



# UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA

FACULTAD DE LA SALUD HUMANA  
CARRERA DE LABORATORIO CLÍNICO

**TÍTULO**  
**Estandarización de una técnica  
molecular de PCR para identificación de  
especies de Leishmania**

**MACROPROYECTO:**  
**Identificación genética de cepas de  
Leishmania circulantes en la Zona 7**

*Tesis previa a la obtención  
del Título de Licenciada en  
Laboratorio Clínico*

**AUTORA:**

*Cristina Nathaly Mangaba Jiménez*

**DIRECTOR:**

*Dr. Luis Alberto Morocho Yaguana, Mg. Sc.*

**LOJA-ECUADOR**  
**2019**

## CERTIFICACIÓN

Dr. Luis Alberto Morocho Yaguana, Mg. Sc.

**DIRECTOR DE TESIS**

### **CERTIFICO:**

Que he revisado y orientado en el marco del Reglamento de Régimen Académico de la Universidad Nacional de Loja vigente, todo el proceso de desarrollo del trabajo investigativo titulado: **“ESTANDARIZACIÓN DE UNA TÉCNICA MOLECULAR DE PCR PARA IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES DE LEISHMANIA”** de autoría de la Srta. **CRISTINA NATHALY MANZABA JIMÉNEZ**, previo a la obtención del título de Licenciada en Laboratorio Clínico.

Loja, 22 de marzo de 2019

Atentamente,



Dr. Luis Alberto Morocho Yaguana, Mg. Sc.

**DIRECTOR DE TESIS**

## AUTORÍA

Yo, **CRISTINA NATHALY MANZABA JIMÉNEZ** con CI. 1900851690 declaro ser autora del presente trabajo de investigación, y eximo expresamente a la Universidad Nacional de Loja y a sus representantes jurídicos de posibles reclamos o acciones legales por el contenido de la misma.

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

***Autora:*** Cristina Nathaly Manzaba Jiménez

***Firma:*** \_\_\_\_\_



***Cédula:*** 1900851690

***Fecha:*** Loja, 22 de marzo de 2019

## CARTA DE AUTORIZACIÓN

Yo, Cristina Nathaly Manzaba Jiménez, declaro ser autora de la tesis titulada: *“Estandarización de una técnica molecular de PCR para identificación de especies 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 la visibilidad completa del contenido del presente en el Repositorio Digital Institucional.

Los usuarios podrán consultar el contenido de este proyecto de investigación en el RDI, en las redes de información del país y del exterior, con las cuales tenga convenio la Universidad Nacional de Loja.

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 22 días del mes de febrero del dos mil diecinueve, firma la autora.

Firma:.....

**Autora:** Cristina Nathaly Manzaba Jiménez

**Cédula de identidad:** 1900851690

**Correo electrónico:** kissnat1995\_17@hotmail.com

**Celular:** 0993145221

### DATOS COMPLEMENTARIOS

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

**Tribunal de tesis**

**Presidente:** Lic. Gladys Margoth Jumbo Chuquimarca, Mg. Sc.

**Vocal:** Bq. María del Cisne Luzuriaga Moncada, Mg. Sc.

**Vocal:** Lic. Ivanova del Cisne Zúñiga Román, Mg. Sc.

## **DEDICATORIA**

A Dios y a mi familia con alegría, fuerza y ansias de futuro.

## **AGRADECIMIENTO**

Al terminar esta nueva etapa en mi vida quiero agradecer en primer lugar a Dios que me ha dado la garra para salir adelante.

A la Universidad Nacional de Loja quien me abrió las puertas durante los 4 años de mi carrera.

Al Dr. Luis Morocho Yaguana, por permirme formar parte de su macro proyecto.

Al Dr. Franklin Román y Dr. Masao Nishicagua que durante la realización, de una u otra forma han sabido brindarme su ayuda y consejos.

Finalmente, mi agradecimiento más profundo y sincero a mis padres Héctor y Rosario, a mis hermanos María, Sandra, Liseth y Galo, quienes, con su ejemplo, constancia y cariño, me han apoyado día a día durante mi largo trayecto universitario. Ojalá esta satisfacción de ahora pueda compensar en parte todo lo que hicieron y siguen haciendo por mí.

**ABREVIATURAS**

- ADN: Acido Desoxirribonucleico.
- APC: Células presentadoras de antígeno.
- ARN: Ácido Ribonucleico.
- DMSO: Dimetil sulfóxido.
- dNTPs: Desoxirribonucleótidos.
- EDTA: Etilendiaminotetraacético.
- ELISA: Electroquimioluminiscencia.
- F: Cebador Forward.
- g: Gramo.
- Hsp70: Heat Shock Protein 70 (Proteína de choque térmico 70).
- kDa: Kilo Dalton.
- kDNA: ADN del kinetoplasto.
- LC: Leishmaniasis cutánea.
- LCD: Leishmaniasis cutánea difusa.
- LMC: Leishmaniasis mucocutánea.
- LV: Leishmaniasis visceral.
- M: Molar.
- mg: Miligramo.
- ml: Mililitro.
- mM: Milimolar.
- mm: Milímetro.
- MSP: Ministerio de Salud Pública.
- ng: Nanogramo.
- nM: Nanomolar.
- NNN: Novy Nicolle Mcneal.
- OD: Densidad Óptica
- pb: Pares de bases.
- PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa.
- pMol/ $\mu$ l: Picomoles por microlitro.
- R: Cebador Reverse.
- RFLP: Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción.
- rpm: Revoluciones por minuto.

SDS: Dodecil Sulfato Sódico.  
TAE: Tampón Tris, acetato y EDTA.  
TBE: Tampón Tris- Borato – EDTA.  
TE: Tris – EDTA.  
U: Unidades Internacionales.  
UNL: Universidad Nacional de Loja.  
UV: Ultra Violeta.  
V: Voltios.  
X: Concentración.  
 $\mu\text{g}$ : Microgramo.  
 $\mu\text{l}$ : Microlitro.  
 $\mu\text{M}$ : Micromolar.

## 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.....	6
4.1. Leishmaniasis.....	6
4.1.1. Definición.....	6
4.1.2. Tipos.....	6
4.1.3. Agente etiológico.....	7
4.1.4. Ciclo de vida.....	8
4.1.5. Hábitat.....	10
4.1.6. Especies .....	11
4.1.7. Transmisión .....	12
4.1.8. Reservorios .....	13
4.1.9. Epidemiología.....	15
4.1.10. Diagnóstico de laboratorio .....	15
4.2. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) .....	17
4.2.1. Fundamento .....	17
4.2.2. Componentes.....	18
4.2.3. Etapas de la PCR .....	19
4.2.4. Aplicaciones de la PCR .....	21
4.3. Hsp70: Proteínas de choque térmico Hsp70 .....	22
4.3.1. Antigenicidad de las proteínas de choque térmico en parásitos .....	23
4.3.2. Pruebas inmunológicas .....	24
5. MATERIALES Y MÉTODOS .....	27
6. RESULTADOS .....	31
7. DISCUSIÓN.....	41

8. CONCLUSIONES .....	43
9. RECOMENDACIONES .....	44
10. BIBLIOGRAFÍA.....	45
11. ANEXOS.....	50
Anexo 1: Autorización de uso de laboratorio.....	50
Anexo 2: Ficha de recolección de datos .....	51
Anexo 3: Protocolo para medio bifasico Novy Nicolle Mcneal (NNN) .....	53
Anexo 4: Protocolo para cuantificación de parásitos en cámara de neubauer.....	55
Anexo 5: Protocolo para preparar TE.....	57
Anexo 6: Protocolo para preparar SDS 10% .....	60
Anexo 7: Protocolo para preparar fenol – cloroformo - isoamyl .....	62
Anexo 8: Protocolo para preparar cloroformo - isoamyl.....	64
Anexo 9: Protocolo para preparar Acetato de sodio.....	66
Anexo 10: Protocolo para extracción de ADN.....	68
Anexo 11: Protocolo para preparar primers .....	72
Anexo 12: Protocolo PCR convencional .....	74
Anexo 13: Protocolo para preparar TBE 1X. ....	77
Anexo 14: Protocolo para electroforesis. ....	79
Anexo 15: Difusión de resultados .....	82
Apéndice 1: Certificación de la traducción .....	86

## **1. TÍTULO**

**Estandarización de una técnica molecular de PCR para identificación de especies de leishmania.**

## 2. RESUMEN

La leishmaniasis es una enfermedad infecciosa producida por el protozoo intracelular llamado *leishmania* sp., es transmitida por el mosquito del género *Lutzomya* que al picar infecta piel, mucosas y ciertos órganos internos. En el presente trabajo se propuso estandarizar la técnica de PCR para la identificación de especies de *leishmania* según un fragmento del gen (1422 pb) que codifica a la proteína Hsp70, para ello, se determinaron las condiciones de amplificación mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR-*hsp70*) a 6 cepas control procedentes de Instituto Oswaldo Cruz de Brasil. Los resultados evidencian que existe reproducibilidad del método al observar la formación de una banda a la altura de 1422 pb en todas las muestras analizadas. La técnica de PCR es considerada la herramienta principal para identificar especies de *leishmania* mostrando exactitud y precisión en su diagnóstico, tanto de cultivos in vitro como de muestras clínicas.

**PALABRAS CLAVES:** Leishmaniasis, PCR, proteína Hsp70.

## ABSTRACT

Leishmaniasis is an infectious disease caused by the intracellular protozoan called leishmania sp., It is transmitted by an insect of the genus Lutzomyia that it infects skin, mucous membranes and certain internal organs introduces the parasites in the skin when bites. In this research, it was proposed to standardize the PCR technique for the identification of leishmania species according to a fragment of the gene (1422 bp) that encodes the Hsp70 protein. In this sense, the amplification conditions were determined by polymerase chain reaction (PCR-hsp70) to 6 control strains from Oswaldo Cruz Institute of Brazil. The results show that there is reproducibility of the method, observing the formation of a band at the height of 1422 pb in all the samples analyzed. The results show that there is reproducibility of the method, observing the formation of a band at the height of 1422 pb in all the samples analyzed. The PCR technique is considered the main tool to identify leishmania species, showing accuracy and precision in their diagnosis, both in vitro cultures as well as clinical samples.

**KEYWORDS:** Leishmaniasis, PCR, Hsp70 protein.

### 3. INTRODUCCIÓN

La leishmaniasis es una enfermedad infecciosa producida por un protozoario intracelular llamado *Leishmania* sp., transmitida por el mosquito *Lutzomya* que al picar introduce los parásitos en la piel. Existen dos formas de *Leishmania*: promastigote extracelular flagelado en el vector y el amastigote intracelular no flagelado en el hospedador vertebrado. La leishmaniasis se observa principalmente en regiones tropicales y templadas (Jimenez, 2015).

Las leishmaniasis se encuentran distribuidas en todos los continentes, son endémicas en 98 países, y se considera que aproximadamente 350 millones de personas están en riesgo de adquirirlas. Se desconoce la incidencia y prevalencia real de la enfermedad, porque solo en 52 de los países endémicos, la leishmaniasis es una enfermedad de notificación obligatoria. Se calcula una prevalencia mundial de 20 millones de casos, y se cree que la incidencia anual oscila entre 1,5 - 2 millones de nuevos casos para las leishmaniasis cutáneas, y 500000 nuevos casos para la leishmaniasis visceral (Zambrano, 2014).

Esta enfermedad representa un problema de salud pública en el Ecuador, según el Ministerio de Salud Pública (MSP), durante el periodo de 2002 al 2012, se han registrado casos en 23 de las 24 provincias del país (excepto Galápagos), con un promedio de 1537 casos anuales y, una tasa de incidencia que oscila en un rango de 6,14 a 19,15 por 100000 habitantes (SNEM, 2013).

La Organización Mundial de la Salud considera a la leishmaniosis cutánea una enfermedad olvidada severa en la categoría 1 de enfermedad emergente y no controlada. La mayor parte de los casos pueden ser tratados con medicación tópica, pero algunas especies de *Leishmania* pueden causar lesiones mucocutáneas en donde es necesario un tratamiento sistémico. La identificación del parásito es laboriosa y necesita de un

observador experimentado, por lo que ciertos autores han sugerido la combinación de técnicas para obtener un diagnóstico más certero, como por ejemplo el frotis de la lesión con el aislamiento de material genético y la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) (Bonifaz et al., 2011).

El presente estudio en su objetivo general busca estandarizar una técnica de PCR para identificación de especies de leishmania, normalizando la concentración de los reactivos de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para la amplificación del ADN del parásito, según un fragmento del gen que codifica la proteína Hsp70 (tamaño esperado 1422 pb), a seis muestras de leishmania procedentes del Instituto Oswaldo Cruz de Brasil, y a la vez determinar que la técnica cuenta con sensibilidad y especificidad analítica.

Los protocolos producto del presente estudio permitirán a estudiantes y docentes pertenecientes al Macro proyecto “Identificación genética de especies de leishmania circulantes en la zona 7” aplicar la PCR a ADN procedente de muestras clínicas, siendo la base para su identificación genética.

## 4. REVISIÓN DE LITERATURA

### 4.1 Leishmaniasis

#### 4.1.1 Definición.

Las Leishmaniasis son enfermedades zoonóticas que causan en el humano un conjunto de síntomas clínicos que pueden comprometer la piel, mucosas y vísceras. Son causadas por diferentes especies de protozoos del género *Leishmania* y transmitidos de una persona infectada a una sana mediante la picadura de insectos hematófagos de la familia *Psychodidae*, subfamilia *Phlebotominae* del género *Lutzomya* (Morelos, 2015).

#### 4.1.2 Tipos.

Según Murray existen diferentes tipos en función de la especie implicada, la infección puede ocasionar una enfermedad cutánea, cutánea difusa, mucocutánea y visceral:

- **Leishmaniasis cutánea:** el primer signo es una pápula roja, que aparece en el sitio de la picadura de la mosca entre 2 semanas y 2 meses después de la exposición. Las lesiones se irritan, son intensamente pruriginosas y aumentan de tamaño y se ulceran, La úlcera se va endureciendo y recubriendo de costra de forma gradual y muestra una exudación serosa poco densa. En este estadio la enfermedad se puede complicar con una infección bacteriana secundaria. La lesión se puede curar sin tratamiento en pocos meses, pero suele dejar una cicatriz deformante. La especie que se suele asociar a leishmaniasis cutánea, *L trópica*, también puede existir en una forma viscerotrópa (Murray, Rosenthal, & Pfaller, 2016).
- **Leishmaniasis mucocutánea:** se suele relacionar con el complejo *L. braziliensis*. El período de incubación y el aspecto de las úlceras cutáneas primarias son similares en la enfermedad por *L. braziliensis* y por otras formas de leishmaniasis cutáneas. La

diferencia esencial en la enfermedad clínica es la afectación y destrucción de las mucosas y las estructuras tisulares asociadas. Pueden desarrollarse lesiones primarias no tratadas hasta en el 80 % de los casos de la enfermedad mucocutánea. La extensión a las mucosas nasal y oral puede aparecer de forma simultánea con la lesión primaria o muchos años después de la curación. Las lesiones mucosas no se curan de forma espontánea y son frecuentes las infecciones bacterianas secundarias, que dan lugar a una mutilación facial grave con deformación de la cara y en ocasiones provocan la muerte (Murray, Rosenthal, & Pfaller, 2016).

- **Leishmaniasis visceral:** puede cursar como una enfermedad aguda fulminante que causa la muerte con rapidez, como un proceso crónico debilitante o como una infección asintomática autolimitada. El período de incubación oscila entre varias semanas y 1 año, y se produce de forma gradual fiebre, diarrea y anemia. Los escalofríos y la sudoración, que recuerdan al paludismo, son frecuentes en las primeras fases de la infección. Conforme los microorganismos proliferan e invaden las células del sistema reticuloendotelial se produce un marcado aumento del tamaño de hígado y bazo, con pérdida de peso. Pueden producirse lesiones renales por afectación de las células glomerulares. (Murray, Rosenthal, & Pfaller, 2016).

#### **4.1.3 Agente etiológico.**

Según Morelos en 2015, el agente etiológico de la Leishmaniasis es un protozooario de la familia *Trypanosomatidae*, género *Leishmania*. Es un parásito digenético, en su ciclo de vida se encuentran dos formas o estadios.

