena originada por la unión de los cebadores al molde, los cambios de temperatura constituyen la base para que se completen los pasos necesarios. El proceso se lleva a cabo en tres fases: desnaturalización, hibridación y elongación (Pérez, 2012)

Desnaturalización: En primer lugar, es necesario que el DNA se desnaturalice, es decir, que las dos cadenas de DNA se separen y se lleva a cabo elevando la temperatura a alrededor de 94ºC.

Hibridación: El siguiente paso consiste en un descenso de la temperatura para permitir que los cebadores se unan por complementariedad al DNA molde con temperaturas habituales que oscilan entre 35 y 60ºC.

Elongación o extensión: la enzima polimerasa incorpora nucleótidos complementarios a partir del extremo 3' libre de la región en que han hibridado los cebadores. La temperatura a la que se lleva a cabo esta fase depende de la enzima polimerasa empleada; si se utiliza Taq polimerasa la temperatura de elongación suele ser de 72ºC. Estas tres fases constituyen un ciclo de la PCR, se detecta mediante la iluminación de un gel de agarosa por luz UV (Pérez, 2012).

4.12 Identificación de especies

Para la identificación del género *Leishmanaia,* existen diferentes dianas para la amplificación de las especies.

Dianas utilizables para la identificación (Montalvo et al., 2012).

ITS: Contiene dos regiones no codificadoras variables que se encuentran dentro de las repeticiones altamente conservadas del ADNr, tiene una sensibilidad de 91% y especificidad del 100%.

ADNk: Es una red concatenada de miles de moléculas de ADN (minicírculos y maxicírculos), posse una sensibilidad de 97,1% y especificidad de 92,9%.

Mini-exon: Genes que codifican los miniexones, con una sensibilidad del 89,7% y especificidad del 0%.

Citocromo b: El gen que codifica este citocromo permite la identificación del género *Leishmania* y la diferenciación entre las distintas especies, demostrando una alta sensibilidad y especificidad (Yang, Chen, Chen, Liao, & Hu, 2013).

18S Rrna: Permite únicamente la identificación de *Leishmania* a nivel de género más no especie (Guerbouj, Mkada Driss, & Guizani, 2014), presenta una especificidad del 100% y sensibilidad del 84.6% (Muñoz, 2015).

HSP70: La familia de la proteína de choque térmico 70 (Hsp70) es un grupo de chaperonas implicadas en diversos procesos celulares que incluyen el plegamiento, la

degradación de proteínas y la respuesta al estrés ocasionado por choque térmico, entre otros. La transformación de promastigote a amastigote se acompaña de un incremento de la HSP70 citoplasmática, sin embargo, no es claro si estas proteínas intervienen directamente en el proceso de diferenciación, son de vital importancia para el establecimiento de la infección y progreso del parásito en el nuevo ambiente celular; tiene un efecto anti-apoptótico que protege al parásito frente al tratamiento con antimoniales (Ramírez, Requena, & Puerta, 2011).

El gen de la hsp70 está presente en Leishmania para que este se adapte y sobreviva al cambio de temperatura que sufre cuando se transmite del insecto vector con temperatura alrededor de 22- 28°C al hospedero mamífero con temperatura de 31-37°C (Montalvo et al., 2012).

4.13 Pruebas inmunológicas

4.13.1 Montenegro. Es una prueba de hipersensibilidad celular tardía a antígenos de *Leishmania*, consiste en la inyección en el antebrazo de 0,1 ml de una suspensión de promastigotes fijados en fenol, se evalúa el eritema dentro de 48 o 72 horas es igual o mayor que 5 mm, la reacción se considera positiva y realiza la lectura de la reacción inflamatoria. Se aplica fundamentalmente como método complementario en casos de sospecha de enfermedad cutánea y mucocutánea, en estudios epidemiológico de todas las formas de la enfermedad y en ensayos de vacunas, debido a que no diferencia infecciones pasadas o recientes (Becerril, 2014).

4.13.2 Detección de anticuerpos. Según Montalvo y colaboradores (Montalvo et al., 2012) la prueba de ELISA identifica anticuerpos específicos con valores de sensibilidad comparables (84,6 % y 88,5 %) y una especificidad adecuada (96,2 %), que se recomiendan como pruebas complementarias para el diagnóstico de formas cutáneas causadas por *L. braziliensis, L. guyanensis y L. amazonenses*.

El método de Inmunofluorescencia Indirecta (IFI) mide anticuerpos contra antígenos de *Leishmania* spp., mediante una reacción in vitro, la presencia de estos anticuerpos no significa un caso positivo, es importante tener en cuenta la sintomatología y la posibilidad de reacciones cruzadas. La prueba de Aglutinación Directa (*Direct Aglutination Test* DAT, por sus siglas en inglés) y la Hemoaglutinación Indirecta, tienen una sensibilidad del 87% y especificidad del 90% (Torales et al., 2018).

4.14 Otras.

4.14.1 Diagnóstico molecular. Los métodos moleculares se utilizan ampliamente en el diagnóstico de la Leishmaniasis, porque permiten detectar el ADN presente en una biopsia aún en cantidades mínimas (fentogramos) o hasta un solo parásito, siendo una técnica de alta sensibilidad y especificidad (Montalvo et al., 2012).

Para el diagnóstico, diferenciación e identificación de especies se ha empleado métodos moleculares basados en la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Chena et al., 2012). Varios de estos nuevos métodos son PCR en tiempo real (qPCR), polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP), PCR-miniexón, amplificación aleatoria de ADN polimórfico (RAPD), entre otros (Muñoz, 2015).

4.15 Árbol filogenético

Es una representación esquemática de entidades biológicas que están conectadas por descendencia común, pueden ser especies o grupos taxonómicos mayores, se crean a partir de datos moleculares de ADN, ARN o proteínas. Los métodos para generar árboles filogenéticos se pueden dividir en dos categorías (Mendoza, 2012):

- **Los métodos basados en matrices de distancia**: el método de Unión de Vecinos; genera una matriz de distancia, que se genera al contar las diferencias de nucleótidos entre todos los pares de secuencias. El árbol se elabora al unir las secuencias que posean la menor cantidad de diferencias (menor distancia genética) (Mendoza, 2012).

- **Los basados en datos de caracteres discretos:**

a) Máxima Parsimonia (MP): Genera secuencias ancestrales, que puedan dar origen a las secuencias observadas, y asigna diferentes puntajes a los distintos árboles formados, que es el número de mutaciones que son necesarias para dar origen a las secuencias. El árbol que contenga el menor puntaje, se le conoce como el árbol más parsimonioso, ya que necesita menos cambios para explicar el origen de todas las secuencias (Mendoza, 2012).

b) Máxima Verosimilitud (ML): Explica las relaciones entre las diferentes secuencias con la mayor probabilidad (Mendoza, 2012).

c) Inferencia Bayesiana: Se exploran los posibles árboles, moviéndose de un árbol a otro al cambiar los parámetros del modelo, mientras menor sea el porcentaje de divergencia entre las especies comparadas, mayor similitud tendrán con la raíz (Mendoza, 2012).

4.15.1 Anatomía de un árbol filogenético.

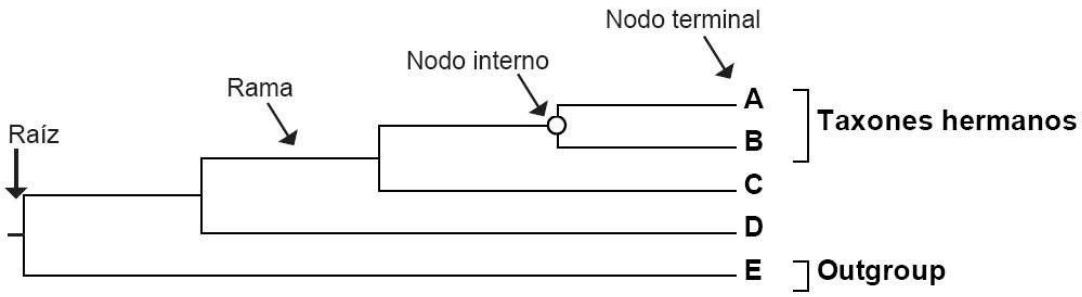

Figura 1. Anatomía de un árbol filogenético.
Tomado de Mendoza, 2012

Puntas o nodos terminales: Organismos de interés que se pretende estudiar.

Nodos internos: Representan los ancestros comunes que comparten dos o más taxones.

Ramas: Unen los nodos internos.

Raíz: Es el ancestro común que comparten todos los taxones (Mendoza, 2012).

El grado de similitud está asociada entre las variables, cuyo valor va desde 0 a 1, si el valor es próximo a 0 significa que las secuencias tienen un alto grado de similitud, es decir comparten un ancestro en común; mientras que valores elevados a 1 indican menor similitud (Franco & Hidalgo, 2003).

5. Materiales y métodos

5.1 Tipo de estudio

El estudio es de tipo experimental y corte transversal

5.2 Área de estudio

El estudio se realizó en los cantones de Palanda y Chinchipe de la provincia de Zamora Chinchipe de la república del Ecuador.

5.3 Universo

El universo estuvo constituido por habitantes de zonas endémicas de los cantones de Palanda y Chinchipe.

5.4 Muestra

El estudio se realizó en 101 familias durante el período julio –noviembre 2018.

5.5 Técnicas e instrumento de recolección de datos.

Para la recolección de datos se aplicó una entrevista a los usuarios participantes en el estudio **(Anexo 2).**

5.6 Criterios de Inclusión

- Pacientes con sintomatología presuntiva de Leishmaniasis.
- Casos antiguos sin remisión de la enfermedad.
- Pacientes que se encuentren en tratamiento para Leishmaniasis.
- Personas que 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

Se implementó un sistema de búsqueda activa para localizar posibles casos de Leishmaniasis en el Distrito 07 en un Nº de 101 familias en la provincia de Zamora Chinchipe en los cantones de Palanda y Chinchipe; proyecto que fue aprobado por el Comité de Ética del Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública Dr. Leopoldo Izquieta Pérez **(Anexo 1)**.

Se realizó una entrevista a las familias **(Anexo 2)**, luego se procedió a la firma del consentimiento informado **(Anexo 3)**, registrando las muestras de cada paciente con diagnostico presuntivo de Leishmaniasis **(Anexo 4).** La toma de muestras se realizó de acuerdo a protocolos validados de toma de muestra por raspado de lesión para tinmción y microscopía **(Anexo 5)**; y toma de muestra de linfa por aspirado de los bordes periféricos y cultivo **(Anexo 6)** en medios NNN **(Anexo 7)**.

5.8.2 Metodología para el segundo objetivo

El gen a identificar es el hsp70 de las muestras que resultaron positivas para *Leishmania* de acuerdo a los siguientes procedimientos:

Extracción de ADN de *Leishmania* spp.

Para la extracción ADN de muestra de cultivo se empleó un kit comercial Pure Link™ Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen®) según el protocolo del fabricante **(Anexo 8).**

En la extracción ADN de frotis de lesión se usó los reactivos del kit comercial Pure Link™ Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen®), aplicando el protocolo descrito por Motazedian, Karamian, Noyes & Ardehali, 2002 con las siguientes modificaciones **(Anexo 9)**: Los frotis se cubrieron con buffer TE y el material biológico se retiró con hojas de bisturí en un tubo eppendorf, se le añadió buffer de lisis celular, se procedió a centrifugar,

a continuación se repitieron los pasos y se fueron añadiendo los diferentes buffer para la obtención de ADN, añadiendo más cantidad de RNAasa para una mejor extracción.

Pruebas de PCR (PCR punto final).

Se amplificó una región de 1422 pb de una región de proteína de choque térmico (hsp70) del citoplasma **(Anexo 10).**

Los cebadores utilizados para la amplificación de este segmento fueron: hsp70sen: 5GACGGTGCCTGCCTACTTCAA) y hsp70ant (CCGCCCATGCTCTGGTACATC) Montalvo et al., 2006).

Electroforesis en gel de agarosa

Los productos de PCR se corrieron en gel de agarosa al 2% **(Anexo 11)** en buffer TBE 1X.

Análisis de amplificación (fotodocumentador)

Los geles fueron visualizados con tinción con Syber Safe y visualizados en luz ultravioleta. Se utilizarán marcadores de alto peso molecular 3 kb (3000pb).

Secuenciación

Los amplicones fueron enviados a secuenciar en un laboratorio Macrogen. Inc. Korea del Sur.

Análisis de secuencias

Los productos de secuenciación fueron sometidos a BLASTN versión 2.8.1, que permitió comprar las secuencias obtenidas con las secuencias que se encuentran en una base de datos (GenBank).

5.8.3 Metodología para el tercer objetivo

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

5.8.4 Metodología para el cuarto objetivo

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

6. Resultados

6.1 Resultados del primer objetivo.

Tabla 1

Ubicación geográfica de las familias expuestas a Leishmania en el cantón Palanda y Chinchipe

Ubicación	Palanda		Chinchipe		Total
	Frecuencia	Porcentaje	Frecuencia	Porcentaje	
Rural	41	40,6 %	60	59,4 %	100 %
Total	**41**	**40,6 %**	**60**	**59,4 %**	**100 %**

Fuente: Encuesta realizada a las familias de los cantones Palanda y Chinchipe
Elaborado por: Gina Stefany Jaramillo Balcázar.

Interpretación

Se aplicó un total de 101 encuestas para obtener información acerca de la exposición a Leishmaniasis o “grano malo” de las cuales 45 (45%) encuestas se aplicaron al sector rural del cantón Palanda; mientras que 55 (55%) encuestas se aplicaron en el sector rural del cantón Chinchipe, en este lugar la mayoría de las familias se encontraban en sus domicilios.

Resultados búsqueda activa

Se localizó dos personas con lesiones posibles para Leishmaniasis, obteniéndose muestras para microscopía y de aspirado de linfa, para el proceso respectivo en la identificación de las especies.

Tabla 2

Casos positivos de Leishmania en las familias expuestas de la provincia de Zamora Chinchipe

Muestra	Cantón	Parroquia	Barrio/sector	Edad	Lugar probable de infección	Numero de lesiones	Ubicación de la lesión
1	Chinchipe	Chito	Jesús del gran poder	8 meses	Peridomiciliario	1	Mejilla derecha
2	Palanda	Palanda	Cahuinal	5 meses	Peridomiciliario	1	Mejilla derecha

Fuente: Encuesta realizada a las familias de los cantones Palanda y Chinchipe
Elaborado por: Gina Stefany Jaramillo Balcázar

Interpretación

Pacientes masculinos de 8 y 5 meses de edad, presentan una lesión, ambos en la mejilla derecha con un grano circular que no sanaba, acuden al centro de salud y sus madres relatan que habían sido picados por un mosquito en su domicilio; les establecen un diagnóstico de Leishmaniasis lo que proceden a darle tratamiento con una dosis de Glucantime®, al momento de obtener las muestras ya se les había administrado 4 dosis; sin embargo se les procede a tomar por raspado y aspirado por linfa para los procedimientos de identificación de la especie de *Leishmania.*

6.2 Resultados del segundo objetivo.

Determinación de la concentración inicial del parásito presente en las muestras obtenidas.

Fueron evaluados 2 frotis y 2 cultivos de lesión provenientes de cada uno de los pacientes identificados en la búsqueda activa, para el diagnóstico de Leishmaniasis. Los resultados encontrados en el cultivo (Muestra 1) se pudo evidenciar la presencia de promastigotes; en el frotis de lesión se observó amastigotes (Muestra 2).

El cultivo de la muestra 2 hubo una contaminación por hongos y en el frotis de la muestra 1 no se observó la presencia de amastigotes, por lo que este análisis no se pudo llevar a cabo.

Extracción de ADN y determinación de la concentración del parásito.

El ADN extraído se cuantificó con un volumen final de 1 µL, se usó como blanco TE (usado para re suspender el DNA extraído). De este modo la concentración del ADN se calcula teniendo en cuenta el valor de la absorbancia obtenido a una longitud de onda de 260 nm. La relación 260/280 es muy estable y se considera que un ADN de pureza óptima tiene un valor entre 1,8 – 2,0 (Orfao, Pinto, Pascual, Aragall, & Pedrosa, 2012) y finalmente se almacenó a -20ºC para su procesamiento.