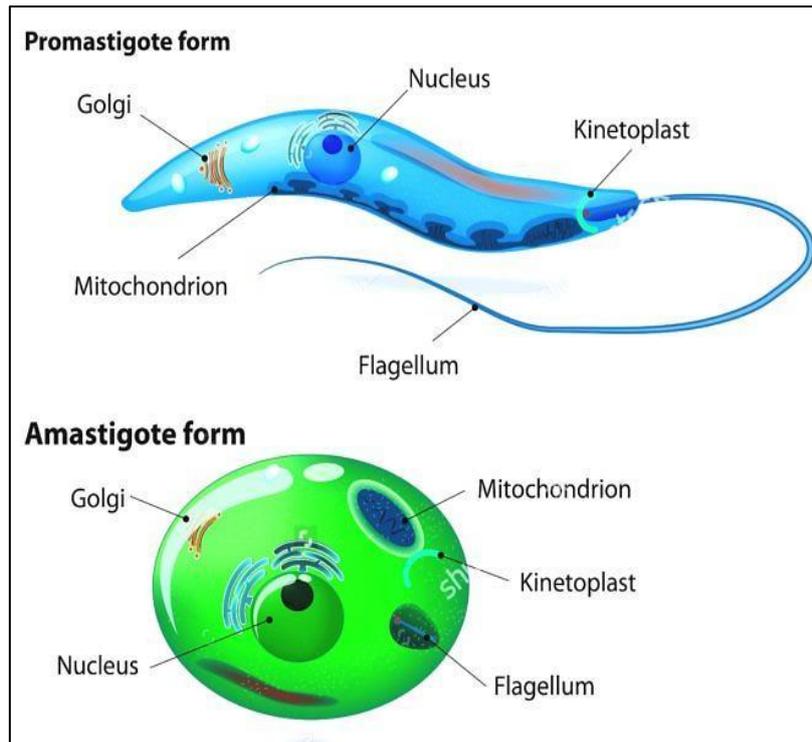
- 4.1.3.1. Promastigote:** la forma infectante, elongado, extracelular, alargada, se desarrolla y multiplica en el tracto digestivo de los insectos transmisores. De 20-30  $\mu\text{m}$ , flagelado para su movilidad en el intestino de los insectos vectores.

**4.1.3.2. Amastigote:** la forma replicativa, redondo u oval, carece de flagelo, intracelular, se encuentra en los macrófagos donde se dividen, mide de 2-5  $\mu\text{m}$  (Ver figura 1).

De acuerdo al lugar donde se desarrolla parásito en el tubo digestivo del vector, el género *Leishmania* se divide en dos subgéneros: *Leishmania* y *Viannia*. El primero se desarrolla en la parte anterior del píloro (desarrollo suprapilórico), en la unión del intestino medio y posterior. En *Viannia*, el parásito ocurre tanto en el intestino medio como posterior (Morelos, 2015).

#### **4.1.4 Ciclo de vida.**

Todos los protozoos del género *Leishmania* poseen un ciclo de vida similar, incluye insectos de la familia *Psychodidae*. Los vectores principales pertenecen al género *Lutzomyia*, en el Nuevo Mundo y género *Phlebotomus* en el Viejo Mundo. La hembra vectora se infecta al picar un vertebrado y succionar amastigotes con la sangre y macrófagos infectados. En el tubo digestivo de los mosquitos, los amastigotes se alargan y desarrollan rápidamente el flagelo para dar origen a los promastigotes. Estos parásitos interfieren con la alimentación del insecto. Cuando éste pica a un nuevo vertebrado, son regurgitados como promastigotes metacíclicos que son los parásitos infectantes. Los promastigotes de las diferentes especies de *Leishmania* se reproducen por división binaria en diferentes partes del tubo digestivo de los insectos y según la localización se clasifican en tres grupos:



**Figura 1: Morfología de Leishmania**  
**Fuente: (Meštrović, 2016)**

- **Hypopyloria** en la parte posterior del tubo digestivo.
- **Suprpyloria** en la anterior del tubo digestivo.
- **Peripyloria** en ambas partes del tubo digestivo.

La reproducción también se hace por división binaria. El tiempo que toma el vector para ser infectante es de aproximadamente 10 días. En la naturaleza, la infección de los vectores es baja, por lo tanto se requiere que piquen repetidas veces para una transmisión adecuada que debe inocular entre 10 y 200 parásitos (Botero & Restrepo, 2012).

Al penetrar los promastigotes libres por la picadura a la piel, son englobados por las células de Langehrans y otros macrófagos, dentro de los fagosomas se transforman en amastigotes. Estos se reproducen intracelularmente por división binaria, rompen las células y rápidamente entran a nuevas células hasta causar lesiones ulcerativas por destrucción del tejido. En las especies del complejo *L. donovani*, se diseminan a las

vísceras, lo cual no ocurre con las otras especies, que solo se localizan en la piel o mucosas (Ver figura 2) (Botero & Restrepo, 2012).

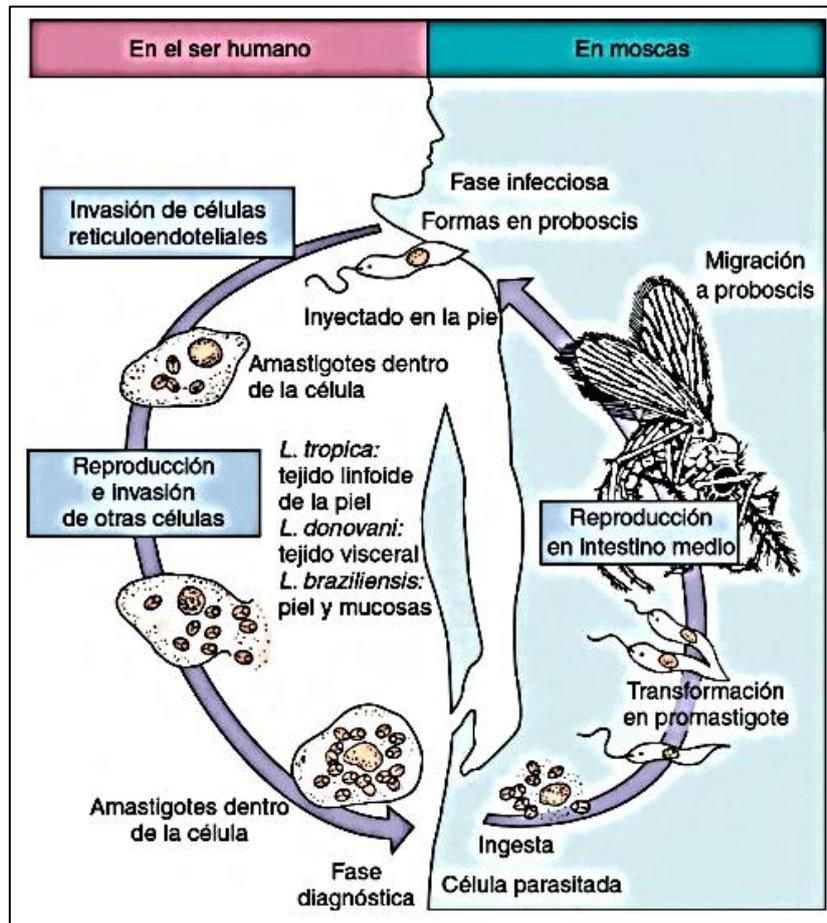


Figura 2: Ciclo vital del género Leishmania.

Fuente: Microbiología Médica (Murray, Rosenthal, & Pfaller, 2016)

#### 4.1.5 Hábitat.

Según Castaño en el 2014, clasifica dependiendo del hábitat donde habita leishmania en:

- **Hábitat selvático.** Los parásitos son mantenidos por reservorios de hábitat selvático (perezoso), el hombre se infecta cuando penetra el bosque y es picado por el vector infectado (Castaño, 2014).
- **Hábitat doméstico rural.** Se presenta a nivel rural por la adaptación de los vectores a los ambientes domiciliarios y peridomiciliarios (Castaño, 2014).

- **Hábitat urbano.** Colonización de nuevos espacios por parte de los insectos vectores y luego, con el arribo de reservorios infectados, se establece la transmisión (Castaño, 2014).

#### 4.1.6 Especies.

El género *Leishmania* contempla más de 20 especies y se divide en 3 subgéneros, de acuerdo al sitio de desarrollo del parásito en el insecto transmisor: *Leishmania* (*Leishmania*), *Leishmania* (*Viannia*), *Leishmania* (*Sauroleishmania*), este último de lagartos, de acuerdo a estudios de filogenia molecular. Las especies y subespecies se agrupan dentro de complejos en constante revisión (Schönian et al. 2011; Fraga et al. 2010).

La difícil clasificación de las múltiples especies y subespecies de *Leishmania* se realiza en función de su:

- **Biología:** desarrollo en el flebótomo, crecimiento en medios de cultivo, desarrollo en los hospederos vertebrados (Schnian et al. 2011).
- **Bioquímica:** patrones isoenzimáticos, secuenciación de múltiples loci (multilocus enzyme typing) actual "estándar de oro" (Schnian et al. 2011).
- **Inmunología:** análisis parasitario con anticuerpos monoclonales (Schnian et al. 2011).

En América, la leishmaniasis cutánea localizada es causada por múltiples especies de los subgéneros *Leishmania* y *Viannia*: *L. mexicana*, *L. braziliensis*, *L. panamensis*, *L. guyanensis*, y *L. peruviana*. La enfermedad mucocutánea (también conocida como espundia, uta), se asocia con mayor frecuencia a *L. braziliensis* y *L. panamensis*, aunque

otras especies pueden estar involucradas. *L. infantum*, da lugar a la enfermedad visceral (Uribarren, 2016).

La leishmaniasis cutánea difusa (LCD) se presenta como consecuencia de factores inmunes del hospedero, asociada a ciertas especies del parásito. Involucra, hasta ahora, a *L. mexicana* y *L. amazonensis* (Uribarren, 2016).

En nuestro país se han identificado 8 especies, *Leishmania (Viannia) guyanensis*, *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) naiffi*, *L. (V.) lainsoni* y *L. (Leishmania) mexicana*. Las, *L. (V.) guyanensis* y *L. (V.) braziliensis*, se distribuyen en zonas tropicales, subtropicales y amazónicas de la costa. Recientemente se han identificado *L. (V.) naiffi* y *L. (V.) lainsoni* en zonas amazónicas, y *L. (L.) mexicana* en un área montañosa de los Andes. En la Zona 7, se han reportado *L. guyanensis* y *L. braziliensis*, aunque reportes anteriores señalan también la presencia de *L. panamensis*, *L. panamensis/guyanensis*, *L. guyanensis/braziliensis* y ausencia de casos en la Provincia de Loja (Calvopina, Armijos, & Hashiguchi, 2004).

#### **4.1.7 Transmisión.**

Según Morelos en 2015, se transmite de una persona infectada a una sana mediante la picadura de insectos hematófagos de la familia *Psychodidae*, subfamilia *Phlebotominae* del género *Lutzomyia* (Morelos, 2015).

##### **4.1.7.1 Vectores.**

Los vectores principales pertenecen al género *Lutzomyia*, en el Nuevo Mundo y género *Phlebotomus* en el Viejo Mundo (SNEM, 2013). La transmisión del parásito: desde el animal hacia el hombre, se hace por picadura de la hembra del género *Lutzomyia*, que tiene los promastigotes infectantes en su aparato picador. Los mosquitos de este género pertenecen a la familia *Psychodidae*, subfamilia *Phlebotominae* y por

este motivo se les conoce con los nombres genéricos de flebotomíneos o flebótomos. Los pequeños mosquitos son de considerable importancia en salud pública porque sirven como vectores de los agentes etiológicos de la leishmaniasis, bartonelosis y algunas arbovirosis (Botero & Restrepo, 2012).

La mayoría de los casos de leishmaniasis cutánea son causados por parásitos del subgénero *Viannia* y solo una minoría evoluciona a una complicación mucosa, metastásica o no metastásica. Los demás son causados por parásitos del subgénero *Leishmania* (SNEM, 2013).

#### **4.1.7.2 Reservorios.**

Un animal reservorio es aquel que tiene el parásito en la piel, sangre o vísceras y que es accesible para que el mosquito lo succione. El reservorio es la fuente de infección para los vectores del foco endémico y llega al ser humano. El hombre, roedores silvestres, desdentados (perezosos), marsupiales y carnívoros, a menudo inclusive perros domésticos y en focos urbanos, equinos; en muchas zonas se desconocen los huéspedes. En el Ecuador los perros domésticos son considerados como un hospedador reservorio importante de leishmaniasis andina al igual que los roedores silvestres (Andrade & Cruz, 2014)

#### **4.1.8 Epidemiología.**

Las leishmaniasis se encuentran distribuidas en todos los continentes, son endémicas en 98 países, y se considera que aproximadamente 350 millones de personas están en riesgo de adquirirlas. Se desconoce la incidencia y prevalencia real de la enfermedad, porque solo en 52 de los países endémicos, la leishmaniasis es una enfermedad de notificación obligatoria. Se calcula una prevalencia mundial de 20 millones de casos, y se cree que la incidencia anual oscila entre 1,5 - 2 millones de nuevos casos para las

leishmaniasis cutáneas, y 500000 nuevos casos para la leishmaniasis visceral (Zambrano, 2014).

La enfermedad es altamente endémica en el subcontinente indio y en África oriental. Se estima que unos 200000 - 400000 nuevos casos cada año en todo el mundo; 90 % de los nuevos casos se informó de seis países: Brasil, Etiopía, India, Somalia, Sudán del Sur y Sudán (Organization World Health, 2016).

En América, las leishmaniasis representan un problema significativo en salud pública, debido a su alta morbilidad, con distribución en algunas partes de México, América Central y América del Sur, a excepción de Chile y Uruguay. Para Leishmaniasis visceral, tiene mayor incidencia en el norte del Brasil (Zambrano, 2014).

Esta enfermedad representa un problema de salud pública en el Ecuador, afectando a las personas más pobres de sectores rurales que viven en áreas ecológicamente propicias para su transmisión entre los 300 a 1500 metros sobre el nivel del mar y de acuerdo a la estratificación se estima una población con riesgo de transmisión de aproximadamente 350000 habitantes. Según el MSP durante el periodo de 2002 al 2012, se han registrado casos en 23 de las 24 provincias del país (excepto Galápagos), con un promedio de 1537 casos anuales y una tasa de incidencia que oscila en un rango de 6,14 a 19,15 por 100000 habitantes (SNEM, 2013).

Según la gaceta de la Dirección Nacional de Vigilancia Epidemiológica en el Ecuador se han reportado 1309 casos de Leishmania durante el año 2016; de los cuales 46 casos están presentes en la zona 7 distribuidos de la siguiente manera: 13 casos en la provincia de Loja, 14 casos en la provincia de Zamora Chinchipe y 19 en la provincia de El Oro (Granda, 2017).

#### 4.1.9 Diagnóstico de laboratorio.

##### 4.1.9.1 Parasitológico.

- **Microscopía.** En las lesiones iniciales sin contaminación bacteriana es posible obtener una buena muestra con células del tejido, con muy poca sangre y en donde la coloración muestra con facilidad los parásitos intra o extracelulares.

El frotis directo es una muestra con especificidad del 100 % pero una sensibilidad variable, que depende del tipo de la muestra, la buena coloración y la experiencia que tenga el observador. En algunos centros de diagnóstico la sensibilidad del método es cercana al 90%. En lesiones muy crónicas o contaminadas es más difícil el hallazgo del parásito (Botero & Restrepo, 2012).

- **Cultivo.** Del material obtenido en condiciones asépticas por algunos de los procedimientos indicados anteriormente, se hacen siembras en medios de cultivo. El medio más empleado es Novy-MacNeal-Nicolle, conocido comúnmente como medio NNN. También se emplean otros como Tobie modificado, medio De Senekje y el medio *Drosophila* de Schneider, especialmente bueno para crecimiento masivo, para hacer las clasificaciones isoenzimáticas o para estudios moleculares (Botero & Restrepo, 2012).