Tabla 3

Cuantificación y determinación de la pureza de ADN

Identificación	Concentración	Calidad
Muestra 1 (Cultivo)	3,9 ng/µl	2,1
Muestra 2 (Frotis)	93,5 ng/µl	1.02

Fuente: Encuesta realizada a las familias de los cantones Palanda y Chinchipe
Elaborado por: Gina Stefany Jaramillo Balcázar

Interpretación

A pesar de que la calidad del ADN del frotis no fue la aceptable, la pureza obtenida del cultivo fue idónea y se usó para la identificación de especie de *Leishmania.*

PCR y Electroforesis en geles de agarosa

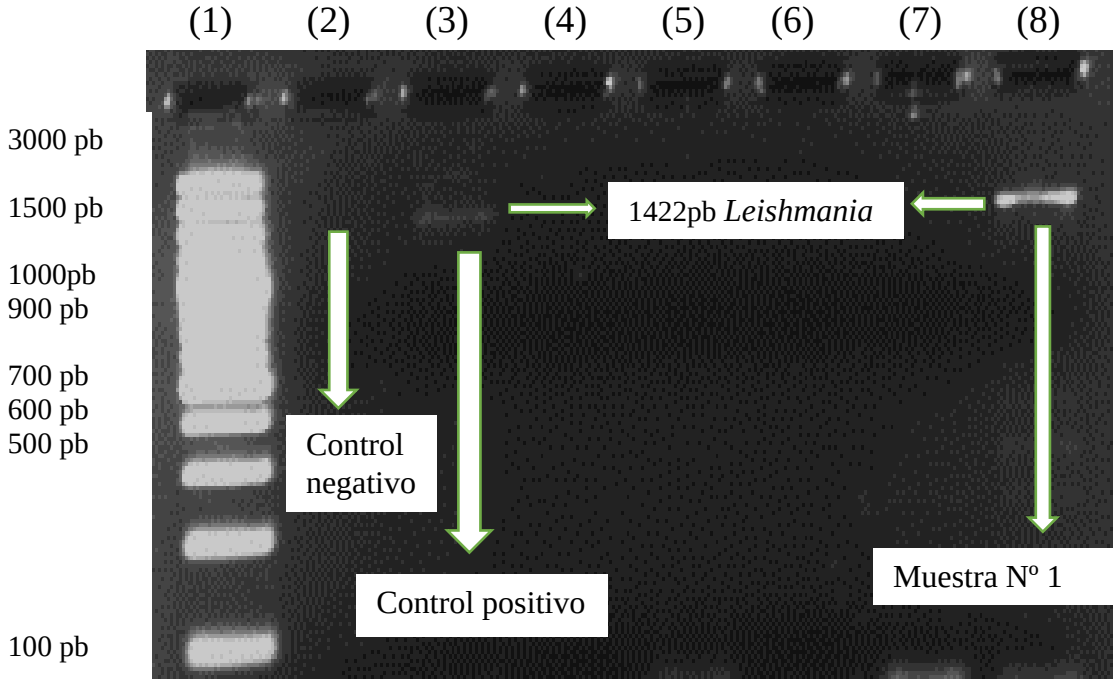

Figura 2. Análisis electroforético de productos de PCR de *Leishmania* en geles de agarosa de los fragmentos obtenidos por PCR, amplificando la proteína hsp70.
Línea 1: Marcador de tamaño de ADN-ladder 100 - 3000 pb.
Línea 2: Control negativo
Línea 3: Control positivo
Línea 8: Muestra aislada de pacientes *L.(V) naiffi*

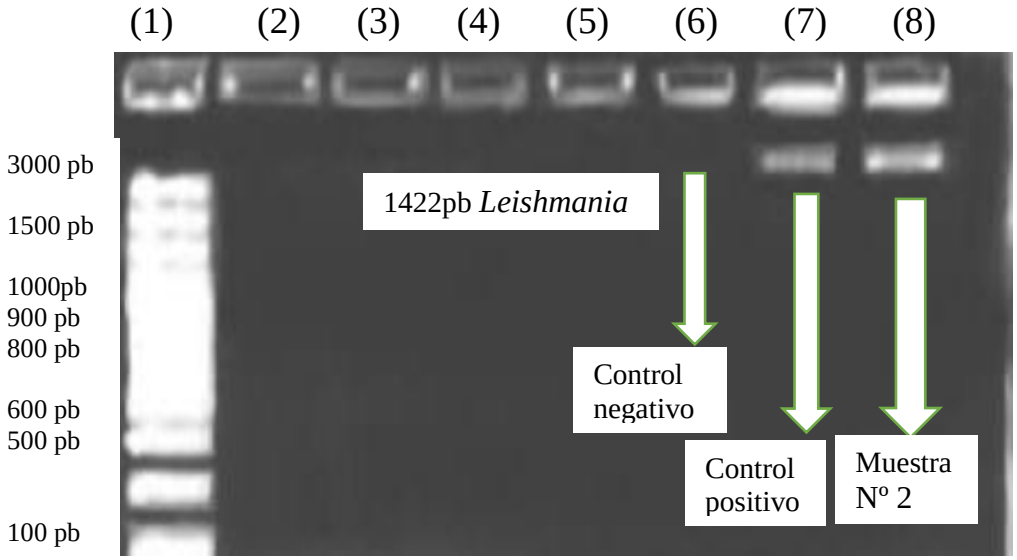

Figura 3. Análisis electroforético de productos de PCR de *Leishmania* en geles de agarosa de los fragmentos obtenidos por PCR, amplificando la proteína hsp70.
Línea 1: Marcador de tamaño de ADN-ladder 100 - 3000 pb.
Línea 6: Control negativo
Línea 7: Control positivo
Línea 8: Muestra aislada de paciente *L.(V) naiffi*

Identificación de especie

Los productos amplificados del gen que codifica la proteína de choque térmicohsp70 de los 2 pacientes se purificaron y secuenciaron con el objetivo principal de identificar las especies de *Lesihmania.*

Se envió a secuenciar en un laboratorio de referencia Macrogen INC. En korea del Sur, obteniendo los siguientes resultados de secuenciación ver **(Anexo 12).**

Una vez obtenidas las secuencias, utilizando el programa BLAST, se determinó que las muestras 1 y 2 de los pacientes presentaban una infección por *Leishmania naiffi* con un 99% de identidad.

6.3 Resultados del tercer objetivo.

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

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

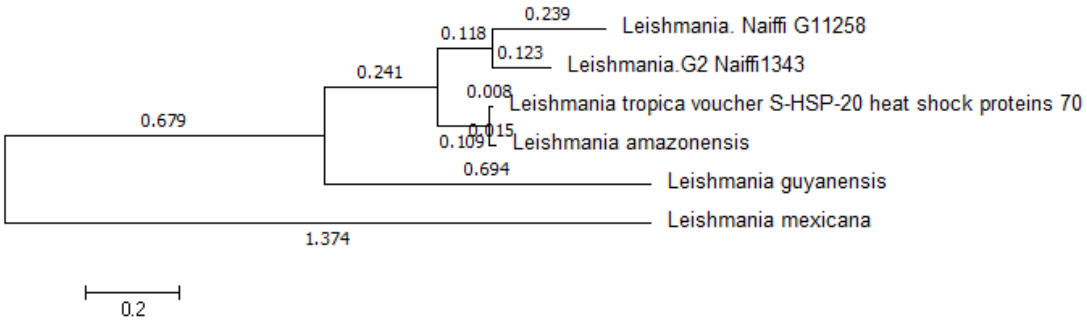

Figura 4. Árbol filogenético.
Autora: Gina Stefany Jaramillo

Comparación entre diferentes especies; con una divergencia del 0,2% entre sus nucleótidos y obteniendo un mismo punto de ramificación perteneciente al género *Leishmania*.

6.4 Resultados del cuarto Objetivo

Se realizó la organización e invitación a los docentes y estudiantes de la carrera de Laboratorio Clínico a la difusión de los resultados obtenidos (Anexo 13).

7. Discusión

Los datos del presente estudio demuestran que para la identificación molecular de las especies de *Leishmania,* son necesarias condiciones definidas como un ph óptimo del buffer TE y evitar la contaminación de la muestra para el aislamiento de ADN del parásito. La aplicación de estas técnicas moleculares permitió la identificación de *L. naiffi.*

Según García (2004) se consiguió la identificación de especies sudamericanas de *Leishmania*, utilizando la amplificación de la hsp70; obteniendo resultados similares en la presente investigación usando la amplificación de la misma proteína.

En la ciudad de Colombia, un estudio realizado por Montalvo et al., (2016) para la identificación de especies, utiliza métodos moleculares como la amplificación de un fragmento del gen de la proteína de choque térmico por su alta sensibilidad, detecta 14 especies de importancia médica, logrando obtener una banda de 1422 pb perteneciente a especies de *L. braziliensis, L. major, L. naiffi* de un total de 81 muestras tomadas de biopsias y raspados*;* en comparación con el presente estudio donde el número de muestras fue menor, utilizando la misma proteína para la amplificación se obtuvo una banda de igual número de pares de bases para la identificación de la especie de *L. naiffi*.

Según Torres et al., (2018) realizó un estudio en Honduras para la identificación de Leishmania a partir de muestras de raspados cutáneos teñidos con giemsa, usando el gen que codifica la proteína hsp70 con una amplificación de 1300 pb logrando tipificar *L. infantum chagasi* en el total de sus muestras; estos resultados coinciden con el presente estudio en cuanto al método utilizado por su alta sensibilidad y especificidad para obtener el tipo de especie sin importar la concentración del parásito presente en la muestra obtenida, pero difiere en cuanto a la especie encontrada *L. naiffi.*

Luego de una revisión bibliográfica sobre estudios realizados en el Ecuador acerca de los tipos de especies de *Leishmania*, se logró identificar los siguientes estudios:

Los primeros informes fueron reportados por Valenzuela en Ecuador en 1920 sobre Leishmaniasis cutánea en Esmeraldas (1 caso) (Hashiguchi et al., 2017). En una revision sobre la epidemiologia de Leishmaniasis en Ecuador realizado por Calvopiña, Armijos, & Hashiguchi, 2004, demuestran la presencia de las siguientes especies *L. panamensis, L. guyanensis, L. braziliensis, L. mexicana, L.amazonensis, L. major like* e hibridos *L. panamensis/guyanensis, L. guyanensis/braziliensis.*

Los primeros reportes de *Leishmania naiffi* en Ecuador según Kato, H et al., 2013 fueron en el norte de la selva amazónica en militares de edad adulta, usando como diana el citocromo b por su capacidad evolutiva, a diferencia del presente estudio, se amplificó un fragmento del gen hsp70 en muestras de lactantes entre los 5 y 8 meses de edad, obteniéndose este tipo de especie por primera vez en la zona.

Según Kato et al., (2016) obtuvo a nivel amazónico las especies: *L. guyanensis, L. braziliensis, L. lainsoni, L. naiffi,* usando el citocromo b para la identificación de *Leishmania,* y en la provincia de Zamora Chinchipe se identificó *L. braziliensis,* de igual forma, se ha informado en estudios anteriores, en relación a la presente investigación se reporta la especie de *L. naiffi* , usando como diana principal la hsp70 para su amplificación, pudiendo ser de gran importancia este hallazgo para demostrar de esta manera que se puede lograr identificar la misma especie independientemente de la diana para la amplificación de *Leishmania.*

Es de gran importancia recalcar que en este método fue posible la identificación de ADN del parásito en una persona que ya estaba con el tratamiento con 3 dosis de Glucantime®, se pudo detectar *Leishmania* en el aspirado de linfa y se confirmó mediante la amplificación por PCR de un fragmento del gen del hsp70; reafirmando de esta manera

en un estudio realizado por Muñoz, 2015, en el cual un paciente habia recibido 22 dosis de Glucantime® y aun si fue posible la detección del parásito mediante la amplificación por PCR del gen que codifica para el 18S rRNA.

Conforme a lo antes mencionado, el proyecto de investigación fue propuesto para buscar qué tipo de especie de *Leishmania* existe en los cantones de la Provincia de Zamora Chinchipe, porque son consideras zonas altamente endémicas; es importante tener una técnica estandarizada para la identificación con resultados que contribuyan a predecir la intensidad de la infección y para lo cual podríamos destacar que este estudio sea una base para que se realicen nuevas investigaciones, de igual manera, un aporte a la evolución de la enfermedad, eficacia del tratamiento y mejor su calidad de vida.

8. Conclusiones

Mediante la búsqueda activa en 101 familias se pudo obtener dos casos de *Leishmania* en lactantes en edades comprendidas de 5 y 8 meses, que se encontraban en sus domicilios; estos hallazgos nos sirvieron para la amplificación e identificación de una nueva especie en la zona.

Los métodos de identificación de *Leishmania* en esta zona es un gran aporte para que exista un diagnóstico más asertivo y un tratamiento funcional; con beneficio en el desarrollo de la salud y bienestar de las personas.

De las muestras obtenidas para cultivo y microscopía se logró la amplificación de un fragmento específico para *Leishmania* por PCR y su posterior identificación de la especie *L. naiffi*

La elaboración del árbol filogenético realizado, proporcionaron una divergencia del 0,2 % entre los nucleótidos en comparación con otro tipo de especies como lo es *L. amazonensis, L. guyanensis, L. mexicana, L. tropica.*

La *Leishmania* está presente peri domiciliariamente, ya que antes solo se la encontraba en las zonas donde había mayor vegetación y contacto con el vector, pudiendo hallar una nueva especie en esta zona.

9. Recomendaciones

Para mejorar las condiciones del cultivo, evitar el crecimiento de especies molestosas se recomienda el cultivo NNN suplementado con orina estéril (Puchaicela, 2018) y favorecer el crecimiento del parásito para los procedimientos en biología molecular.

Para disminuir la contaminación del cultivo por muestras contaminadas se debe suplementar el medio NNN con gentamicina 100 mg/L.

Lograr el uso inmediato del ADN extraído ya que con el paso del tiempo se degrada y su calidad disminuye y poder mejorar la calidad en la identificación de la especie.

10. Bibliografía

Alemayehu, B., & Alemayehu, M. (Agosto de 2017). Leishmaniasis: una revisión sobre parásitos, vectores y hospedadores de reservorios. *Ciencias de la salud*. Recuperado el 2019, de http://www.hsj.gr/medicine/leishmaniasis-a-review-on-parasite-vector-and-reservoir-host.php?aid=20131

Almedia, P. (2016). *Análisis comparativo del nivel de conociminetos sobre Leishmaniasis cutánea entre el personal médico de zonas endémicas del primer nivel de salud (área Pedro Vicente Maldonado y área Santo Domingo de los Tsáchilas)* . Tesis , Pontifica Universidad Católica del Ecuador , Facultad de Medicina . Recuperado el 2018, de http://repositorio.puce.edu.ec/bitstream/handle/22000/12405/TESIS%20LEISHMANASIS%20CUT%C3%81NEA.pdf?sequence=1

Becerril, M. A. (2014). *Parasitologia Medica.* . Mexico D.F: Mc Graw Hill Education. Recuperado el 2019

Botero, D., & Restrepo, M. (2012). Parasitosis Humanas. Medellín, Colombia: Corporacion para Investigaciones Médicas. Recuperado el 2019

Caballero, N. (Noviembre de 2017). *Leishmaniasis.* Obtenido de https://www.webconsultas.com/salud-al-dia/leishmaniasis/sintomas-y-tipos-de-leishmaniasis-5288

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

Cárdenas Alegría, Ó., Romero Calle, D., Salamanca Capusiri, E., Santalla Vargas, J., Oporto Portugal, P., & Arteaga Voigt, D. (2012). Análisis de marcadores moleculares para la tipificación de Leishmania spp. circulantes en el departamento de La Paz, Bolivia. *Revistas Bolivianas*. Recuperado el 2018, de http://www.revistasbolivianas.org.bo/scielo.php?pid=S1813-53632012000100002&script=sci_arttext

Chena, L., Nara, E., Canese, A., Oddone, R., Morán , M., & Russomando, G. (Junio de 2012). Caracterización de cepas de Leishmania, por medio de la técnica de PCR-RFLP de la región del Spliced Leader Miniexon (SLME), aisladas de humanos y caninos en Paraguay. *Memorias del Instituto de investigación de Ciencias de la*

Salud, 10(1), 1 y 2. Recuperado el 2018, de http://scielo.iics.una.py/pdf/iics/v10n1/v10n1a03.pdf

Dawit , G., Girma , Z., & Simenew , K. (Febrero de 2013). Una revisión sobre la importancia de la leishmaniasis en biología, epidemiología y salud pública. *Revista de Bacteriología y Parasitología, 4*(2), 166-173. doi:10.4172 / 2155-9597.1000166

El Kinetoplast-Mitochondrion. (s.f.). Obtenido de http://dna.kdna.ucla.edu/parasite_course-old/kdna/subchapters/kdna1.htm

Espinoza, L. (2007). Guía práctica sobre la técnica de PCR. En *Ecología molecular* (págs. 6 - 9). México: Instituto Nacional de Ecología. Recuperado el 2019, de http://www2.inecc.gob.mx/publicaciones2/libros/530/cap17.pdf

Fraga, J., Veland, N., Montalvo, A., Praet, N., Boggild, A., Valencia, B., & Arevalo, J. (2012). Especies precisas y rápidas escribiendo a partir de lesiones de leishmaniasis cutánea y mucocutánea del Nuevo Mundo. *Scielo*. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2012.06.010

Franco, T., & Hidalgo, R. (2003). Análisis Estadístico de Datos de Caracterización Morfológica de Recursos Fitogenéticos. Cali, Colombia: IPGRI. Obtenido de https://books.google.com.ec/books?id=B55X-G3WiugC&pg=PA17&lpg=PA17&dq=dendrograma+de+similitud+leishmania&source=bl&ots=i43pwOJIYy&sig=ACfU3U3-P8axqY-dpui0B1GSWzLYcFMxAg&hl=es&sa=X&ved=2ahUKEwicvsnk3MbgAhUtuVkKHdI7DT4Q6AEwCnoECAUQAQ#v=onepage&q=dendrogram

Freites , A., Córdoba, S., Bermejo, A., & Borbujo, J. (2015). Leishmaniasis mucocutánea causada por Leishmania infantum var Lombardi en un paciente inmunocompetente, España. *Europe PMC*. doi:10.1016 / j.eimc.2014.11.012