La incubación se hace a temperatura ambiente entre 20°C y 30°C. Después de ocho días se revisan los cultivos para buscar los promastigotes en la fase líquida, que con frecuencia están aglomerados y entrelazados por los flagelos, formando algunas rosetas que son características. Si las lesiones están contaminadas o no se tienen precauciones en la toma de la muestra, los cultivos se pierden por el crecimiento de bacterias u hongos (Botero & Restrepo, 2012).

- **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 lo que es igual, hasta un solo parásito (Montalvo, Fraga, & Lianet, 2012).

La superioridad de la reacción en cadena de la polimerasa se explica también por el hecho de admitir aplicaciones en un amplio rango de especímenes clínicos, lo que reviste gran importancia debido a la gran variedad de presentaciones de la leishmaniasis. Entre estas muestras se cuentan: biopsia y raspado de piel, aspirados de médula ósea y nódulos, muestras de sangre e incluso conjuntiva. Se notifica que es posible obtener ADN a partir de preparaciones de aspirados de médula ósea, teñidas previamente con Giemsa, y muy recientemente se reportó el uso de papel de filtro impregnado en la lesión, así como de aplicadores en la mucosa bucal para la detección de parásitos en casos de leishmaniasis visceral (Montalvo, Fraga, & Lianet, 2012).

En las formas cutáneas, la reacción en cadena de la polimerasa es la herramienta diagnóstica de más valor pues presenta valores de sensibilidad y especificidad altos. La sensibilidad y especificidad varía en dependencia de la diana genética y de la normalización del ensayo, pero por lo general se reportan numerosos protocolos cuyos resultados no son comparables, puesto que responden a necesidades de países o regiones y a la detección del parásito en una u otra forma de la enfermedad; sin que exista una validación multicéntrica de estos, o se comparen los distintos protocolos disponibles, para enfrentar el diagnóstico molecular de manera uniforme (Montalvo, Fraga, & Lianet, 2012).

La muestra de la cual se obtiene el ADN a analizar se puede tomar mediante aplicadores con algodón o palillos de dientes estériles, lo que constituye una alternativa no invasiva y también con papel de filtro. Se han desarrollado también reacción en cadena de la polimerasa especie-específicas para la identificación de especies del parásito de importancia médica a nivel local (Montalvo, Fraga, & Lianet, 2012).

## **4.2 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)**

### **4.2.1 Fundamento.**

La PCR (las siglas en ingles de Polimerase Chain Reaction) es la técnica que se fundamenta en copiar muchas veces un fragmento de ADN mediante el empleo de una polimerasa que puede crecer a temperaturas muy elevadas, ya que proviene de la bacteria *Thermus aquaticus*, que vive a altas temperaturas (79-85°C), de ahí su nombre comercial más conocido: Taq polimerasa (Merida & Moreno, 2015).

Es una técnica básica de biología molecular que proporciona una cantidad de ADN suficiente para poder realizar otras técnicas posteriormente, a pesar de que la muestra inicial sea muy escasa y que reproduce *in vitro* la replicación del ADN; es decir cuando se realiza una técnica de PCR, se simula lo que sucede en una célula cuando se sintetiza el ADN y en el tubo se mezclan todos los ingredientes necesarios para estimular la producción de este proceso (Merida & Moreno, 2015).

Esta técnica fue ideada por K. Mullis a mediados de la década de 1980, a quien posteriormente se otorgó en 1993, el premio Nobel de Química. Se caracteriza porque recurre a una polimerasa termorresistente que permite desnaturalizar el ADN a 94°C sin degradar la enzima y se amplifica un pedazo específico de ADN, que requiere conocer la secuencia que hay a ambos lados de la región que se va a amplificar. Es una técnica

muy sensible que permite obtener millones de copias partiendo de una sola cadena de ADN y también es muy específica, ya que sólo amplifica la secuencia que se quiere amplificar (Merida & Moreno, 2015).

#### 4.2.2 Componentes para la realización de la PCR

Mérida y Pérez en el 2015, coinciden en que los componentes básicos para la PCR son:

- **Muestra de ADN:** es el ADN a partir del cual queremos obtener una copia de un fragmento (DNA template) (Pérez, 2015).
- **Taq polimerase (ADN polimerasa),** es una enzima capaz de generar una copia de DNA a partir del DNA molde. La reacción se lleva a cabo en un tampón apropiado para el funcionamiento de la enzima polimerasa. Además, como cofactores de la polimerasa se añaden cationes divalentes, generalmente en forma de cloruro de magnesio ( $MgCl_2$ ) (Pérez, 2015)
- **Oligonucleótidos de cadena sencilla,** complementarios a las secuencias conocidas del ADN diana, *primers* o cebadores u oligos (forward [F] y reverse [R]), son los que van a delimitar el fragmento a amplificar (Pérez, 2015) (Merida & Moreno, 2015).
- **Desoxinucleótidos trifosfatos,** (carecen de 2'-OH y 3'-OH), dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP). Se recomienda una concentración similar en cada uno de ellos (de 20 a 200 $\mu$ m) y relacionada con la concentración de  $Mg^{+2}$ , puesto que el Magnesio actúa como agente quelante sobre los dNTP (Pérez, 2015) (Merida & Moreno, 2015).
- **Cloruro de Magnesio ( $ClMg_2$ ).**- factor que estabiliza el ADN de una sola cadena y su concentración resulta fundamental para la optimización de la reacción, ya que a mayor concentración disminuye la especificidad (Merida & Moreno, 2015).

### 4.2.3 Etapas de la PCR.

La PCR consta de 3 etapas fundamentales: desnaturalización, hibridación y elongación (Merida & Moreno, 2015).

- **Fase de desnaturalización (denature):** es la separación de los dos filamentos del ADN y se consigue calentando el ADN hasta 95°C durante 1-5 min, según la calidad y el peso molecular del ADN (Merida & Moreno, 2015).
- **Fase de hibridación (annealing)/alineamiento:** fase en la que tiene lugar la unión de los *primers* o cebadores a sus secuencias complementarias de la muestra de ADN. La temperatura ideal que permite la unión del *primer* con la cadena de ADN se conoce como temperatura *annealing* y depende del número y tipo de nucleótidos que constituyan el *primer*. Los cebadores son secuencias de una sola cadena de 10 a 30 nucleótidos que se unen a zonas específicas (complementarias) de cada una de las cadenas desnaturalizadas del ADN, por eso confieren especificidad a la PCR (Merida & Moreno, 2015).

El *forward* (F), o *primer upstream*, es el que se une al extremo 5' del ADN; el que se une al extremo 3' del ADN es el reverse (R) o *primer downstream*. La temperatura de hibridación o *annealing* se fija de tal manera para que el *primer* se adhiera adecuadamente a su secuencia complementaria, pero que no se una de forma inespecífica a otras secuencias de ADN. Se debe procurar que los dos primers tengan la misma temperatura *annealing* que normalmente oscila entre 50-70°C y que depende de las bases nitrogenadas Guanina (G), Citosina (C), Adenina (A), Timina (T), es decir la secuencia de los *primers* (Merida & Moreno, 2015).

A la hora de elegir y diseñar los *primers* se debe contar con aproximadamente la misma cantidad de AT y CG. Además hay que evitar la complementariedad en cada

uno de los *primers*, evitar C y G en el de 20 a 30 pares de bases (pb) y la concentración del primer de 0,1 a 0,5 micromoles. A mayor temperatura de hibridación, mayor especificidad se consigue, disminuyen las uniones incorrectas de los *primers*, así como la extensión incorrecta de nucleótidos en el extremo 3' del *primer*. Si al visualizar un gel de agarosa no se visualiza ninguna banda, se podría modificar la temperatura de hibridación, por ejemplo bajándola un par de grados (Merida & Moreno, 2015).

- **Fase de extensión o elongación.**- La Taq polimerasa incorpora los nucleótidos para replicar el fragmento de ADN, es decir para la elongación del *primer* por acción de la ADN polimerasa (72°C). Por cada molécula molde de ADN inicial se generan 2 moléculas molde de ADN en el *primer* del ciclo. Todo el proceso se repite entre 35 y 40 veces y hay un incremento exponencial de la cantidad de copias. Se llega a un punto en el que los componentes de la reacción se agotan y aunque se añadieran más ciclos no se obtendría mayor rendimiento. La cantidad relativa de ADN se calcula como  $2^{n-1}$ , siendo n el número de ciclos (Merida & Moreno, 2015).

Todas las fases de la PCR tienen lugar en el termociclador, sistema v automático programable para realizar la PCR, que calienta y enfría la reacción en periodos cortos de tiempo, es decir ciclicifica las temperaturas necesarias para que se lleve a cabo la replicación del ADN (Merida & Moreno, 2015) (Ver figura 3).

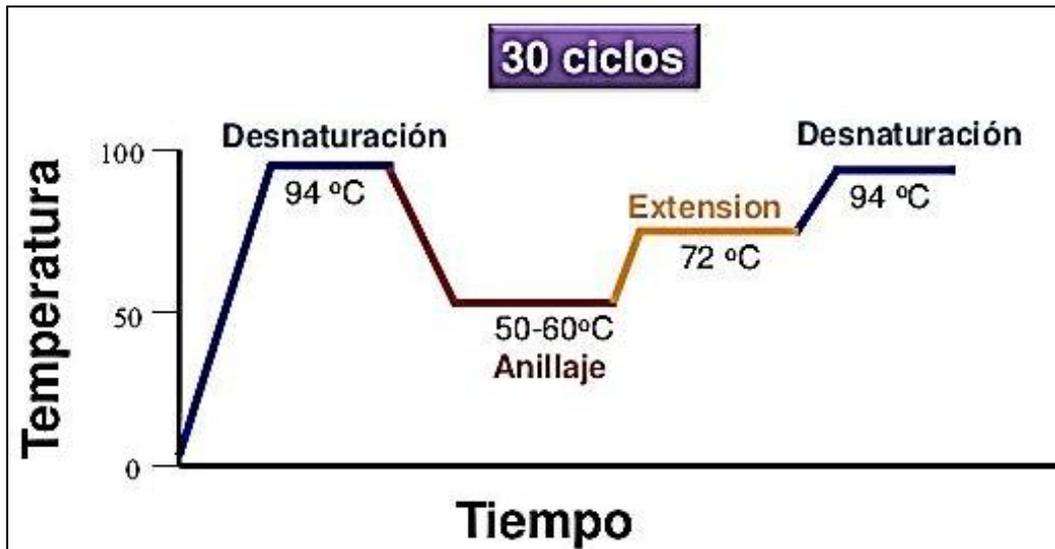


Figura 3: Etapas de la PCR  
Fuente: (García, 2013)

#### 4.2.4 Aplicaciones de la PCR.

- **Pruebas para la presencia de secuencias de DNA específicas.**- para determinar si una muestra de tejido contiene o no un virus dado mediante la PCR, se aísla ácido nucleico de la muestra y se añaden cebadores PCR complementarios al DNA viral, junto con los otros reactivos de la PCR. Entonces se permite que proceda la reacción. Si el genoma viral está presente en la muestra, los cebadores PCR se hibridarán con él y la PCR generará un producto. Si el virus no está presente, los cebadores PCR no se hibridarán y no se generará producto. (Karp, 2014).
- **Comparación de moléculas de DNA.**- Si dos moléculas de DNA tienen la misma secuencia de bases, generarán los mismos productos de PCR en reacciones con cebadores idénticos. La PCR se realiza en las muestras usando varios cebadores, que pueden estar diseñados en forma específica o generarse al azar. Los productos se separan por electroforesis en gel y se comparan. Cuanto más similares las secuencias de los genomas bacterianos, más similares serán sus productos PCR (Karp, 2014).

- **Cuantificación de plantillas de DNA o RNA.**- La PCR también puede usarse para determinar cuánto de una secuencia específica de nucleótidos (DNA o RNA) está presente en una muestra mixta. En un método para esta PCR cuantitativa se usa la unión de un colorante específico para DNA bicatenario a fin de cuantificar la cantidad de producto bicatenario que se genera. La rapidez de acumulación de producto es proporcional a la cantidad de plantilla presente en la muestra (Karp, 2014).
- **Identificación de especies.**

En las formas cutáneas, la reacción en cadena de la polimerasa es la herramienta diagnóstica de más valor, pues presenta valores de sensibilidad y especificidad altos. La sensibilidad y especificidad varía en dependencia de la diana genética y de la normalización del ensayo (Montalvo, Fraga, & Lianet, 2012).

En la enfermedad mucocutánea, la utilización del ADN del kinetoplasto (*kDNA*) como diana genética resulta muy sensible para detectar los parásitos, mientras que los genes que codifican los espaciadores internos de la transcripción (ITS), resultan más útiles para discriminar entre las especies que producen esta forma clínica en Brasil. Se describió también la detección de *kDNA* de parásitos del subgénero *L. (Viannia)* en tejidos de la mucosa de pacientes con enfermedad cutánea, lo cual pudiera indicar, paralelamente, que este es un hecho común en infecciones con parásitos de este subgénero (Ver tabla 1) (Montalvo, Fraga, & Lianet, 2012).

### **4.3 Hsp70: Proteínas de choque térmico Hsp70**

Las proteínas de choque térmico (Hsp, por sus siglas en inglés) son una familia de proteínas activadas por estrés que participan en el plegamiento y reparación de proteínas y tienen un peso molecular de 10 a 170 kDa. La Hsp70, es uno de los chaperones que

juega un papel fundamental en la protección de las células contra las tensiones de diversos tipos y orígenes. Cuando se induce, la Hsp70 previene la apoptosis inmediata de las células y permite la adaptación celular, que es esencial para la supervivencia celular (Kayama, 2012).

La Hsp70 tiene algunas ventajas, es fácilmente comparable en todas las especies de *Leishmania* de todo el mundo ya que no existe una variación de tamaño en el gen, discrimina a todas las especies relevantes en ambos subgéneros *L. (Leishmania)* y *L. (Viannia)* (Kayama, 2012).

A continuación se mencionan las principales dianas genéticas utilizadas para el diagnóstico molecular de leishmania (Ver tabla 1).

#### **4.3.1 Antigenicidad de las proteínas de choque térmico en parásitos.**

Las Hsps, generalmente la Hsp70, están entre los antígenos inmunodominantes reconocidos por el sistema inmune en un amplio espectro de parasitosis. Aparte de su implicación en las interacciones parásito-hospedador, también asumen una importancia inmunológica, aún cuando las Hsps están entre las proteínas más conservadas evolutivamente, con índices de identidad en todos los casos superiores al 50%. Por esta razón, las proteínas de choque térmico de *Leishmania* han sido denominadas “panantígenos”. Son proteínas muy conservadas, que se encuentran en la célula como multímeros proteicos, con un alto porcentaje de reconocimiento por sueros de pacientes con leishmaniosis y que han sido descritas como antígenos durante otros procesos infecciosos y enfermedades autoinmunes (Carmelo & Zurita, 2006).

**Tabla 1.**

*Dianas genéticas más utilizadas para el diagnóstico y sus características.*

Nombre de la diana genética	Secuencia correspondiente	Nivel taxonómico de identificación	Sensibilidad y especificidad diagnóstica
(ITS)	Espaciadores internos de la transcripción	Género Especies	S: 79,3 % E: ND S: 91 % E: 100 % S: 40 % E: 96 % S: 80 % E: 100 %
(kDNA)	ADN del kinetoplasto	Género Subgénero <i>Leishmania</i> (V.) Especies	S:90,1 % E: 100 % S: 98 % E: 57 % S: 97,1 % E: ND S: 68,6 % E: 92 % S: 94,2 % E: 92,9 % S:92 % E: 99,6 % S: 93,2 % E: 95,6 % S: 90,9 % E: ND
Ssu-rRNA (18S)	Subunidad pequeña del ARN ribosomal	Género Especies	S: 92 % E: 99,6 % S: 93,2 % E: 95,6 % S: 90,9 % E: ND
(gp63)	Gen que codifica la glicoproteína de 63 kDa	Especies	S: 85 %
(cpb)	Gen que codifica la cisteíno proteinasa B	Especies Cepas	ND ND ND ND
mini-exon	Genes que codifican los minixones o <i>spliced leader</i> (SL)	Especies	S: 89,7 % E: ND
hsp70	Genes que codifican la proteína de 7 kDa	Especies	S: 95 % E: 100 %

**Fuente:** (Montalvo, Fraga, & Lianet, 2012)

Durante la infección con *Leishmania*, muchas células infectadas son destruidas, liberando estos panantígenos que son entonces fagocitados y procesados por células presentadoras de antígenos profesionales (APCs). La fuerte respuesta inmune tanto celular como humoral frente a las Hsps que se observa en humanos y animales con leishmaniosis puede deberse a su alta abundancia en los parásitos, especialmente bajo

condiciones de estrés, a su estabilidad, a su capacidad de ser procesadas por APCs, y a la memoria inmunológica que genera la frecuente re-estimulación con los determinantes antigénicos conservados de las Hsps de otros patógenos. Así, se ha sugerido que la ubicua distribución de las Hsps y su conservación de secuencia ha sido aprovechada por el sistema inmune para desarrollar una respuesta universal y rápida contra la infección (Carmelo & Zurita, 2006).

#### **4.3.2 Pruebas inmunológicas.**

- **Intradermorreacción de Montenegro o prueba de leishmanina.** Es una prueba de hipersensibilidad celular tardía a antígenos de *Leishmania*, en la cual se inyecta 0.1 ml de una suspensión de promastigotes fijados en fenol ( $10 \times 10^6/\text{ml}$ ) y se evalúa el eritema después de 48 a 72 h; se considera positivo desde 5mm o mayor, lo cual puede ser indicativo de que existió un contacto previo o que el sujeto está infectado y cursa con una buena respuesta inmune celular. El resultado negativo indica ausencia de contacto con el parásito o que el paciente cursa con un cuadro clínico de leishmaniosis anérgica, característico de la Leishmaniasis visceral (LV) y la Leishmaniasis Cutánea (LC). Por esta razón, la intradermorreacción de Montenegro sólo debe solicitarse como complemento de otros métodos diagnósticos. Sin embargo, esta prueba es una excelente herramienta para realizar estudios epidemiológicos y evaluar la respuesta al tratamiento, ya que los pacientes con LV sufren transformación hacia una reacción positiva después de terapéutica exitosa (Murray, Rosenthal, & Pfaller, 2016).
- **Detección de anticuerpos.**
  - La prueba ELISA es un método cuantitativo que permite determinar el nivel y el isotipo de anticuerpos presentes. Los pacientes con Leishmaniasis Cutánea

Difusa (LCD) y LV cursan con hipergammaglobulinemia con títulos elevados de IgG e IgM (Becerril, 2014).

- La inmunofluorescencia indirecta (IFI) es un método semicuantitativo que establece la presencia de anticuerpos anti *Leishmania* (Becerril, 2014).
  - La inmunoelectrotransferencia (Western blot) identifica de modo adicional antígenos específicos (Becerril, 2014).
  - La inmunohistoquímica con anticuerpos anti *Leishmania* permite identificar el parásito dentro de las células (Becerril, 2014).
- **Otros.**
    - Xenodiagnóstico. Consiste en la inoculación del aspirado de la lesión en animales susceptibles (hámster dorado, ratón BALB/c) y permite recuperar e identificar el parásito. El desarrollo de la lesión puede tardar varios meses. La técnica del xenodiagnóstico emplea vectores artrópodos criados en laboratorio para detectar concentraciones reducidas de parásitos en los individuos infectados (Murray, Rosenthal, & Pfaller, 2016).

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1 Tipo de estudio.

La investigación tuvo un enfoque de carácter cuantitativo, además se emplearon los tipos de estudio transversal, experimental y descriptivo.

### 5.2 Trabajo de Laboratorio.

El trabajo de Laboratorio se realizó en el Centro de Biotecnología de la Universidad Nacional de Loja (Ver Anexo 1).

### 5.3 Muestra.

Se utilizaron 6 cepas de *Leishmania* provenientes del Instituto Oswaldo Cruz de Brasil.

### 5.4 Técnicas e Instrumentos de recolección de datos.

Se utilizó una ficha de recolección de datos aplicado a las distintas etapas de la estandarización. (Ver Anexo 2).

### 5.5 Método.

Se seleccionaron 6 blancos del genoma de *leishmania*. Para la Identificación de especies se amplificó un fragmento del gen que codifica la proteína de choque térmico hsp70 (producto de PCR de 1422 pb) como lo describe Fraga (Fraga et al., 2010).

- **Material biológico:** Para los controles positivos se utilizaron 6 cepas de *Leishmania* proporcionados por el Instituto Oswaldo Cruz de Brasil (Ver tabla 2).
- **Crecimiento de parásitos:** Las cepas de *Leishmania* fueron cultivadas y mantenidas en medio bifásico NNN (Ver anexo 3). Los cultivos fueron mantenidos por siete días hasta que los parásitos alcanzaron la fase estacionaria temprana de crecimiento, realizando resiembras para evitar su pérdida.

**Tabla 2.**

Cepas control positivo de Leishmania y códigos de registro.

<b>Especie</b>	<b>Código</b>
<i>L(V) braziliensis</i>	10CL566
<i>L(L) ecuatoriensis</i>	10CL888
<i>L(L) guyanensis</i>	10CL565
<i>L(L) major-like</i>	10CL2021
<i>L(L) mexicana</i>	10CL561
<i>L(V) naiffi</i>	10CL1365

**Fuente:** Instituto Oswaldo Cruz.

**Autor:** Cristina N. Manzaba Jiménez.

- **Conteo de parásitos:** Se realizó dilución de la muestra y se coloreó con azul de toluidina, luego se efectuó el conteo en cámara de Neubauer, contando en los 4 cuadrantes externos y el cuadrante central dentro y sobre las líneas, los parásitos agrupados en rosetas se cuantificaron como un solo parásito (Ver anexo 4).
- **Extracción de ADN:** Para la extracción de ADN de Leishmania spp., se utiliza la técnica de Sambrook, mediante la extracción con fenol-cloroformo, para ello se centrifuga la muestra del cultivo, y se le añade 950 µl de TE (Ver anexo 5), 50 µl de SDS al 10 % (Ver anexo 6), 25 µl de RNAsa, 5 µl de proteinasa K, homogenizar e incubar durante 3 horas.

Posteriormente, se realiza lavados con fenol – cloroformo – alcohol isoamílico (Ver anexo 7), realizar otro lavado con cloroformo – alcohol isoamílico (Ver anexo 8), homogenizar, centrifugar y eliminar el sobrenadante. Añadir 1/10 del volumen de acetato de sodio (Ver anexo 9) y 2.5 volúmenes de etanol al 70 %.

Finalmente realizar un lavado con etanol al 96 %, dejar secar y resuspender el pellet de ADN en 50 µl de ADN (Ver anexo 10).

- **Cuantificación y determinación de la calidad y concentración de DNA:** Se realiza mediante la medición del ADN obtenido en un espectrofotómetro NanoDrop ND-1000. La concentración de un ácido nucleico se determina leyendo la densidad

óptica a 260 nm. La relación entre las densidades ópticas en OD260 y OD280 está entre 1,8 y 2 para soluciones de ADN puro. Valores <1,8 indican contaminación con proteínas, valores >2 indican contaminación con ARN y / o fenol (Instituto Oswaldo Cruz, 2009).

- **Optimización de la reacción en cadena de la polimerasa:** Para amplificar el gen Hsp70 se usó una PCR convencional, amplificando un producto de PCR de 1422 pb a partir de las cepas enumeradas con anterioridad; se usó los cebadores Hsp70 forward 5'GACGGTGCCTGCCTACTTCAA3' y Hsp70 reverse 5'CCGCCCATGCTCTGGTACATC3' (Ver Anexo 11)
- El volumen total de reacción fue de 50 µl. Las concentraciones optimizadas para la PCR fueron: buffer de PCR 1 X; dNTPs 0,2 mM; primers forward y reverse 0.4 µM; Taq DNA polimerasa 1 U y 80 ng de ADN. La amplificación se realizó en un termociclador Applied Biosystems, el programa utilizado fue: 1 ciclo de desnaturalización inicial a 94 °C por 5 min; 33 ciclos de desnaturalización por 30 seg a 94 °C, hibridación por 1 min a 65 °C, extensión por 3 min a 72°C y 1 ciclo de extensión final por 10 min a 72 °C. Los tubos que contenían los productos de amplificación fueron almacenados a -20 °C (Ver anexo 12).
- **Electroforesis en gel de agarosa:** Los productos de PCR fueron corridos en gel de agarosa al 2 %, en buffer TBE 1 X (Ver anexo 13) a 80 V, durante 60 minutos (Ver anexo 14).
- **Análisis de amplificación (fotodocumentador):** Los geles se visualizaron con tinción Syber Safe en luz ultravioleta. Se utilizó el marcador de peso molecular GeneRuler 100 pb Plus DNA ladder (100 - 3000 pb).

## **5.6 Análisis y presentación de los datos**

Los datos fueron analizados luego de revisar las fichas de recolección, usando los protocolos aplicados a todas las cepas de leishmania. Se elaboraron tablas en Microsoft Excel y figuras obtenidas directamente del fotodocumentador que faciliten la comprensión de los resultados.

Para la difusión de los datos recolectados se realizó una presentación en Power Point (Ver anexo 15).

## 6. RESULTADOS

### Extracción de ADN manual.

Para dar cumplimiento al primer objetivo planteado se realizó la extracción de ADN manual mediante la técnica de extracción con fenol – cloroformo pasando la muestra de cultivo por varias etapas de lisis, digestión, lavado y precipitación obteniendo los siguientes resultados:

**Tabla 3.**

*Cuantificación de parásitos y verificación de ADN obtenido en cantidad y calidad*

<b>Especie</b>	<b>Cuantificación de parásitos.</b>	<b>Concentración del ADN (ng).</b>	<b>Calidad del ADN 260/280nm.</b>
<i>L. (V) brazilienses</i>	1'590.000	8,3	1,58
<i>L. (L) ecuatoriensis</i>	91'400.000	17,1	1,85
<i>L. (L) guyanensis</i>	1.666'875.000	91,5	2,00
<i>L. (L) major-like</i>	119'250 .000	24,5	1,81
<i>L. (L) mexicana</i>	483'200.000	31	1,99
<i>L.(V) naiffi</i>	94'150.000	18,3	1,95

**Fuente:** Fichas de recolección de datos.

**Autor:** Cristina N. Manzaba Jiménez.

### Interpretación

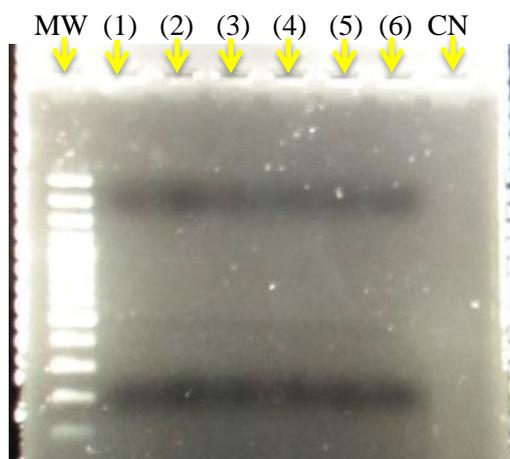
La presente tabla nos revela el número de parásitos obtenidos del medio de cultivo de cada una de las especies de *Leishmania* utilizados para la extracción de ADN, así como la calidad y cantidad del ADN resultante. Obsérvese que la concentración de ADN es directamente proporcional al número de parásitos presentes en el cultivo, siendo *L. guyanensis* la especie que presenta mayor carga parasitaria y mayor concentración de ADN, contrario a *L. braziliensis* que fue la especie con menor carga parasitaria y menor concentración de ADN.

También es importante resaltar que los valores óptimos de calidad del ADN a una longitud de onda de 260/280 nm se encuentran entre 1.8 y 2, pero en nuestro proyecto para *L. (V) brazilienses* se procesó con una calidad de 1.58, debido a que el cultivo provisto por el Instituto Oswaldo Cruz de Brasil no se encontraba en condiciones favorables para su resiembra, siendo utilizado el cultivo original.

Dando cumplimiento al segundo objetivo planteado se llevó a cabo el proceso de estandarización de la PCR, a partir de las muestras de ADN extraído, amplificando un producto de 1422 pb, durante el proceso se llevaron a cabo varios ensayos que serán mencionados a continuación.

**Tabla 4.***Ensayo 1 de PCR.*

	Concentración Stock	Concentración requerida	1 Muestra
Buffer de PCR	10 X	1 X	5 µl
Cl <sub>2</sub> Mg	50 mM	2.5 y 3 mM	2.5 y 3 µl
dNTPs	10 mM	0.2 mM	1 µl
Primer Forward	15 µM	2.5 µM	4.16 µl
Primer Reverse	15 µM	2.5 µM	4.16 µl
Taq DNA polimerasa	5 U/µl	1.25 U	0.25 µl
DNA	-	-	50, 80 y 100 ng
Volumen de reacción	-	-	25 µl

**Fuente:** Fichas de recolección de datos.**Autor:** Cristina N. Manzaba Jiménez.**Figura 7:** Corrida electroforética del ensayo 1 de PCR.**Autor:** Cristina N. Manzaba Jiménez.

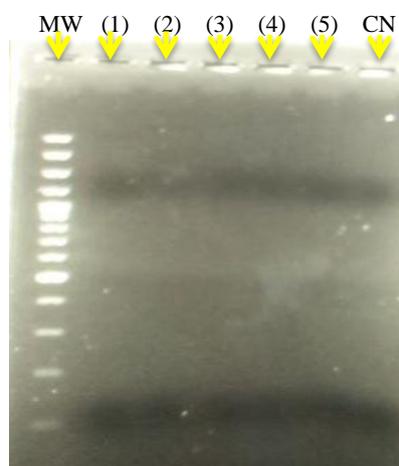
MW: Marcador de peso molecular 100 – 3000 pb; Línea 1: 2.5 mM de Cl<sub>2</sub>Mg y 50 ng de ADN; Línea 2: 2.5 mM de Cl<sub>2</sub>Mg y 80 ng de ADN; Línea 3: 2.5 mM de Cl<sub>2</sub>Mg y 100 ng de ADN; Línea 4: 3 mM de Cl<sub>2</sub>Mg y 50 ng de ADN; Línea 5: 3 mM de Cl<sub>2</sub>Mg y 80 ng de ADN; Línea 6: 3 mM de Cl<sub>2</sub>Mg y 100 ng de ADN y CN: Control Negativo.

**Interpretación:**

Se realizó el primer ensayo de la PCR utilizando: Buffer de PCR 1 X; dNTPs 0.2 mM; Primers 2.5 µM; Taq DNA polimerasa 1.25 U; concentraciones variables de Cl<sub>2</sub>Mg (2.5 y 3 mM) y ADN de *L. guyanensis* (50, 80 y 100 ng), para un volumen final de 25 µl sin observar amplificación en la electroforesis (Ver figura 7).

**Tabla 5.***Ensayo 2 de PCR.*

	Concentración Stock	Concentración requerida	1 Muestra
Buffer de PCR	10 X	1 X	5 µl
Cl <sub>2</sub> Mg	50 mM	2 y 2.5 mM	2 y 2.5 µl
dNTPs	10 mM	0.2 mM	1 µl
Primer Forward	15 µM	0.5 µM	1.6 µl
Primer Reverse	15 µM	0.5 µM	1.6 µl
Taq DNA polimerasa	5 U/µl	1 U	0.2 µl
DNA	-	-	60, 80, 100 ng
Volumen de reacción	-	-	50 µl

**Fuente:** Fichas de recolección de datos.**Autor:** Cristina N. Manzaba Jiménez.**Figura 8:** Corrida electroforética del ensayo 2 de PCR.**Autor:** Cristina N. Manzaba Jiménez.