Gómez, A. (2013). *Análisis de la diversidad genética de Leishmania Infantum en Paraguay mediante técnica del k-DNA-PCR-RFLP*. Tesis magistral, Universidad Nacional de Asunción, Ciencias de la Salud, Asunción. Obtenido de http://www.conacyt.gov.py/sites/default/files/TES-BN-014.pdf

Gómez, J., Battistini, C., & Roe, E. (2016). Diagnóstico molecular en Leishmaniasis. En Saxo (Ed.), *Diagnóstico molecular de enfermedades infecciosas* (págs. 188-195). Lima, Perú. Recuperado el 2019, de https://books.google.com.ec/books?id=edSEDwAAQBAJ&pg=PA189&dq=ciclo+

de+vida+leishmania&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwi6xvCX6JjgAhWGmeAKHWebDiEQ6AEIKDAA#v=onepage&q=ciclo%20de%20vida%20leishmania&f=false

González , U., Pinart , M., Rengifo-Pardo , M., Macaya , A., Alvar , J., & Tweed , J. (2009). Interventions for American cutaneous and mucocutaneous. *Wiley*. doi:10.1002/14651858

González, A., Osorio, C., & Talamás, P. (Marzo de 2017). Leishmaniosis. *Ciencia, 68*(1). Obtenido de https://www.amc.edu.mx/revistaciencia/images/revista/68_1/PDF/Leishmaniosis.pdf?fbclid=IwAR31tB7V5TRr-j-YZVUSWVLLmkh2ko2kjqgLGT2hMY7vQuEGcUY1Tpp9j0Q

González, Y. P. (2012). Diagnóstico de leishmaniosis cutánea mediante frotis por escarificación con biopsia negativa de la lesión. *Med Cutan Iber, 40*(5), 2 y 3. doi:10.4464/MD.2012.40.6.5044

Granda, J. (2018). *Anuario de Vigilancia Epidemiológica.* Ministerio de Salud Pública, Dirección general de Vigilancia Epidemiológica. Recuperado el 2018, de https://public.tableau.com/profile/vvicentee80#!/vizhome/EnfermeddaesdelaPiel-2014/ANUARIO

Grill, F., & Zurmendi, M. (Febrero de 2017). Leishmaniasis visceral en Uruguay. *Scielo, 88*(1). Recuperado el 2019, de http://www.scielo.edu.uy/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1688-12492017000100007

Guerbouj, S., Mkada Driss, I., & Guizani, I. (2014). Herramientas moleculares para comprender la eco-epidemiología, diversidad y patogénesis de los parásitos de Leishmania. En D. Claborn (Ed.), *Tendencias de la Leishmaniasis en epidemiología, diagnóstico y tratamiento* (págs. 61-65). Missouri. doi:10.5772 / 57510

Hashiguchi, Y., Velez, L., Villegas, N., Mimori, T., Gomez, E., & Kato, H. (Febrero de 2017). Leishmaniases en Ecuador: revisión exhaustiva y estado actual. *Acta Tropica, 166*, 299-315. doi:10.1016/j.actatropica.2016.11.039

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

Kato, H., Gómez, E., Martini, L., Muzzio, J., Velez, L., & Calvopiña, M. (Julio de 2016). Distribución geográfica de especies de Leishmania en Ecuador basada en el análisis

de la secuencia del gen del citocromo B. *PLoS Negl Trop Dis, 10*(7). doi:10.1371/journal.pntd.0004844

Leishmaniasis, C. D. (MAYO de 2014). Obtenido de https://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/resources/pdf/cdc_diagnosis_guide_leishmaniasis.pdf

Llanes, A., Restrepo, C., Del Vecchio, G., Anguizola, F., & Lleonart, R. (2015). The genome of Leishmania panamensis:. *NCBI*. doi:10.1038 / srep08550

Mendoza, J. (2012). Aportes de la filogenética a la investigación médica. *Medica Herediana, 23*(2). Recuperado el 2019, de http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1018-130X2012000200008

META, D. d. (21 de Noviembre de 2016). *PROCEDIMIENTO TECNICO LEISHMANIA*. Obtenido de http://www.meta.gov.co/web/sites/default/files/adjuntos/P-SA-121%20Leishmania%20V1.pdf

Montalvo, A., Fraga, J., Monzote, L., García, M., & Fonseca, L. (Febrero de 2012). Diagnóstico de la leishmaniasis: de la observación microscópica del parásito a la detección del ADN. *Médicas Cubanas*. doi:10.1007/s10096-011-1463-z

Montalvo, A., Fraga, J., Aylema, J., Monzote, L., Montano, I., & Claude, J. (2006). PCR-RFLP/Hsp70 para identificar y tipificar Leishmania de la región neotropical. *Revista Cubana de Medicina Tropical*. Recuperado el 2019, de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0375-07602006000300009

Motazedien , H., Karamian, M., Noyes, H., & 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. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology, 96*(1). doi:10.1179 / 000349802125000484

Muñoz, E. (2015). *Identificación de especies de Leishamania, a partir de muestras de pacientes infectados con Leishmaniasis* . Tesis , Universidad de las Américas. Recuperado el 2019, de http://dspace.udla.edu.ec/bitstream/33000/4569/1/UDLA-EC-TIB-2015-07.pdf

OPS/OMS. (2018). *Leishmaniasis.* Organización Panamerica de la Salud, Salud, Washington. Recuperado el 2019, de http://iris.paho.org/xmlui/bitstream/handle/123456789/34858/LeishReport6_spa.pdf?sequence=5&isAllowed=y

OPS/OMS. (2018). *Leishmaniasis*. Recuperado el 2019, de https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis#

Orfao, A., Pinto, R., Pascual, J., Aragall, E., & Pedrosa, E. (2012). *Guía de protocolos utilizados para la obtención de ácidos nucléicos en biobancos.* Instituto de Salud Carlos III. Recuperado el 2019, de http://www.redbiobancos.es/Pages%5CDocs%5CProtocolos__extracci%C3%B3n_ADN.pdf

Pérez, A. (2012). *Reacción en cadena de la polimerasa (Polymerase Chain Reaction, PCR).* Valencias. Obtenido de https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/10700/Reacci%C3%B3n%20en%20cadena%20de%20la%20polimerasa.pdf

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/

Ramírez, C., Requena, J., & Puerta, C. (2011). Genes HSP70 de Leishmania braziliensis, un modelo para el estudio de regulación posttranscripcional. *Biomédica, 31*(3), 6-8. Recuperado el 2019, de https://www.researchgate.net/publication/256120313_Genes_HSP70_de_Leishmania_braziliensis_un_modelo_para_el_estudio_de_regulacion_posttranscripcional

Rosero, N. S. (2012). *Extracción de ADN genómico y amplificación de la región ITS por PCR en el ascomicete marino* . Obtenido de http://repositorio.ug.edu.ec/bitstream/redug/1681/1/Extracci%C3%B3n%20de%20ADN%20gen%C3%B3mico%20y%20amplificaci%C3%B3n%20de%20la%20regi%C3%B3n%20ITS%20por%20PCR%20en%20el%20ascomicete%20marino%20Lulwo...Saltos%2C%20Nancy.pdf

Sánchez, L., Sáenz, E., Pancorbo, J., Zegarra, R., & Garcés, N. (2004). Leishmaniasis. *Dermatología Peruana, 14*(2), 88-97. Recuperado el 2018, de http://sisbib.unmsm.edu.pe/bvrevistas/dermatologia/v14_n2/pdf/a02.pdf?fbclid=IwAR2L8obL4C9fmwQ8Fyb_YGdCnILic2MlJDzWIvzBKTPdUi2s9BAENztDSzg

Torales, M., Segovia, L., Martinez, N., Benítez , I., Viveros, C., Weiler, M., & Miret, J. (2018). *Manul de diagnóstico y tratamiento de las Leishmaniasis* . Salud Pública y Bienestar Social, Asunción. Recuperado el 2019, de

https://www.mspbs.gov.py/dependencias/imt/adjunto/057510-MANUALLEISHMANIASISSENEPA50618actualizado.pdf

Torres, L., Rodriguez, G., Sosa, W., Ortiz, J., & Martinez, D. (Noviembre de 2018). Implementación de un PCR-RFLP/Hsp70 para identificar y tipificar especies de Leishmania en una zona endémica a Leishmaniasis Cutánea Atípica en Honduras. *Revista Ciencia y Tecnología*(23). doi:10.5377/rct.v0i23.6862

Traviezo, L. E. (2012). Diversidad de flebotominos en una zona endémica de leishmaniasis visceral americana en Venezuela. *Peruana de medicina y experimental y salud pública*. Obtenido de https://scielosp.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1726-46342012000400013&lng=es&nrm=iso&tlng=es

Uribarren, T. (13 de Marzo de 2017). *Leishmaniasis o Leishmaniosis*. Recuperado el Enero de 2019, de http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/parasitologia/leishmaniosis.html

Yang, B., Chen, D., Chen, J., Liao, L., & Hu, X. (Febrero de 2013). Análisis del gen del kinetoplast citocromo b de 16 aislamientos de Leishmania de diferentes focos de China: diferentes especies de Leishmania en China y su inferencia filogenética. *Parásitos y vectores, 6*(32). doi:10.1186 / 1756-3305-6-32

Zorrilla, V., Vásquez, G., Espada, L., & Ramírez, P. (2017). Vectores de la leishmaniasis tegumentaria y la Enfermedad de Carrión en el Perú: una actualización. *Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica*. doi:10.17843

11. Anexos

Anexo Nº 1: Aprobación por el comité de bioética del INSPI

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

MINISTERIO DE SALUD PÚBLICA

COMITÉ DE ÉTICA EN INVESTIGACIÓN DE SERES HUMANOS (CEISH).