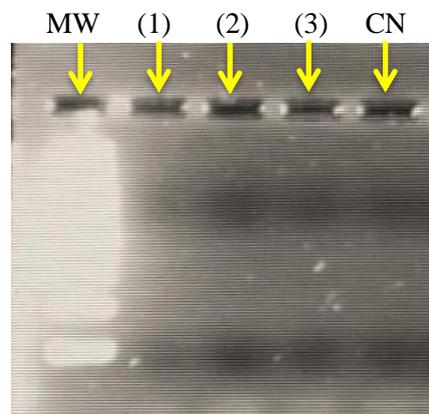
MW: Marcador de peso molecular 100 – 3000 pb; Línea 1: 2 mM de Cl<sub>2</sub>Mg y 60 ng de ADN; Línea 2: 2 mM de Cl<sub>2</sub>Mg y 80 ng de ADN; Línea 3: 2 mM de Cl<sub>2</sub>Mg y 100 ng de ADN; Línea 4: 2.5 mM de Cl<sub>2</sub>Mg y 80 ng de ADN; Línea 5: 2.5 mM de Cl<sub>2</sub>Mg y 100 ng de ADN; y CN: Control Negativo.

**Interpretación:**

En el segundo ensayo de la PCR se utilizó: Buffer de PCR 1 X; dNTPs 0.2 mM; concentraciones variables de Cl<sub>2</sub>Mg (2 y 2.5 mM); ADN de *L. guyanensis* (60, 80 y 100 ng); se cambió la concentración de los primers de 2.5 a 0.5 µM y de la Taq DNA polimerasa de 1.25 a 1 U sin observar amplificación en la electroforesis (Ver figura 8).

**Tabla 6***Ensayo 3 de PCR.*

	Concentración Stock	Concentración requerida	1 Muestra
Buffer de PCR	10 X	1 X	5 µl
Cl <sub>2</sub> Mg	10 mM	2 mM	10µl
dNTPs	10 mM	0.2 mM	1 µl
Primer Forward	15 µM	0.6 µM	2 µl
Primer Reverse	15 µM	0.6 µM	2 µl
Taq DNA polimerasa	5 U/µl	1.5 U	0.3 µl
DNA	-	-	60, 80 y 100 ng
Volumen de reacción	-	-	50 µl

**Fuente:** Fichas de recolección de datos.**Autor:** Cristina N. Manzaba Jiménez.**Figura 9:** Corrida electroforética del ensayo 3 de PCR.**Autor:** Cristina N. Manzaba Jiménez.

MW: Marcador de peso molecular 100 – 3000 pb; Línea 1: 60 ng de ADN; Línea 2: 80 ng de ADN; Línea 3: 100 ng de ADN; y CN: Control Negativo.

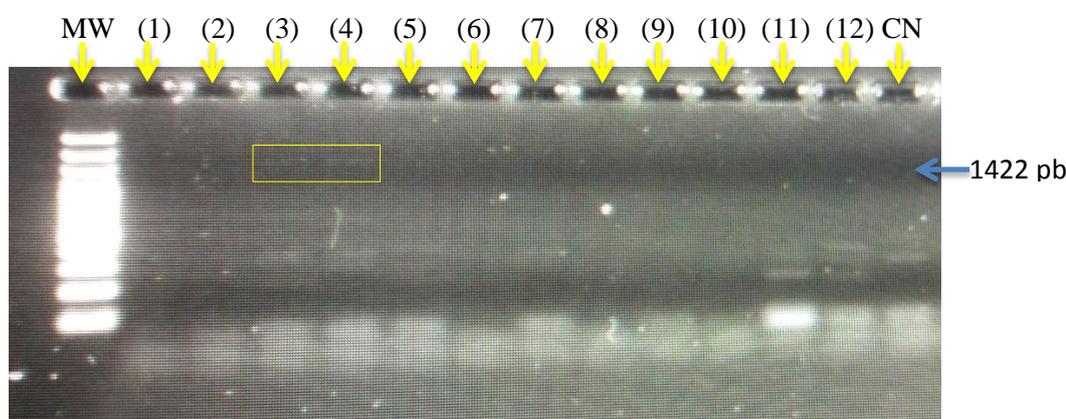
**Interpretación:**

En el tercer ensayo de la PCR se utilizó: Buffer de PCR 1 X; dNTPs 0.2 mM; Cl<sub>2</sub>Mg 2 mM; primers 0.6 µM; Taq DNA polimerasa 1 U y ADN de *L. guyanensis* (60, 80 y 100 ng) sin observar amplificación en la electroforesis (Ver figura 9).

**Tabla 7**

Ensayo 4 de PCR.

	Concentración Stock	Concentración requerida	1 Muestra
Buffer de PCR	10 X	1 X	5 µl
Cl <sub>2</sub> Mg	10 mM	2.5 mM	12.5 µl
dNTPs	10 mM	0.2 mM	1 µl
Primer Forward	15 µM	0.4, 05, 06 µM	1.33, 1.66, 2 µl
Primer Reverse	15 µM	0.4, 05, 06 µM	1.33, 1.66, 2 µl
Taq DNA polimerasa	5 U/µl	1 U	0.2 µl
DNA	-	-	50, 60, 70, 80 ng
Volumen de reacción	-	-	50 µl

**Fuente:** Fichas de recolección de datos.**Autor:** Cristina N. Manzaba Jiménez.**Figura 10:** Corrida electroforética del ensayo 4 de PCR.**Autor:** Cristina N. Manzaba Jiménez.

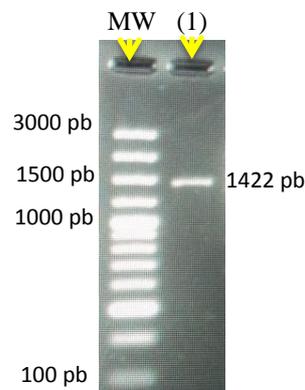
MW: Marcador de peso molecular 100 – 3000 pb; Línea 1: 0.4 µM de primers y 50 ng de ADN; Línea 2: 0.4 µM de primers y 60 ng de ADN; Línea 3: 0.4 µM de primers y 70 ng de ADN; Línea 4: 0.4 µM de primers y 80 ng de ADN; Línea 5: 0.5 µM de primers y 50 ng de ADN; Línea 6: 0.5 µM de primers y 60 ng de ADN; Línea 7: 0.5 µM de primers y 70 ng de ADN; Línea 8: 0.5 µM de primers y 80 ng de ADN; Línea 9: 0.6 µM de primers y 50 ng de ADN; Línea 10: 0.6 µM de primers y 60 ng de ADN; Línea 11: 0.6 µM de primers y 70 ng de ADN; Línea 12: 0.6 µM de primers y 80 ng de ADN; y CN: Control Negativo.

**Interpretación:**

En el cuarto ensayo de la PCR se utiliza: Buffer de PCR 1 X; dNTPs 0.2 mM; Taq DNA polimerasa 1 U; Cl<sub>2</sub>Mg 2.5 mM; concentraciones variables de: primers (0.4, 0.5, 0.6 µM) y ADN de *L. guyanensis* (50, 60 70 y 80 ng), nótese que en la línea 3 y 4 existe la leve formación de una banda a la altura de 1422 pb, por lo que se decide realizar una nueva PCR con primers a una concentración de 0.4 µM (Ver figura 10).

**Tabla 8.***Ensayo 5 de PCR.*

	Concentración Stock	Concentración requerida	1 Muestra
Buffer de PCR	10 X	1 X	5 µl
Cl <sub>2</sub> Mg	10 mM	2.5 mM	12.5 µl
dNTPs	10 mM	0.2 mM	1 µl
Primer Forward	15 µM	0.4 µM	2.6 µl
Primer Reverse	15 µM	0.4 µM	2.6 µl
Taq DNA polimerasa	5 U/µl	1. U	0.2 µl
DNA	-	-	80 ng
Volumen de reacción	-	-	50 µl

**Fuente:** Fichas de recolección de datos.**Autor:** Cristina N. Manzaba Jiménez.**Figura 11:** Corrida electroforética del ensayo 5 de PCR.**Autor:** Cristina N. Manzaba Jiménez.

MW: Marcador de peso molecular 100 – 3000 pb; Línea 1: 0.4 µM de primers y 80 ng de ADN.

**Interpretación:**

En el quinto ensayo de la PCR realizado, se utilizan las concentraciones presentes en la tabla 8, con la correspondiente amplificación de una banda de 1422 pb (Ver figura 11).

**Tabla 9.***Parámetros óptimos para el protocolo de la PCR.*

	<b>Concentración Stock</b>	<b>Concentración requerida</b>	<b>1 Muestra</b>
Buffer de PCR	10 X	1 X	5 µl
Cl <sub>2</sub> Mg	50 mM	2.5 mM	2.5 µl
dNTPs	10 mM	0.2 mM	1 µl
Primer Forward	15 µM	0.4 µM	1.3 µl
Primer Reverse	15µM	0.4 µM	1.3 µl
Taq DNA polimerasa	5 U/µl	1 U	0.2 µl
DNA	-	-	80 ng
Volumen de reacción	-	-	50 µl

**Fuente:** Fichas de recolección de datos.**Autor:** Cristina N. Manzaba Jiménez.**Interpretación:**

Se optimizó la reacción en cadena de la polimerasa en base a investigaciones realizadas por varios autores. En la presente tabla se indican: la concentración stock, considerada como la solución madre, es la que nos proporciona el fabricante; la concentración requerida, corresponde a la concentración que debemos obtener para realizar PCR y finalmente el volumen que debemos tomar de la solución stock para obtener la concentración requerida en los 50ul del volumen de reacción.

Para determinar los parámetros óptimos de la PCR se probaron concentraciones variables de: primers (0,4; 0,5; 0,6; 0,8 µM); Cl<sub>2</sub>Mg (1.5; 2; 2.5; 3 mM); Taq polimerasa (1, 1.25, 1.5 U) y ADN (30, 40, 50, 60, 70, 80, 100 ng), considerando óptimos aquellos en los que se observó la presencia de una banda a la altura de 1422 pb.

**Tabla 10.**

*Programa de amplificación en el termociclador para la PCR.*

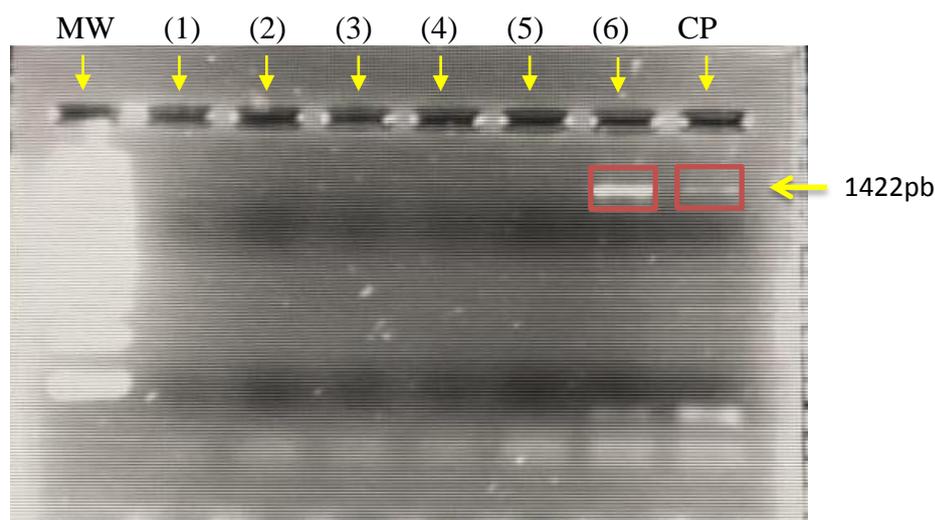
Pasos	Nro. de ciclos	Tiempo	Temperatura
Desnaturalización inicial	1	5 min	94 °C
Desnaturalización	33	30 seg	94 °C
Hibridación	33	1 min	65 °C
Extensión	33	3 min	72 °C
Extensión final	1	10 min	72 °C
Infinito	-		4 °C

**Fuente:** Fichas de recolección de datos.

**Autor:** Cristina N. Manzaba Jiménez.

### Interpretación:

En la presente tabla se determinó el número de ciclos, el tiempo y la temperatura necesarios para obtener amplicones según el tamaño del fragmento deseado.



**Fuente:** Fichas de recolección de datos.

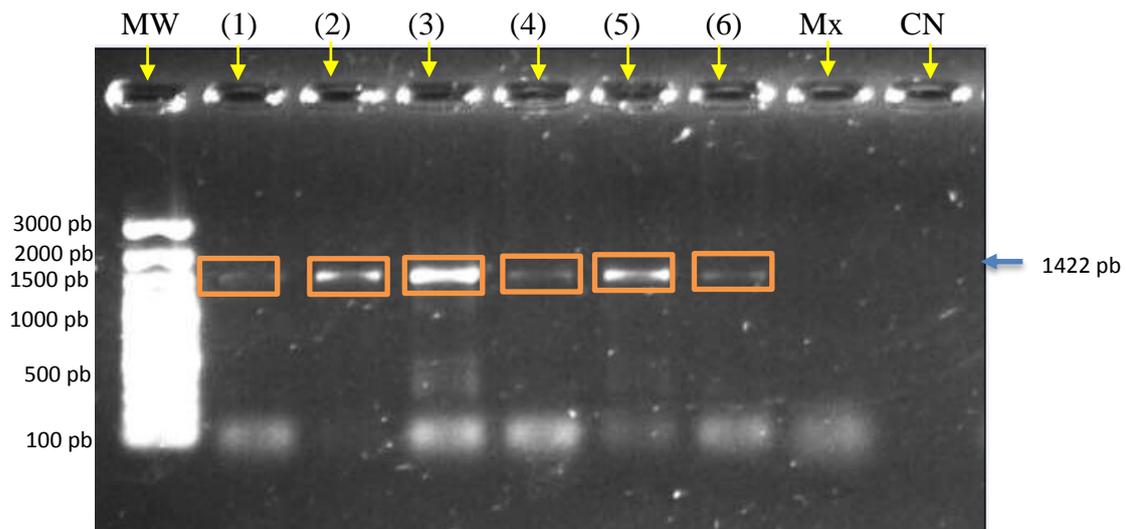
**Autor:** Cristina N. Manzaba Jiménez.

**Figura 4:** Diluciones de ADN.

MW: Marcador de peso molecular 100 – 3000 pb; Línea 1: 30 ng de ADN; Línea 2: 40 ng de ADN; Línea 3: 50 ng de ADN; Línea 4: 60 ng de ADN; Línea 5: 70 ng de ADN; Línea 6: 80 ng de ADN y CP: Control Positivo.

### Interpretación:

Se realizó diluciones de la muestra de *L. guyanensis* para determinar a partir de que concentración de ADN se observa amplificación, nótese la formación de una banda de 1422 pb al utilizar 80 ng de ADN. Se utilizó ADN de *L. naiffi* como control positivo.



**Figura 5:** Electroforesis de 6 muestras control de Leishmania.

**Autor:** Cristina N. Manzaba Jiménez.

**Fuente:** Fichas de recolección de datos.

MW: Marcador de peso molecular 100 – 3000 pb; Línea 1: *Leishmania braziliensis*; Línea 2: *Leishmania ecuatoriensis*; Línea 3: *Leishmania guyanensis*; Línea 4: *Leishmania major-like*; Línea 5: *Leishmania mexicana*; Línea 6: *Leishmania naiffi*; Mx: Control del mix y CN: Control Negativo.

### Interpretación:

Se realizó una corrida electroforética, determinando que el método cuenta con reproductibilidad analítica, pues la PCR fue realizable para las 6 cepas control utilizadas. Obsérvese que la intensidad de las bandas obtenidas es directamente proporcional a la concentración de ADN presente en la tabla 1; de este modo *L. braziliensis* ubicada en la línea 1 presenta una banda a la altura de 1422 pb apenas notoria, mientras que *L. guyanensis* ubicada en la línea 3 refleja una banda bastante intensa.

## 7. DISCUSIÓN

Las diferentes especies de *Leishmania* surgidas a lo largo de la evolución, e incluso algunas de sus variantes genéticas, se pueden identificar con el uso de herramientas moleculares como la PCR (Montalvo, Fraga, Montano, & Monzote, 2016).

En los resultados obtenidos por Montalvo (2011), el método de extracción de ADN utilizado, así como la concentración de algunos reactivos para la PCR son similares a las nuestras; excepto los primers, quien a diferencia de nuestra investigación, utiliza una concentración de 0.8  $\mu\text{M}$  (Montalvo, Fraga, Maes, & Dujardin, 2011). En el año 2016, la misma autora, empleó concentraciones iguales a las utilizadas en nuestro estudio, incluidos los 0.4  $\mu\text{M}$  de primers para la PCR y adicionalmente, utiliza 0.25 % de DMSO. Esta variación en la concentración de los primers podría deberse a que en el año 2011, Montalvo utilizó muestras procedentes de raspados, biopsias, necesitando mayor cantidad de primers; mientras que, en el trabajo publicado en el 2016, similar al nuestro, se usó muestras directamente de cultivos en fase estacionaria de crecimiento (Montalvo, Fraga, Montano, & Monzote, 2016).

En 2012 Cardoso da Graça, utiliza las mismas concentraciones y condiciones para la PCR utilizadas en el presente trabajo; pero con diferencia en que la extracción de ADN se realiza utilizando el The Wizard<sup>TM</sup> Genomic DNA Purification System (Promega, Madison, WI, USA). La variación en el método de extracción, podría deberse a que mediante la extracción con fenol – cloroformo aplicada en nuestro estudio, el tiempo de realización oscila entre 6 o 7 horas, mientras que con el kit utilizado por Cardoso, el tiempo empleado no supera las 3 horas, y, además por el uso de minicolumnas con filtros puede obtenerse ADN de mejor calidad (Da Silva & Santos de Sousa, 2010).

G Van der Auwera (2013), similar a nuestro estudio para la PCR utilizó: Buffer de PCR 1 X; dNTPs 0.2 mM; Primers 0.4  $\mu$ M; Taq DNA polimerasa 1 U, excepto en el  $\text{Cl}_2\text{Mg}$  quien a diferencia de nosotros (2.5 mM) utilizó 1 mM, y el volumen total de reacción en este caso, fue de 25  $\mu$ l; la diferencia en la concentración del cloruro de magnesio puede deberse a que G Van der Auwera, al utilizar 1 U de Taq polimerasa en un volumen de 25  $\mu$ l, no necesitó una alta concentración de  $\text{Cl}_2\text{Mg}$  para potenciar la actividad de la enzima, mientras que en nuestro estudio al utilizar un volumen de reacción mayor (50  $\mu$ l), se requirió mayor concentración de  $\text{Cl}_2\text{Mg}$  para potenciar 1 U de la Taq polimerasa. (Auwera, y otros, 2013).

Los resultados obtenidos en la presente investigación son de gran importancia en el diagnóstico genético básico de leishmania, permitiendo a estudiantes y docentes pertenecientes al Macro proyecto, tener la seguridad de obtener resultados exactos y precisos al utilizar los protocolos normalizados.

## 8. CONCLUSIONES

- Los resultados obtenidos en el diseño del protocolo de extracción de ADN, sugieren que la extracción con fenol-cloroformo es un método fiable, pues los valores obtenidos en cantidad y calidad son útiles y adecuados para realizar la PCR en base a la proteína Hsp70.
- El protocolo de PCR, se normalizó utilizando las siguientes concentraciones: Buffer de PCR 1 X;  $Cl_2Mg$  2.5 mM; dNTPs 0.2 mM; Primers 0.4  $\mu$ M; Taq DNA polimerasa 1 U y 80 ng de DNA, para un volumen total de 50  $\mu$ l, sin utilizar DMSO, determinando que el protocolo fue aplicable al 100 % de las muestras analizadas, con formación de una banda a la altura de 1422 pb.
- Se realiza la difusión de resultados a docentes y estudiantes de la carrera de laboratorio clínico.

## 9. RECOMENDACIONES

- Previa la realización de la PCR se recomienda congelar los tubos eppendorf a  $-20^{\circ}\text{C}$ , para evitar su evaporación durante los cambios de temperatura en el termociclador.
- Usar la técnica de extracción manual de ADN, pues la técnica, tiene como beneficio el ahorro de tiempo y disminución de costos, pues se puede realizar con reactivos presentes en laboratorios de investigación con requerimientos básicos sin tener que esperar el tiempo destinado para el trámite y compra del kit.
- En el proceso de extracción de ADN, reactivos como el fenol – cloroformo - alcohol isoamílico tienen una viabilidad de corta duración, por lo que se recomienda realizarlo en el momento previo a ser utilizado.

## 10. BIBLIOGRAFÍA

- Andrade, P., & Cruz, J. (1999). Leishmaniasis cutánea y mucocutánea. *Medicina*, 454 - 459 .
- Auwers, V. d., Maes, I., De Doncker, S., Ravel, C., Cnops, L., Esbroeck, V., y otros. (25 de Julio de 2013). Heat-shock protein 70 gene sequencing for Leishmania species typing in European tropical infectious disease clinics. *Euro Surveill.*, 1453–1461. doi 10.1007/s10096-011-1463-z.
- Becerril, M. (2008). *Parasitología Médica* (Segunda ed.). (C. Heras, Ed.) México: McGraw-Hill. ISBN 10: 970-10-6528-X
- Botero, D., & Restrepo, M. (2012). *Parasitosis Humana* (Quinta ed.). (D. Botero, & M. Restrepo, Edits.) Medellín, Colombia: CIB Corporación para Investigaciones Biológicas. ISBN: 978-958-9076-77-4
- Calvopina, M., Armijos, R., & Hashiguchi, Y. (2004). Epidemiology of Leishmaniasis in Ecuador: Current Status of knowledge - A review. *Memorias del Instituto Oswaldo Cruz*, 199(7), 663-62. doi.org/10.1590/S0074-02762004000700001.
- Cardoso da Graça, G., Volpini, A., Sierra, G., Hueb, M., Porrozzini, R., Côrtes, M., y otros. (Agosto de 2012). Development and validation of PCR-based assays for diagnosis of American cutaneous leishmaniasis and identification of the parasite species. *107* (5), 664 - 674.
- Carmelo, E., Zurita, A., González, A., Martínez, E., & Valladares. (2006). Proteínas de choque térmico en parásitos: la Hsp70 y el sistema inmune. *Revista Ibérica de Parasitología*, 39-46.

CDC Diagnosis of Leishmaniasis. (Mayo de 2014). Recuperado el 10 de Marzo de 2018, de [https://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/resources/pdf/cdc\\_diagnosis\\_guide\\_leishmaniasis.pdf](https://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/resources/pdf/cdc_diagnosis_guide_leishmaniasis.pdf)

Cupolillo, E. (18 - 24 de Mayo de 2009). Manual de Procedimientos moleculares. *Instituto Oswaldo Cruz*, 11 - 24. doi 10.1016/j.meegid.2009.11.001

Da Silva, L. A., Santos de Sousa, C., Cardoso da Graca, G., Porrozzi, R., & Cupolillo, E. (2010). Sequence analysis and PCR-RFLP profiling of the hsp70 gene as a valuable tool for identifying *Leishmania* species associated with human leishmaniasis in Brazil. *ELSEVIER*, 77 - 83. doi 10.1016/j.meegid.2009.11.001.

Garcia, L., Kindt, A., & Dujardin, J.-C. (2004). Culture-Independent Species Typing of Neotropical *Leishmania* for Clinical Validation of a PCR-Based Assay Targeting Heat Shock Protein 70 Genes. *Journal of clinical Microbiology*, 42(5), 2294 - 2297. DOI: 10.1128/JCM.42.5.2294-2297.

Granda, J. (Julio de 2017). ANUARIO DE VIGILANCIA EPIDEMIOLOGICA 1994 - 2016 Enfermedades de la Piel. *Dirección Nacional de Vigilancia Epidemiológica MSP*.

Green, M. (2012). Molecular Cloning: A laboratory Manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, 21 - 82.

Karp, G. (2014). *Biología Celular y Molecular* (Septima ed.). (J. Fraga, Ed., & M. E. Araiza Martínez, Trad.) México: MCGRAW-HILL INTERAMERICANA. ISBN: 978-607-15-1137-9

- Kayama, M. (3 de Marzo de 2012). Heat Shock Protein 70 (HSP70) Is Critical for the Photoreceptor Stress Response after Retinal Detachment via Modulating Anti-Apoptotic Akt Kinase. *The American Journal of Pathology*, 178(3). DOI. 10.1016/j.ajpath.2010.11.07249
- Jimenez, D. (2015). Leishmaniasis. *Revista medica de costa rica y centroamerica LXXII*, 614, 129 - 133.
- Méndez, C. (2014). Cuantificación de la carga parasitaria de leishmaniasis cutánea mediante PCR en tiempo real. 53 - 55.
- Merida, F., & Moreno, E. (2015). *Manual para Técnico Superior de Laboratorio Clínico y Biomédico* (Quinta ed.). España: Panamericana. ISBN 978-84-9835-423-2
- Meštrović, T. (27 de Abril de 2016). *News Medical*. Recuperado el 19 de Enero de 2018, de [https://www.news-medical.net/health/Tropical-Skin-Infections-\(Spanish\).aspx](https://www.news-medical.net/health/Tropical-Skin-Infections-(Spanish).aspx)
- Montalvo, A., Fraga, J., & Lianet, M. (Mayo - Agosto de 2012). Diagnóstico de la leishmaniasis: de la observación microscópica del parásito a la detección del ADN. *Revista Cubana de Medicina Tropical.*, 64(2), 108-131.
- Montalvo, A., Fraga, J., Aylema, J., Monzote, L., Montano, I., & Dujardin, J. (18 de Agosto de 2006). PCR-RFLP/Hsp70 para identificar y tipificar *Leishmania* de la región neotropical. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, 58(3), 1561-3054.
- Montalvo, A., Fraga, J., Maes, I., & Dujardin, J. V. (15 de Noviembre de 2011). Three new sensitive and specific heat-shock protein 70 PCRs for global *Leishmania* species identification. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.*, 1453 - 1461.

- Montalvo, A., Fraga, J., Montano, I., & Monzote, L. (2016). Identificación molecular con base en el gen hsp70 de aislamientos clínicos de *Leishmania* spp. en Colombia. *Biomédica*, 36(1), 37-44. DOI: <https://doi.org/10.7705/biomedica.v36i2.2688>
- Montalvo, A., Fraga, J., Montano, I., Monzote, G., Marin, M., & Muskus, G. V.-C. (15 de Marzo de 2010). Differentiation of *Leishmania* (*Viannia*) *panamensis* and *Leishmania* (*V.*) *guyanensis* using BccI for hsp70 PCR-RFLP. *Tropical Medicine e Higiene*, 104(5), 364-367. doi: 10.1016/j.trstmh.2009.12.002vv
- Montalvo, Fraga, J., Monzote, L., & Montano, I. (5 de Mayo de 2010). Heat-shock protein 70 PCR-RFLP: a universal simple tool for *Leishmania* species discrimination in the New and Old World. *Cambridge University Press*, 137, 1159 - 1168. DOI: 10.1017/S0031182010000089
- Murray, P., Rosenthal, K., & Pfaller, M. (2016). *Microbiología Médica*. España: Elsevier.
- Organization World Health, W. (23 de Septiembre de 2016). *Neglected tropical diseases*. Recuperado el 18 de Julio de 2018, de [http://www.who.int/neglected\\_diseases/news/WHO\\_and\\_Gilead\\_Sciences\\_extend\\_collaboration/en/](http://www.who.int/neglected_diseases/news/WHO_and_Gilead_Sciences_extend_collaboration/en/)
- SNEM. (Marzo de 2013). Proyecto de Vigilancia y Control de Vectores para la prevención de la transmisión de enfermedades metaxénicas en el Ecuador 2013-2017. *Ministerio de Salud Pública*, 29 - 33.
- Uribarren, T. (4 de Julio de 2016). *UNAM*. Recuperado el 10 de Febrero de 2018, de <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/parasitologia/leishmaniosis.html>

Zambrano, P. (11 de Junio de 2014). Protocolo de Vigilancia en Salud Pública (LEISHMANIASIS). (M. Mercado, Ed.) *Instituto Nacional de Salud*, 2(1), 1-29.

## k. ANEXOS

## Anexo 1: Autorización de uso de laboratorio.



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA**  
**Dirección de Investigación**  
**Facultad de la Salud Humana**  
**Carrera de Laboratorio Clínico**

*Proyecto Identificación genética de especies de Leishmania en zonas endémicas de la Región Sur del Ecuador (03-DI-FSH)*

**Of. N° 008-2018-03-DI-FSH -UNL**

Loja, 13 de marzo de 2018

Doctor  
 Nikolay Aguirre Mendoza  
**DIRECTOR DE INVESTIGACIÓN-UNL**  
 Ciudad.

RECIBIDO

***Ref.: Apoyo de Laboratorio de Biología Molecular en desarrollo Proyecto Leishmania.***

De mi consideración:

Con un cordial saludo me dirijo a su autoridad para solicitar, de la manera más comedida, se autorice el uso del Laboratorio de Biología Molecular del Centro de Biotecnología de la UNL para desarrollar las fase de validación de metodologías para la identificación genética de especies de leishmania aisladas durante la ejecución del *Proyecto Identificación genética de especies de Leishmania en zonas endémicas de la Región Sur del Ecuador.*

Las actividades descritas serán desarrolladas por tesis de la Carrera de Laboratorio Clínico de nuestra universidad, señoritas Janeth Alexandra Ochoa Romero, Yadira Elizabeth Lapo Paredes, Gina Stéfany Jaramillo Balcázar, Cristina Nathaly Manzaba Jiménez y Viviana Del Carmen Quevedo Ordoñez.

Por la atención a la presente le antelo mis agradecimientos.

Atentamente,

  
 Dr. Luis Morucho Yaguana, Mg. Sc.  
 Docente CLC -UNL  
 Director Proy. Leishmania



U. N. L. DIRECCIÓN GENERAL DE INVESTIGACIONES  
 RECIBIDO POR .....  
 POR .....  
 FECHA ..... 13 MAR 2018

Mail: [luis.moruchos@unl.edu.ec](mailto:luis.moruchos@unl.edu.ec)

Dirección: Avenida Pío Jaramillo Alvarado y Reinaldo Espinosa, La Argelia. Sede: Laboratorio de Análisis Químico.  
 Teléfono: 07 2571379, ext. 124 (mañana), 07 2547878 (tarde). Celular: 09 91949639



### REACCION EN CADENA DE POLIMERASA

MATERIALES	STOCK	1X									
Fecha											
MgCl <sub>2</sub>	15 mM										
dNTP mix	2.5 mM										
primer HSP70FOR	10 μM										
primer HSP70REV (10 μM)	10 μM										
<i>Taq polimerasa</i>	5U/μl										
H <sub>2</sub> O destilada											
Volumen total de reacción											

### ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA

FECHA DE REALIZACIÓN	CONCENTRACIÓN DEL GEL	SYB*R SAFE (ul)	ADN (ul)	VOLTAJE	TIEMPO DE CORRIDA

**Anexo 3:** Medio bifásico Novy-MCNeal-Nicolle (NNN)

 <p><b>UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA</b></p> <p><b>Laboratorio de Fitoquímica UNL</b></p>	<p><b>Protocolo para preparación de medio bifásico Novy-MCNeal- Nicolle (NNN)</b></p>	<b>Código:</b> CBT-008	
		<b>Revisión:</b> 01	<b>Edición:</b> 01
		<b>Fecha:</b> 25-04-2018	

**1. OBJETIVO**

Preparar un medio adecuado para la proliferación exponencial de promastigotes de leishmania spp.

**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**

El medio NNN (Novy-MCNeal-Nicolle) es un medio común y mundialmente conocido para el aislamiento del agente del género Leishmania, que causa Leishmaniasis (cutánea, mucocutánea o visceral). El cultivo de este organismo en un medio adecuado da lugar a la forma móvil, extracelular llamada, promastigote.