Notificación de la revisión del Comité de Ética de Investigación en Seres Humanos (CEISH) del Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública – 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".

Protocolo #: CEISH-INSPI-009
Versión: 2
Fecha de recepción del protocolo: 23 de febrero 2018
Fecha de resolución: 24 de mayo del 2018
Resolución: Pendiente de Aprobación

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 LIP, luego de establecer una reunión ordinaria el día jueves 24 de mayo del 2018, dictaminan el presente proyecto como PENDIENTE DE APROBACIÓN, el mismo que fue evaluado la pertinencia metodológica, jurídica y ética del protocolo; se solicita atender las siguientes observaciones:

- El Consentimiento Informado debe incluir una hoja de información al sujeto, donde se explica el proyecto en que consiste, los procedimientos que se realizaran, el tipo y la toma de muestras, como se guardará o se desechará la misma. Todo con un lenguaje claro y explicito para el sujeto que participará en la investigación, como corresponde a cualquier consentimiento: la hoja de información al sujetos y la que se corresponde con las firmas que ya la tienen.

A razón de lo señalado anteriormente, el Investigador Principal (IP) está en la obligación de presentar dichas aclaraciones y/o modificaciones al CEISH del INSPI – LIP, en un plazo máximo de 15 días calendario, contados a partir de la fecha de recepción de este documento. Para así, luego de su correspondiente revisión y de cumplirse con lo solicitado, contar con el dictamen final de APROBADO. Entendiéndose que el IP del proyecto en cuestión no puede dar inicio con las actividades planteadas hasta cumplir con lo solicitado en este documento.

En caso de requerir otra información adicional diríjalas al CEISH del INSPI-LIP, a la dirección: Calle Iquique N14-285 y Yaguachi, Sector el Dorado. Puede encontrar información adicional en el sitio web del CEISH, http://www.investigacionsalud.gob.ec/webs/ceish/, o de manera directa a su Secretaria, Verónica Toaquiza, al email ntoaquiza@inspi.gob.ec.

GOBIERNO DE LA REPÚBLICA DEL ECUADOR

Iquique Nº 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 EN INVESTIGACIÓN DE SERES HUMANOS (CEISH).

Cordialmente,

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

28 de mayo del 2018
Fecha de Correspondencia

Anexo Nº 2: Entrevista

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 01-Julio-2018

1. **DATOS GENERALES**

1.1 Barrio/localidad Jesús del gran Poder
1.2 Parroquia Zumba
1.3 Sector _____
1.4. Punto de referencia _____
1.5 No. Familia 42
1.6 Tiempo de Residencia 15 años
1.7 Nombre: _____
1.8 Sexo Femenino ☐ Masculino ☒
1.9 Edad 56 (años + meses)
1.10 Estado civil Casado
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 (x) Sabe como la llaman Verruga Peruana **No ( )**

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

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

3. **INFORMACIÓN SOBRE INFECCIÓN ACTUAL.**

3.1 ¿Tiene usted Grano malo (leishmania)?

No (x)

Si ( )

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

Versión: 18 abril 2018

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 (X) No ( )

4.2 Si tuvo leishmaniasis, ¿Hace qué tiempo? Hace 2 meses

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

4.4 ¿Como se llama? ___

4.5 ¿Dónde vive? Jesús del gran Poder

Sitio de referencia: 2 Km de Jesús del gran Poder

Firma entrevistado: _____

GRACIAS POR SU COLABORACIÓN

Anexo Nº 3: 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 de Leishmania

Investigador Principal:

Dr. Luis Morocho

Carrea de Laboratorio Clínico-Universidad Nacional de Loja,

Facultad de la Salud Humana

Cel: 0991949639

Mail: luis.morochoy@unl.edu.ec

A) Hoja de información:

Somos investigadores de la Universidad Nacional de Loja, 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.

¿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 diagnóstico con microscopio.

3) ¿Qué riesgos podría tener si participo?

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

4) ¿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.

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

La toma de muestra no demora más de 1 minuto.

8) ¿Tendré beneficios por participar?

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

9) ¿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.

10) ¿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.

11) ¿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.

12) ¿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.

13) ¿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.

¿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

Referencia.

Documento elaborado en base a *Consentimiento informado para la 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

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: …….

B) Consentimiento Informado (Hoja de firmas) para menores de edad:

Yo, ... con número de cédula ..1.....

Representante de ..

He recibido una explicación satisfactoria sobre el procedimiento del estudio, su finalidad, riesgos, beneficios y alternativas a los que será sometido mi representado.

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

Presto mi consentimiento para la realización 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: 08-07-18.....

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 Nº 4: Hoja de registro de muestras de pacientes con diagnóstico presuntivo 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 y raspado

Fecha	Unidad de Salud	Código tubo	Nombre y apellidos	Edad	Sexo		Lugar/Origen paciente	Localización herida	Duración herida	Localidad donde adquirió picadura
					M	F				
01-07-18	Subcentro Chimchipe	001			x		Jesús del Gran Poder	Mejilla derecha	2 meses	Peridomiciliaria
08-07-18	Subcentro Palanda	002				x	Cahuinal	Mejilla derecha	1 mes	Peridomiciliaria

Anexo Nº 5: Protocolo para la toma de muestras por raspado para tinción y microscopía.

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA **Laboratorio de Fitoquímica**	**Toma de muestras por raspado para tinción y microscopía**	**Código**: prot-leishmania	
		Revisión: 01	**Edición:** 01
		Fecha: 18-03-2018	

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 amastigotes.

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. **Concepto.**

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). 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.

4. Equipos y materiales:

- Torundas de algodón.
- Agua destilada.
- Gasas estériles
- Lancetas.
- Tres láminas portaobjetos.
- Marcador.
- Elementos de protección personal
- Microscopio
- Colorante Giemsa

5. Metodología

- 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 amastigotes en todo el extendido (2 láminas por lesión). Es positivo cuando se observan al menos 1 o más amastigotes (Leishmaniasis, 2014)

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 POR:
Dr. Luis Morocho	Dr. Luis Morocho

Anexo Nº 6: Protocolo para la 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: 18-03-2018	

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. Concepto.

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. Metodología

- 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 un 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 POR:
Dr. Luis Morocho	Dr. Luis Morocho

Anexo Nº 7: Protocolo para preparación de medios de cultivo NNN.

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)

Referencias:

Instituto Oswaldo Cruz. (2009). Manual de Procedimientos

REDACTADO POR:	REVISADO Y APROBADO POR:
Dr. Luis Morocho	Dr. Luis Morocho

Anexo Nº 8: Protocolo de extracción de ADN.

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA **Centro de biotecnología UNL**	**Protocolo de extracción ADN (Invitrogen PureLink DNA Kits).**	**Código** Proy-Leishmania	
		Revisión 01	**Edición** 01
		Fecha 29-06-2018	

1. **Objetivo.**

   Extraer la mayor cantidad de ADN.

2. **Alcance**

   Personal encargado, técnicos. Docentes y estudiantes.

3. **Fundamento**

   Se basa en la extracción de ADN de diferente material biológico.

4. **Materiales y reactivos**

   - Tubos eppendorf
   - Proteinasa k
   - RNAasa
   - Tampón de lisis
   - Etanol al 96-100 %
   - Lysis
   - Tampón de lavado
   - Tampón de elución genómica.

5. **Procedimiento**

1. Agregue 20 ul de Proteinasa K
2. Agregue 20 µl de RNasa A mezcle bien por breves
3. Agregue 200 µl de tampón de lisis / unión genómica PureLink ™ y mezcle bien en vórtex para obtener una solución homogénea.

4. Incube el tubo a 55 ° C con vórtex ocasional hasta que se complete la lisis
5. Agregue 200 µl de etanol al 96-100% al lisado. Mezcle bien agitando en vórtex durante 5 segundos para producir una solución homogénea.
6. Retire una columna de centrifugación PureLink ™ en un tubo colector.
7. Cargue el lisado (~ 640 µl) con Lysis / Binding Buffer y etanol
8. Centrifugue la columna a 10.000 × g durante 1 minuto a temperatura ambiente.
9. Deseche el tubo colector y coloque la columna giratoria en un nuevo tubo.
10. Lavar la columna con 500 µl de tampón de lavado 1 preparado con etanol.
11. Centrifugue la columna a 10,000 × g por 1 minuto a temperatura ambiente. Descartar el tubo de recolección y coloque la columna en un nuevo tubo de recolección.
12. Lavar la columna con 500 µl de tampón de lavado 2 preparado con etanol.
13. Centrifugue la columna a velocidad máxima durante 3 minutos a temperatura ambiente.
14. Coloque la columna giratoria en un tubo de microcentrífuga estéril de 1,5 ml.
15. Eluir el ADN con 25-200 µl de tampón de elución genómica PureLink ™.
16. Incube la columna a temperatura ambiente durante 1 minuto.
17. Centrifugue la columna a velocidad máxima durante 1 minuto a temperatura ambiente.
18. El tubo contiene ADN purificado.
19. Almacenar el ADN a -4 ºC a corto plazo o -20 ° C para almacenamiento a largo plazo.

Fuente: https://www.thermofisher.com/ec/en/home.html.

REDACTADO POR:	REVISADO Y APROBADO POR:
Srta. Gina Stefany Jaramillo	Dr. Luis Morocho

Anexo Nº 9: Protocolo de extracción ADN de placa teñidas con Giemsa

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA Centro de biotecnología UNL	**Protocolo de extracción ADN**	**Código** Proy-Leishmania	
		Revisión 01	**Edición** 01
		Fecha 29-06-2018	

1. **Objetivo.**

   Extraer ADN de buena calidad

2. **Alcance**

   Personal encargado, técnicos. Docentes y estudiantes.

3. **Fundamento**

   Se basa en la extracción de ADN de placas teñidas con giemsa sin importar el tiempo que haya sido conservada y la cantidad de parásitos presentes.

4. **Materiales y reactivos**

   - Hojas de bisturí
   - Tubos eppendorf
   - Buffer TE
   - Buffer de lisis celular
   - Buffer de lisis de núcleos
   - RNAasa
   - Buffer de lisis de proteínas

5. **Procedimiento**

   1. Cubrir los frotis con 250 µL de buffer TE [10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA (pH 7,6)], y el material biológico retirar con hojas de bisturí en un tubo Eppendorf de 1,5 mL.

2. Adicionar 900 µ L del Buffer de lisis celular, mezclar 20 segundos por inversión e incubar por 10 minutos a temperatura ambiente, luego centrifugar a 14000 rpm por 1,5 minutos en una micro centrifuga.
3. Desechar el sobrenadante y agregar nuevamente al precipitado 900 µL de Buffer de lisis celular repitiendo el paso anterior de este protocolo.
4. Al precipitado agregar 400 µL de Buffer de lisis de núcleos y 20 µL de RNAasa, luego incubar a 37ºC por 30 minutos.
5. Después de la incubación temperar los tubos eppendorf por dos minutos y agregar 250 µL de Buffer de lisis de proteínas, mezclar por inversión y llevar a centrifugación a 14000 rpm por 10 minutos.
6. Transferir el sobrenadante cuidadosamente a un nuevo tubo eppendorf de 1,5 mL previamente etiquetado y adicionar 1 mL de etanol absoluto, mezclar por inversión e incubar a menos 20ºC por 1 hora.
7. Precipitar el ADN por centrifugación a 10000 rpm por 15 minutos; descartar el sobrenadante, lavar el pellet con 1 mL de etanol 97% y llevar a centrifugación a 14000 rpm por 1,5 minutos.
8. Descartar el sobrenadante y secar el pellet por incubación a 60ºC por 20 minutos, transcurrido este tiempo el producto resuspender en 30 µL de buffer TE (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8).

Referencias: Motazedien , H., Karamian, M., Noyes, H., & 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*. doi:10.1179 / 000349802125000484

REDACTADO POR:	REVISADO Y APROBADO POR:
Srta. Gina Stefany Jaramillo	Dr. Luis Morocho

Anexo Nº 10: Protocolo para PCR convencional.

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA **Centro de biotecnología UNL**	**Protocolo para PCR convencional**	**Código** CBT-006	
		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

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.

2. Añadir 80 ng de ADN molde. El volumen de reacción total es de 50 µl, agitar en vórtex y centrifugar la mezcla brevemente.
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).

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

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)

6. REFERENCIAS

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

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

Anexo Nº 11: Protocolo para 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 19-12-2018	

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

1. Preparar suficiente cantidad de tampón de electroforesis para llenar el tanque de electroforesis y para moldear el gel (TBE 1X).
2. Pesar la cantidad apropiada de polvo de agarosa (por ejemplo, 2 g para gel de agarosa al 2%) en un matraz Erlenmeyer.
3. Agregar 100 ml de tampón TBE 1X a temperatura ambiente. El buffer debe ocupar máximo 40% del volumen del matraz.
4. Tapar ligeramente el cuello del matraz con un tapón.
5. Calentar el matraz en el microondas hasta verificar la disolución completa de la agarosa, logrando una solución transparente**.**
6. Añadir 8ul de Sybr Safe al matraz y homogenizar.
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.
8. Verter la agarosa enfriada en la bandeja de gel (molde) y esperar 20 minutos hasta que solidifique.
9. **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.
10. 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.
11. Mezcle 8ul de muestra con 2ul de colorante de carga hasta un volumen de 10 µl.
12. Cargar lentamente la mezcla de muestra en las ranuras del gel sumergido usando una pipeta.

13. 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.

14. 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).

15. Examinar el gel y la fotografía bajo luz ultravioleta (Instituto Oswaldo Cruz, 2009).

6. REFERENCIAS

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

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

Anexo Nº 12: Resultados de secuenciación.

	Especie identificada	**Secuencia**
Muestra 1 (1343pb)	*Leishmania naiffi*	TAGCGGGATCGACGCCGGCGAGAGACCGGACGATTGCTGAGCCTGGAGGT GCTGCGCATCATCAACGAGCCAACAGCGGCGGCCATCGCGTACGGCCTGG ACAAGGGCGACGACGGCAAGGAGCGCAACGTGCTGATCTTCGACCTTGGC GGCGGCACGTTCGATGTGACGCTGCTGACGATCGACGGCGGCATCTTCGA GGTGAAGGCGACGAACGGTGACACGCACCTTGGCGGCGAGGACTTTGACA ACCGCCTCGTCACGTACTTCAGCGAGGAGTTCAAGCGCAAGAACAAGGGT AAGGACCTTTCGTCGAGCCACCGCGCACTGCGCCGTCTGCGCACGGCGTG CGAGCGCGCGAAGCGCACGCTGTCGTCCGCGACGCAGGCGACGATCGAGA TCGACGCGCTGTTCGACAACGTCGACTTCCAGGCCAACATCACGCGCGCG CGCTTCGAGGAGCTGTGCGGCGACCTGTTTCGCAGCACAATGCAGCCGGT GGAGCGCGTGCTGCAGGACGCGAAGATGGACAAGCGCTCCGTGCACGACG TGGTGCTGGTGGGCGGGTCGACGCGCATCCCGAAGGTGCAGTCCCTCGTG TCGGACTTCTTCGGCGGCAAGGAGCTGAACAAGAGTATCAACCCCGACGA GGCTGTCGCGTACGGCGCTGCGGTGCAGGCGTTCATCCTGACGGGCGGCA AGAGCAAGCAGACGGAGGGGCCTGCCTGCTGCTGGATGTGACGCCCGCTG ACCCCTGGGGCATTGAAGACGGCCCGGCGGGCGTGGATGACGGCCGCTGA TCAAGCGGCAACACGAAGAATCCCCGACCCAAGAAAGAGCCCAGAATCTT TCTCGAACGTTACGCGGGACAACCCAGCCCCGGGCGTGCCACATTCCAGG GTCTTTCGAGGGGCGAAGCGCCGCGAATGAACGAAGGGAACTGCCCACCC TGCCTGGGGCCACGTTTCGAACTTTGGTCCGGGCATTCCCCGCCCAGCGC CCGCGGCGGGCGTTGCCCGCAGAATCGGAGGGTGAACGTTTCGAACCCTG GACGCCGAAACGGGCATTCCTTGAAACGTTGTCCCGCCGGAAGGAAGAAA GGGGCACCCGGGCAAAGCCGCAAACCCATTATTCACCCATTCACCCAAAC GAACAAAGGGGCCCGAACTGGAGCCAAAGGAACGAAGAATCCGAAGCCGC CATGGGTGGAAACCGAATGCCGTTCCGAAAGTTACCGAAGCCAGGGCCCG AACAAAGAATGCCAAGCCGCCGAAACCGCCTTGGGAAGGGCGAAAAAAAA CCGGGCCCTTGGGAAAAAAACTTACCCGCGTTACCTCGGAATT