**4. MATERIALES****Materiales:**

- Agar Cerebro Corazón. (4.4 mg)
- Agua destilada. (86 ml)
- Sangre desfibrinada de conejo. (15 ml)
- Gentamicina solución 10 mg/ml. (1 ml)
- Probeta 50 ml. (1)
- Pipeta serológica o jeringa 1 ml. (1)
- Propipeta. (1)
- Tubos cónicos tapa rosca 15 ml. (1)

**Nota:** Concentración final de Gentamicina 100 – 200 mg/L de medio de cultivo.

**Equipos:**

- Balanza analítica. (1)
- Plancha calefactora. (1)
- Autoclave. (1)
- Cabina de bioseguridad. (1)

**5. PROCEDIMIENTO**

- a. Pesar cuatro gramos de agar cerebro corazón.
- b. Disolver en 86 ml de agua destilada calentando en una plancha calefactora.
- c. Esterilizar en autoclave a 121 °C de temperatura durante 15 minutos y esperar hasta que el medio se tempere.
- d. En el interior de una campana de flujo laminar vertical de bioseguridad clase II. Añadir 15 ml de sangre de conejo desfibrinada al medio de cultivo y 1 ml de solución de Gentamicina 10 mg/ml).
- e. Distribuir 2 a 2,5 ml del medio de cultivo preparado en tubos de 15 ml con tapa rosca y dejar enfriar en soportes con un ángulo de 25°.
- f. Cuando el agar haya solidificado, inmediatamente, poner a refrigerar durante unos 15 – 20 min, y luego colocar los tubos en una incubadora a 37° C para control de esterilidad.
- g. Conservar el medio preparado hasta el momento de utilizar en un refrigerador a 4 °C, por no más de 6 meses (Microbe Online, 2016).

**6. REFERENCIAS**

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

**Anexo 4:** Cuantificación de parásitos en cámara de Neubauer

 <p><b>UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA</b></p> <p><b>Laboratorio de Fitoquímica UNL</b></p>	<p><b>Protocolo para cuantificación de parásitos en cámara de Neubauer</b></p>	<b>Código:</b> CBT-009	
		<b>Revisión:</b> 01	<b>Edición:</b> 01
		<b>Fecha:</b> 22 -12-2018	

**1. OBJETIVO**

Determinar el número de parásitos, del cual vamos a partir para el proceso de extracción de ADN de Leishmania.

**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**

La cuantificación de parásitos de leishmania es importante en nuestro proyecto para poder definir la densidad parasitaria presente en el cultivo previo a la extracción de AND.

**4. MATERIALES****Muestra:**

- Fase líquida del medio de cultivo. (10 µl)

**Reactivos:**

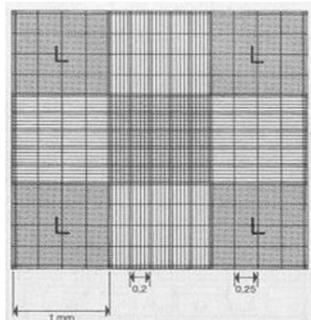
- Azul de toluidina (1 µl)
- Agua ultra pura (90 µl)

**Equipos:**

- Cámara de Neubauer
- Pipeta automática 10 – 100ul.

## 5. PROCEDIMIENTO

- a. Tomar diez microlitros de cultivo original de los parásitos.
- b. Realizar una dilución de 1/10 con agua ultra pura.
- c. Tomar 10 $\mu$ l de la dilución y 1 $\mu$ l de azul de toluidina para evidenciar viabilidad.
- d. Colocar en cada cuadrante la dilución para realizar el conteo de parásitos en los 5 cuadrantes dentro y sobre las líneas de la cámara. Si se presentan rosetas estas serán contadas como un parásito.
- e. Utilizar las siguientes fórmulas para obtener el número total de parásitos en el cultivo original:
  - Recuento de cámara superior + Recuento de cámara inferior = recuento total de parásitos por 10 cuadrados.
  - Recuento total de parásitos en 10 cuadros/2=Recuento promedio en cada cámara.
  - Recuento promedio en cada cámara ( $5 \times 10^4$ ): \_\_\_\_ factor de dilución =  
Número de parásitos/ml
  - El número total de parásitos en el medio original es: \_\_\_\_ parásitos/ml \*  
\_\_(ml volumen de cultivo)= \_\_\_\_\_ Total de parásitos en la caja de cultivo (Pontificia Universidad Javeriana, 2014).



**Anexo 5:** Preparación de tampón Tris – EDTA (TE).

 <p><b>UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA</b> Centro de Biotecnología UNL</p>	<p><b>Protocolo para preparación de Tris EDTA pH 8.</b></p>	<b>Código:</b> CBT-004	
		<b>Revisión:</b> 01	<b>Edición:</b> 01
		<b>Fecha:</b> 15-05-2018	

**1. OBJETIVO:**

Preparar tampón TE pH 8.

**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:**

Él TE actúa como un Buffer de suspensión del ADN.

**4. MATERIALES:**

- Tris Base. PM= 121.14 gr
- EDTA + 2 H<sub>2</sub>O. PM= 372.24 gr

**5. PROCEDIMIENTOS:**

**Procedimiento:** TE pH 8

**5.1 Tampón Tris – HCl:** 400 ml 1M, pH 8.

**1 M:** 121.14 gr en 1000 ml  $\cong$  12.114 gr en 100 ml

12.114\*4= **48.456 gr en 400 ml**

- a. Pesar 48.4 gr de Tris base en una balanza analítica.
- b. Añadir los 48.4 gr de Tris base en un matraz con 300 ml de agua destilada.
- c. Colocar el imán dentro del matraz.
- d. Hacer funcionar el agitador magnético hasta que la solución se encuentre completamente disuelta.
- e. Introducir el electrodo del medidor de pH para medir el pH de la solución (Tris base tiene pH alcalino).

- f. Diluir HCl 1:2 (10 ml de HCl y 10 ml de agua destilada) y añadir a la solución hasta que alcance un pH de 8.0.
- g. Completar los 400 ml con agua destilada.
- h. Colocar en un recipiente y rotular nombre, concentración y fecha de elaboración.

### 5.2 EDTA + 2H<sub>2</sub>O: 50 ml 0.5 M, pH 8.

$$1\text{M: } 372.24 \text{ gr en } 1000 \text{ ml} \cong 37.224 \text{ gr en } 100 \text{ ml}$$

$$37.224 \text{ gr} / 2 = \mathbf{18.612 \text{ gr en } 50 \text{ ml}}$$

$$0.5: \quad 18.612 \text{ gr}/2 \text{ en } 50 \text{ ml} = 9.306 \text{ gr en } 50 \text{ ml} \cong \mathbf{9.3 \text{ gr en } 50 \text{ ml}}$$

- a. Pesar 9.3 gr de EDTA en una balanza analítica.
- b. Añadir los 9.3 gr de EDTA en un matraz con 35 ml de agua destilada
- c. Colocar el imán dentro del matraz.
- d. En un recipiente calentar agua, y sobre el recipiente colocar el matraz.
- e. Hacer funcionar el agitador magnético.
- f. Añadir Hidróxido de sodio (NaOH) hasta que la solución alcance el pH 8.
- g. Completar los 50 ml.
- h. Colocar en un recipiente y rotular nombre, concentración, pH y fecha de elaboración.

### 5.3 TE

Reactivo	Concentración inicial	Concentración final
Tris-HCl	1 M	10 mM
EDTA	0.5 M	1 mM

**(Tampón Tris - EDTA): 50 ml pH 8**

#### 5.3.1 Dilución de muestras:

##### 1 M Tris-HCl pH 8

$$(1000 \text{ mM}) \xrightarrow{1/100} 10 \text{ mM}$$

$$10/1000 = 50 \text{ ml} \times 1/100 = 0.5 \text{ ml} \cong 500 \text{ } \mu\text{l en } 50 \text{ ml}$$

##### 0.5 M EDTA pH 8

$$1/500$$

(500 mM)  $\xrightarrow{\hspace{10em}}$  1 mM

$$1/500 = 50 \text{ ml} \times 1/100 = 0.1 \text{ ml} \cong 100 \mu\text{l en } 50 \text{ ml}$$

**Agua destilada:** 49.4 ml  $\cong$  49400  $\mu\text{l}$

**Procedimiento:**

- a. En un recipiente agregar 40 ml de agua destilada.
- b. Añadir 500  $\mu\text{l}$  de Tris-HCl.
- c. Añadir 100  $\mu\text{l}$  de EDTA.
- d. Completar los 50 ml (9.4 ml de agua destilada).
- e. Homogenizar.
- f. Colocar en un recipiente y rotular nombre, concentración y fecha de elaboración.

<b>Elaborado por:</b>	<b>Revisado por:</b>	<b>Autorizado por:</b>
Srta. Cristina Manzaba	Dr. Franklin Román	Dr. Luis Morocho

**Anexo 6:** Preparación de Dodecil Sulfato Sódico (SDS) 10%.

 <p><b>UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA</b> Centro de Biotecnología UNL</p>	<p><b>Protocolo para preparación de SDS 10%.</b></p>	<b>Código:</b> CBT-001	
		<b>Revisión:</b> 01	<b>Edición:</b> 01
		<b>Fecha:</b> 14-05-2018	

**1. OBJETIVO:**

Preparar solución de Dodecil Sulfato Sódico al 10%.

**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:**

El Dodecil Sulfato Sódico es un reactivo cuya función es romper la membrana plasmática y nuclear e incluso la pared celular durante la extracción manual de ADN.

1 Mol = Peso Molecular

1 Mol=1000mM

1 Litro = 1000ml

**4. MATERIALES:**

- Dodecil Sulfato Sódico (SDS). PM= 100gr
- Agua destilada.

**5. PROCEDIMIENTOS:**

**1mol SDS = 100 gr/L  $\cong$  100 gr/1000 ml**

**Procedimiento:** 100 ml de solución.

- Pesar 10 gr de SDS en una balanza analítica.
- Añadir los 10 gr de SDS en un matraz con 60 ml de agua destilada.
- Colocar el imán dentro del matraz.

- d. Hacer funcionar el agitador magnético hasta que la solución se encuentre completamente disuelta.
- e. Colocar en un recipiente y rotular nombre, concentración y fecha de elaboración.

<b>Elaborado por:</b>	<b>Revisado por:</b>	<b>Autorizado por:</b>
Srta. Cristina Manzaba	Dr. Franklin Román	Dr. Luis Morocho

**Anexo 7:** Preparación de solución fenol – cloroformo – alcohol isoamílico.

 <p><b>UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA</b> Centro de Biotecnología UNL</p>	<p><b>Protocolo para preparación de solución fenol – cloroformo – alcohol isoamílico.</b></p>	<b>Código:</b> CBT-005	
		<b>Revisión:</b> 01	<b>Edición:</b> 01
		<b>Fecha:</b> 25-05-2018	

**1. OBJETIVO:**

Preparar solución fenol – cloroformo – alcohol isoamílico (25-24-1 partes/ml).

**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:**

**Fenol:** Disolvente orgánico que separa proteínas del ARN.

El **cloroformo** y el **alcohol isoamílico** diluyen a los compuestos covalentes, principalmente lípidos. Además el alcohol isoamílico, controla la formación de espuma.

**4. MATERIALES:**

- Fenol
- 8 hydroxyquinolona (PM= 145.16 gr).
- Cloroformo.
- Alcohol isoamílico.

**5. PROCEDIMIENTOS:**

**Nota:** La solución tiene una viabilidad de corta duración por lo que debe ser preparada en cantidades necesarias para usar el día de preparación.

**5.1 Preparación del fenol pH 8:**

- a. Pesar 10 gr de cristales de fenol en una balanza analítica.

- b. Disolver los cristales en baño maría a 60 o 70°C.
- c. Agregar una pequeña cantidad de 8 Hydroxy-quinolona (evita oxidación del fenol).
- d. Homogenizar hasta que se disuelva.
- e. Añadir HCl 1M, aproximadamente 8 ml o hasta ajustar un pH 8.
- f. Agitar rápidamente durante 5 minutos.
- g. Centrifugar o esperar a que se separen las dos fases.
- h. Descartar el sobrenadante.
- i. Medir el pH con una tirilla.
- j. Repetir los pasos 5, 6, 7, 8 y 9 hasta que la solución alcance un pH de 8.
- k. Añadir 1ml de EDTA 0.5 M, pH 8.
- l. Agitar por un momento.
- m. Conservar a -20°C hasta el momento de uso.

## 5.2 Procedimiento:

- a. Calcular la cantidad de solución a ser utilizada.
- b. Para preparar 1 ml de solución, colocar las siguientes cantidades:

25 partes de fenol:	500 $\mu$ l
24 partes de cloroformo:	448 $\mu$ l
1 parte de alcohol isoamílico:	2 $\mu$ l

- c. Homogenizar y utilizar.

<b>Elaborado por:</b>	<b>Revisado por:</b>	<b>Autorizado por:</b>
Srta. Cristina Manzaba	Dr. Franklin Román	Dr. Luis Morocho

**Anexo 8:** Preparación de solución cloroformo – alcohol isoamílico.

 <b>UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA</b> <b>Centro de Biotecnología UNL</b>	<b>Protocolo para preparación de solución cloroformo – alcohol isoamílico.</b>	<b>Código:</b> CBT-006	
		<b>Revisión:</b> 01	<b>Edición:</b> 01
		<b>Fecha:</b> 25-05-2018	

**1. OBJETIVO:**

Preparar solución cloroformo – alcohol isoamílico (24-1 partes/ml).

**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:**

El cloroformo y el alcohol isoamílico diluyen a los compuestos covalentes, principalmente lípidos. Además el alcohol isoamílico, controla la formación de espuma.

**4. MATERIALES:**

- Cloroformo.
- Alcohol isoamílico.

**5. PROCEDIMIENTOS:****Cloroformo – Alcohol isoamílico (24 – 1 partes/ml)**

**Nota:** La solución tiene una viabilidad de corta duración por lo que debe ser preparada en cantidades necesarias para usar el día de preparación.

**5.1 Procedimiento:**

- a. Calcular la cantidad de solución a ser utilizada.

- b. Para preparar 1ml de solución, en una probeta colocar las siguientes sustancias:

24 partes de Cloroformo: 960  $\mu$ l

1 parte de Alcohol Isoamílico: 40  $\mu$ l

- c. Homogenizar y utilizar.

<b>Elaborado por:</b>	<b>Revisado por:</b>	<b>Autorizado por:</b>
Srta. Cristina Manzaba	Dr. Franklin Román	Dr. Luis Morocho

**Anexo 9:** Preparación de Acetato de sodio ( $\text{CH}_3\text{COONa}$ ) 3 M

 <b>UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA</b> <b>Centro de Biotecnología UNL</b>	<b>Protocolo para preparación de Acetato de sodio 3 M.</b>	<b>Código CBT-003</b>	
		<b>Revisión 01</b>	<b>Edición 01</b>
		<b>Fecha 15-05-2018</b>	

**1. OBJETIVO:**

Preparar solución de Acetato de sodio 3 M.

**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:**

El Acetato de sodio es un tampón para mantener relativamente constante el pH.

**4. MATERIALES:**

- Acetato de sodio (PM= 136.08 gr).
- Agua destilada.

**5. PROCEDIMIENTOS:**

$$1\text{Mol CH}_3\text{COONa} = 136.08 \text{ gr/L} \cong 136.08 \text{ gr/1000 ml}$$

**Procedimiento:** Preparar 50 ml de solución 3M (pH 5.2)

$$1 \text{ Molar: } 136.08 \text{ gr en } 1000 \text{ ml} \cong 13.608 \text{ gr en } 100 \text{ ml}$$

$$13.608 \text{ gr} / 2 = \mathbf{6.804 \text{ gr en } 50 \text{ ml}}$$

$$3 \text{ Molar: } 6.804 \text{ gr} \times 3 \text{ en } 50 \text{ ml} = 20.412 \text{ gr en } 50 \text{ ml} \cong \mathbf{20.4 \text{ gr en } 50 \text{ ml}}$$

- Pesar 20.4 gr de Acetato de sodio en una balanza analítica.
- En un matraz con 35 ml de agua destilada añadir 20.4 gr de Acetato de sodio.
- Colocar el imán dentro del matraz.
- Hacer funcionar el agitador magnético hasta que la solución se encuentre completamente disuelta.

- f. Verificar el pH de la solución en el medidor de pH.
- g. Ajustar el pH adicionando Ácido Acético.
- h. Completar los 50 ml
- i. Colocar en un recipiente y rotular nombre, concentración y fecha de elaboración.