Muestra 2 (1258pb)	*Leishmania naiffi*	TTAACTTTTATTTTTTTCAATTACATGATGGCAGGCGATAGACCGGCACT ATTGCAGGCCTGGAAGGTGCTGCGTCATCGTCAACGAGCCAACAGCGGCG GCCATCGCGTACGGCCTGGACAAGGGCGACTACGGCAAGGAGCTCAACGT GCTGATCTTCGACCTTGGCGGCGGCACGATTCGATGTGACGCTGCTGACG ATCAACGACGGCATCTTCGGAGGTGAAGGCGACGAACGGTGACACGCACC TTGCCGGCGAGGACTTTGACAACCGCCTCGATCACGTTCTTCATCGAGGA GTTCAAGCGCAAGAACAAGGGATAAGGACCTTTCGTCGAGCCACCGCTGC ACTTGCGCCGTTCTGCGCACGGCGTGCGAGCGCGCGTAAGCGCACGCTGT CGTCCGCGACGCAGGCGACGATCGAGATCGACGCGCTGTTCGACAACGTC GACTTCCAGGCCAACATCACGCGCGCGCGCTTCGAGGAGCTGTGCGGCGA CCTGTTTCGCAGCACAATGCAGCCGGTGGAAGCGCGTGCTGCAGCGACGC GAAAGATGGAACAAGCGTCTCCGTGCACGAACGTGGTTGCTTGGTGGGGC GGGGTCCGACGCGGCATCCCCGAAAGGTGCAGTCCCCTCGTGTCGGGACT TCTTTCGGGCGGCAAGGAGCTGAAACAAGGAGGTATCAAACCCCCGAACG AGGCCTGTCCGCGTTACGGGCGCCTGCGGGTGCAGGGCGTTTCATCCCTG AACGGGGCGGGCAAGAAGCAAAGCCAGAACGGGAGGGGCCCTGCCTGCCT GCCTGGAATGTTGAACGCCCGCCTGAACCCCTGGGGCCATTTGAAGAACG GGCCCGGGCGGGCGTTGAATGAACGGGCGCCTGAATCCAAAGCCGGCAAA CAACGAACGAATTCCCCGAACCCAAAGAAAGAAGCCCAGAATTCTTTCTT CGAACGGTAACGGCGGGAACAAACCCAGGCCCCGGGGCGTTGGCAACATT CCCAGGGTTCTTTCCGAAGGGGCCGAAGCCGCCGCCGAATTGAACCGAAA GGGGAACTTGCCCCACCCTTGGCTTGGGGGCCACCGTTTTCCGAAACTTT TGTTCCCGGGGCAATTCCCCCGCCCCAAGGCCGCCCCGGCCGGCCGGGGC GGTTGGCCCCGCCAAGAAATTCCGAAGGGGTTGGAACCGTTTTTCCGAAA CCCTTGGGGAAACGGCCGAAAACCCGGGCCAATTTCCCTTTGGAAAAACG TTTTGGTT

Anexo Nº 13: Difusión de resultados.

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA

FACULTAD DE LA SALUD HUMANA

CARRERA DE LABORATORÍO CLÍNICO

Descripción: Socialización de resultados a docentes y estudiantes de la carrera de Laboratorio Clínico, en el aula Magna Dr. Edmundo Granda U, el 14 de febrero del 2019.

Anexo Nº 14: Registro de asistencia a la difusión de resultados.

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA

FACULTAD DE LA SALUD HUMANA

CARRERA DE LABORATORIO CLÍNICO

TEMA: Difusión de resultados de Identificación genética de cepas de *Leishmania* en los cantones Palanda y Chinchipe

FECHA:

REGISTRO DE ASISTENCIA: DOCENTES

NOMBRES Y APELLIDOS	CICLO	CÉDULA	FIRMA
Diana Montaño Peralta	IV	1102062054	
Eba Ramírez Sarmiento	IV	1102001193	
Ma. del Cisne Lojón	III, V	1103797112	
Gerardo Rodríguez	I-II-IV	1102055105	
Luis Morocho	I	1102507904	
Sandra Freire Ortiz	II	1103402549	

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA

FACULTAD DE LA SALUD HUMANA

CARRERA DE LABORATORIO CLÍNICO

TEMA: Difusión de resultados de Identificación genética de cepas de *Leishmania* en los cantones Palanda y Chinchipe

FECHA:

REGISTRO DE ASISTENCIA: ESTUDIANTES

NOMBRES Y APELLIDOS	CICLO	CÉDULA	FIRMA
Thalia Lisbeth Lozano Minga	3ero "A"	1900709591	
Naylea Nicol Merino Córdova	3ro "A"	1150761045	
Geover Yeral Ludeña Merino	3º "A"	1150010906	
Oscar Javier López Granda	3ro "A"	1150231924	
Stephany Edith Orellana Pardo	3ero A	0750463028	
Kely Briggith Jiménez Palacios	3ero A	1900844174	
Maleni Yamilex Armijos Santorum	3ero A	1900878602	
Damarys Marley Quichimbo Armijos.	3ero "A"	1900635838	
Ana Janeth Castillo Vélez	3ero "A"	1105204489	
Cristian Alexander Jumbo M	4to "A"	1104136344	
Jennifer Alexandra Riera.Y	4to "A"	1105699752	
Luisa Stefanía Tauny Robles	4to "A"	1150095063	
María Esther Arreaondo Capa.	4º "A".	1105456543	
Jessenia Esperanza Muñoz Jurga	4º "A"	0922866454	

Jhoselyn Estefanía Belduma Jaramillo	4to "A"	1900746486	
Allison Loretto Ochoa Paz	4to "A"	1150352541	
Edita Mariela Hernandez Montesdeoca	4to "A"	1150051447	
Daniel Alejandro Vera Gordillo	4to "A"	1105366254	
Gladys Germania Guamán Lozano	4to "A"	1105130551	
Carmen Lilibeth Macas Jaramillo	4to "A"	1900873590	
Cecilia María Jiménez Jiménez	4to "B"	1105276156	
Daniela Elizabeth Ruiz Ruiz	4to "B"	1105097669	
Betsaida Corazón Vera Bermeo	4to "B"	1600475470	
Leonela Melissa Sáez Mazo	4to "B"	1105504854	
Jordan Alexander Sánchez Pinedo.	3ro B	1105833738.	
Kerly Siomara Poma Saca.	3RO A	1900886076	
Jennifer Narcisa Pérez Quezada	3RO "A"	1950003499	
Joselyn Ximena Ortiz Ropero	3RO "A"	1106067372	
Jessica María Hidalgo Simancas	3RO "A"	0706967494	
Yulady Lizbeth Cando Camacho	3ro "A"	1150017661	
Miller Gabriela Ludeña Ordoñez	3ro "A"	1150496071	
Johanna Michelle Guaman Gaona	3ro "A"	1104540958	
Daniel Josue Camacho Alvarado	1ro "A"	1104779861	

Mishel A. Silva Q.	5to "A"	1105583585	
Vanessa C. Gonzaga A.	5to "A"	1150127463	
Michelle M. Siguenza L.	5to "A"	1104429582	
Nathaly A. Cobos G	5to "A"	1105893745	
Camila Aguirre Medina	5to "A"	1104461403	
Martha Y. Quezada	5to "A"	1150356457	
Miriam Sánchez	5to "A"	1106071903	
David A. Gallegos	4to "B"	1104805532	
Leiver Enriquez	4to "B"	1109456585	
Cristina Manzaba	Egresada	1900851690	
Janeth Ochoa R.	Egresada	1900613397	
Viviana Quevedo	Egresada	0705642890	
Yadira Lapo	Egresada	1150012532	

Anexo Nº 15: Certificado de traducción.

Dr. Luis Alberto Morocho Yaguana

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

CERTIFICA

Haber realizado la traducción al inglés del resumen de la tesis titulada **"Identificación genética de cepas de *Leishmania*",** el cual es correcto y hace referencia al contenido del citado trabajo.

Loja 20 de febrero del 2019

Dr. Luis Alberto Morocho Yaguana, Mg. Sc.

Docente de la Carrera de Laboratorio Clínico