<b>Elaborado por:</b>	<b>Revisado por:</b>	<b>Autorizado por:</b>
Srta. Cristina Manzaba	Dr. Franklin Román	Dr. Luis Morocho

**Anexo 10:** Extracción de ADN.

 <p><b>UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA</b></p> <p><b>Centro de biotecnología UNL</b></p>	<p><b>Protocolo para extracción de ADN manual</b></p>	<b>Código:</b> CBT-010	
		<b>Revisión:</b> 01	<b>Edición:</b> 01
		<b>Fecha:</b> 27-06-2018	

**1. OBJETIVO**

Obtener ADN de Leishmania a partir de cultivos.

**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**

La preparación de ADN incluye extracción de ADN, precipitación con etanol y cuantificación de ADN. La extracción con fenol-cloroformo es un método de purificación exhaustivo que incluye muchas etapas de lisis, digestión, extracción y lavado. La precipitación estándar con etanol es el método estándar para recuperar ácidos nucleicos de soluciones acuosas. Es rápido y eficiente para pequeñas cantidades de ADN y ARN.

El método más común para la cuantificación del ADN es la medida espectrofotométrica de la absorbancia a 260 nm. Es rápido, simple y no destructivo, y puede ser usado para muestras puras que no contienen cantidades significativas de contaminantes tales como proteína, fenol, agarosa y otros ácidos nucleicos. La relación de absorbancia ( $OD_{260}$ :  $OD_{280}$ ) es un indicador para el grado de contaminación del ADN preparado con proteína y ARN / fenol.

**4. MATERIALES****Muestras:**

- Fase líquida del medio de cultivo. (100  $\mu$ l)

**Reactivos:**

- SDS (10%) (50 µl/extracción)
- RNAsa, 10 mg / ml (10 µl/extracción)
- Proteinasa K, 20 mg / ml (5 µl/extracción)
- Fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25: 24: 1) (2 ml/extracción)
- Cloroformo: alcohol isoamílico (24: 1) (1 ml/extracción)
- Etanol 96% y 70% (5 ml/extracción)
- Acetato de sodio (3 M, pH 5,2) (100 µl/extracción)
- TE (pH 8,0) (1100 µl/extracción)

**Equipos:**

- Microcentrífuga
- Pipetas automáticas 10 – 1000 µl y 20 – 200 µl
- Baño de agua o incubadora
- Refrigerador -20 ° C
- Tubos de microcentrífuga de 1,5 ml y 2 ml
- Puntas de pipeta (10, 100, 1000 µl)

**5. PROCEDIMIENTO**

- a. Recoger los promastigotes por centrifugación a 5000 rpm durante 3 minutos.
- b. Añadir 950 µl de TE y resuspender las células mezclando suavemente. No vórtice.
- c. Transferir la suspensión a un tubo de microcentrífuga limpio de 1,5 o 2 ml.
- d. Añadir SDS hasta una concentración final de 0,5% (dilución 20 veces, es decir, 50 µl para una suspensión de muestra de 1 ml) y agitar bien hasta que la solución sea viscosa. No vórtice.
- e. Añadir RNAsa hasta una concentración final de 100 µg / ml (dilución 100 veces, es decir, 25 µl para una suspensión de muestra de 1 ml), incubar durante 30 minutos a 37°C.
- f. Añadir proteinasa K (20 mg/ml) a una concentración final de 100 µg / ml (dilución de 200 veces, es decir, 5 µl para una muestra en suspensión de 1 ml) e incubar a 60°C durante 3 horas

- g. Añadir un volumen igual de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico a cada tubo. Si es necesario, divida en dos tubos de microcentrífuga de 1,5 ml. Agitar suavemente durante al menos 2-3 minutos. No vórtice.
- h. Centrifugar a 13000 rpm (velocidad máxima) durante 10 min y transferir cuidadosamente la fase acuosa a un tubo limpio etiquetado. Descartar la interfase y la fase orgánica. Si las fases orgánica y acuosa no están bien separadas, centrifugar de nuevo durante más tiempo. Separar, centrifugar nuevamente por más tiempo.
- i. Repetir los pasos 7 y 8 hasta que desaparezca la interfase (normalmente 2 por fenol: cloroformo: alcohol isoamílico es suficiente).
- j. Añadir un volumen igual de cloroformo: alcohol isoamílico a la fase acuosa, mezclar suavemente (no vórtice) y centrifugar como antes. Retirar cuidadosamente la fase acuosa a un tubo limpio y estimar su volumen.
- k. Añadir 1/10 de volumen de Na-acetato 3 M y 2.5 volúmenes de etanol al 70% enfriado con hielo (es decir, 200ul de muestra + 20ul de Na - acetato 3 M + 550 ul de etanol al 70% enfriado con hielo). Mezclar el precipitado suavemente e incubar a -20° C para permitir la precipitación de ADN al menos 5 min cuando el ADN sea visible (cuando el ADN no sea visible incubar al menos 30 min).
- l. Centrifugar a máxima velocidad durante 10 min y retirar cuidadosamente el sobrenadante. Tenga cuidado de no destruir el gránulo del ADN, que puede ser invisible.
- m. Lavar 2 veces el pellet con etanol al 70% (bajando el contenido de las paredes). Finalmente realizar un último lavado del pellet con etanol al 96%.
- n. Desechar el sobrenadante y dejar el tubo abierto sobre el banco a temperatura ambiente hasta que se hayan evaporado los últimos restos de líquido.
- o. Disolver el sedimento de ADN en 50 µl (dependiendo de la cantidad del pellet de ADN) de TE (pH 8,0) y almacenar a -20°C hasta su uso.

## **6. Calidad y cantidad de ADN:**

La calidad del ADN puede ser visualizada y la cantidad estimada ejecutando los extractos de ADN en geles de agarosa (0,8 - 1 %).

1. Preparar un gel de agarosa como se muestra en el protocolo.
2. Cargar el gel de la siguiente manera: 2  $\mu$ l de ADN extraído + 2  $\mu$ l de tampón de carga.
3. Ejecutar el gel a 80 V durante 1 hora usando una bandeja de tamaño medio.
4. Fotografíar el gel bajo luz UV (transiluminador). Comparar la intensidad de esta banda con bandas estándar para estimar la cantidad de ADN.

**Observación:** La concentración de ADN se puede medir espectrofotométricamente:

La concentración de un ácido nucleico se determina leyendo la densidad óptica a 260 nm. La relación entre las densidades ópticas en OD<sub>260</sub> y OD<sub>280</sub> está entre 1,8 y 2 para soluciones de ADN puro. Valores <1,8 indican contaminación con proteínas, valores >2 indican contaminación con ARN y / o fenol (Instituto Oswaldo Cruz, 2009).

## 7. REFERENCIAS

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

<b>Elaborado por:</b>	<b>Revisado por:</b>	<b>Autorizado por:</b>
Srta. Cristina Manzaba	Dr. Franklin Román	Dr. Luis Morocho

**Anexo 11:** Preparación de primers.

 <b>UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA</b> <b>Centro de Biotecnología UNL</b>	<b>Protocolo para preparación de primers.</b>	<b>Código:</b> CBT-007	
		<b>Revisión:</b> 01	<b>Edición:</b> 01
		<b>Fecha:</b> 27-06-2018	

**1. OBJETIVO:**

Preparar una solución madre de los primers con la finalidad de realizar diluciones que eviten la contaminación y el proceso congelación – descongelación de los mismos.

**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:**

Primer o iniciador molecular se refiere a una secuencia de oligonucleótidos, escrita siempre en la dirección 5'→3', que marca las extremidades de la secuencia de ADN objetivo que se pretende sintetizar. Para tal, son necesarios dos primers: uno complementario a la secuencia de ADN (primer forward); y otro complementario a la secuencia de ADN (primer reverse).

**4. MATERIALES:**

- Primers: Forward y Reverse.
- Agua ultra pura grado biología molecular.

**5. PROCEDIMIENTO:**

Para hacer una solución de 100 µM se multiplica la concentración nM del primer (indicado en el tubo o el certificado de análisis) por 10 para saber el volumen de agua que hay que agregarle.

$$1 \text{ nM} = 1000 \text{ pM}$$

$$1 \text{ µM} = 1 \text{ pM/µl}$$

$$\text{Vol. H}_2\text{O reconstitución} = \frac{\text{pMol(primer)}}{100 \text{ pMol/µl}}$$

**Primer Forward:**

Concentración: 45 nM

$$\text{Vol. H}_2\text{O} = \frac{45000 \text{ pMol}}{100 \text{ pMol}/\mu\text{l}}$$

$$\text{Vol. H}_2\text{O} = 450 \mu\text{l}$$

**Primer Reverse:**

Concentración: 42.3 nM

$$\text{Vol. H}_2\text{O} = \frac{42300 \text{ pMol}}{100 \text{ pMol}/\mu\text{l}}$$

$$\text{Vol. H}_2\text{O} = 423 \mu\text{l}$$

**6. REFERENCIAS:**

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

**Anexo 12:** PCR convencional.

 <p><b>UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA</b></p> <p><b>Centro de biotecnología UNL</b></p>	<p><b>Protocolo para PCR convencional</b></p>	<b>Código:</b> CBT-011	
		<b>Revisión:</b> 01	<b>Edición:</b> 01
		<b>Fecha:</b> 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 Hsp70, y se utiliza para la detección directa del género Leishmania en diferentes tipos de muestras.

**4. MATERIALES****Muestras:**

- ADN de *L. braziliensis*, *L. equatoriensis*, *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
- 10 X tampón de amplificación.
- Taq polimerasa.

**Equipos:**

- Cabina de bioseguridad.
- Termociclador
- Pipetas

**5. PROCEDIMIENTO**

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

	<b>Concentración Stock</b>	<b>Concentración requerida</b>	<b>1 Muestra</b>
Buffer de PCR	10X	1X	5ul
Cl <sub>2</sub> Mg	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.

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

	<b>Muestras Control</b>	<b>Control Negativo (agua)</b>	<b>Control del Mix</b>
MM	21.3 $\mu$ l	--	21.3 $\mu$ l
Muestra de DNA	80 ng	--	--
H <sub>2</sub> O ultra pura	--	50 $\mu$ l	23.7 $\mu$ l

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

**d. Paso 4:** Ejecute el siguiente programa del termociclador:

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

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

## 6. REFERENCIAS

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

<b>Elaborado por:</b>	<b>Revisado por:</b>	<b>Autorizado por:</b>
Srta. Cristina Manzaba	Dr. Franklin Román	Dr. Luis Morocho

**Anexo 13:** Preparación de TBE 1 X.

 <b>UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA</b> <b>Centro de Biotecnología UNL</b>	<b>Protocolo para preparación de TBE 1 X.</b>	<b>Código:</b> CBT-002	
		<b>Revisión:</b> 01	<b>Edición:</b> 01
		<b>Fecha:</b> 18-10-2018	

**1. OBJETIVO:**

Preparar tampón TBE 10%.

**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:**

**Tris:** Molécula responsable del tamponamiento. Regulación del pH.

**Ácido Bórico:** contribuye a ajustar el pH deseado e igual que el anterior, a mantenerlo.

**EDTA (Ácido Etilendiaminotetraacético):** quelante de cationes divalentes, cuya función es secuestrar  $Mg^{2+}$ , con lo que se evita que las posibles nucleasas presentes degraden el ADN de la muestra, ya que la mayoría de las nucleasas requieren de  $Mg^{2+}$  como cofactor.

**4. MATERIALES:**

- Tris Base. PM= 121.14 gr
- Ácido Bórico. PM= 61.83 gr
- EDTA + 2 H<sub>2</sub>O. PM= 372.24 gr
- Agua destilada.

**5. PROCEDIMIENTOS:****Tampón Tris-Borato-EDTA (TBE) 10 X****Procedimiento:** TBE 10 X

- a. Pesar 108 gr de Tris Base en una balanza analítica.
- b. En un matraz con 800 ml de agua destilada añadir los 108 gr de Tris.
- c. Disolver.

- d. Hacer funcionar el agitador magnético hasta que la solución se encuentre completamente disuelta.
- e. Pesar 55 gr de Ácido Bórico en una balanza analítica y añadir a la solución disuelta.
- f. Hacer funcionar el agitador magnético hasta que la solución se encuentre completamente disuelta.
- g. Pesar 9.3 gr de EDTA en una balanza analítica y añadir a la solución anterior.
- h. Hacer funcionar el agitador magnético hasta que la solución se encuentre completamente disuelta.
- i. Colocar en un recipiente y rotular nombre, concentración y fecha de elaboración.

**Procedimiento: TBE 1 X**

- b. En una probeta de 1000 ml colocar 100 ml de TBE 10 X.
- c. Añadir agua destilada hasta completar los 1000 ml (900 ml)
- d. Colocar en un recipiente y rotular nombre, concentración y fecha de elaboración.

<b>Elaborado por:</b>	<b>Revisado por:</b>	<b>Autorizado por:</b>
Srta. Cristina Manzaba	Dr. Franklin Román	Dr. Luis Morocho

**Anexo 14.-** Electroforesis en geles de agarosa normales.

 <p style="text-align: center;"><b>UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA</b></p> <p style="text-align: center;"><b>Centro de biotecnología UNL</b></p>	<p><b>Protocolo para Electroforesis en geles de agarosa normales</b></p>	<b>Código:</b> CBT-012	
		<b>Revisión:</b> 01	<b>Edición:</b> 01
		<b>Fecha:</b> 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**

- a. Preparar suficiente cantidad de tampón de electroforesis para llenar el tanque de electroforesis y para moldear el gel (TBE 1 X).
- b. Pesar la cantidad apropiada de polvo de agarosa (por ejemplo, 2 g para gel de agarosa al 2%) en un matraz Erlenmeyer.
- c. Agregar 100 ml de tampón TBE 1 X a temperatura ambiente. El buffer debe ocupar máximo 40% del volumen del matraz.
- d. Tapar ligeramente el cuello del matraz con un tapón.
- e. Calentar el matraz en el microondas hasta verificar la disolución completa de la agarosa, logrando una solución transparente.
- f. Añadir 8  $\mu$ l de Sybr Safe al matraz y homogenizar.
- g. 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.
- h. Verter la agarosa enfriada en la bandeja de gel (molde) y esperar 20 minutos hasta que solidifique.

**Sugerencia:** el gel debe tener un grosor de entre 3 mm y 5 mm. Verificar que no haya burbujas de aire debajo o entre los dientes del peine.

- i. 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.

- j. Mezcle 8  $\mu$ l de muestra con 2  $\mu$ l de colorante de carga hasta un volumen de 10  $\mu$ l.
- k. Cargar lentamente la mezcla de muestra en las ranuras del gel sumergido usando una pipeta.
- l. 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.
- m. 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).
- n. 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 15:** Difusión de resultados.

La difusión de resultados del proyecto “Identificación genética de especies de leishmania circulantes en la Zona 7 del Ecuador” se realizó en el aula magna Dr. Edmundo Granda de la Facultad de la Salud Humana de la Universidad Nacional de Loja, contando con la presencia de estudiantes y docentes de la carrera de laboratorio clínico el día 14 de febrero a las 17h00.







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

**TEMA:** Difusión de resultados del tema "Estandarización de una técnica molecular de PCR para identificación de especies de leishmania"

**FECHA:** 14 de febrero de 2019

**REGISTRO DE ASISTENCIA: ESTUDIANTES**

NOMBRES Y APELLIDOS	CICLO	CÉDULA	FIRMA
Dora Thalia Rulova	III	1150021507	
Amy Gisela Gamón	III	1103851198	
Thalia Lozano Minga	III	1900709591	
Naylea Nicol Meiro	III	1150761045	
Geovier Latoro Meiro	III	1150010906	
Oscar Lóez Gamón	III	1150231924	
Stephany Dalba P	III	0750463028	
Kerly Jiménez P	III	1900844174	
Malemi Armijos S.	III	1900878602	
Damiánys Marley Quichimbo A.	III	1900635838	
Ara Jonela Castillo Vélez	III	1105204489	
Jennifer Pérez Acevedo	III	1950003499	
Josephina Estimera Ortiz Graña	III	1106067378	
Jessica Hidalgo Simancas	III	0706967494	
Kerly Somarrama Poma	III	1900886076	
Jordann Alexander Sanchez	III	1105833238	
Yulady Lisbeth Cando C	III	110017661	
Johanna Michelle Guaman Graña	III	1104340958	



## Apéndice 1:



LILIA ALEXANDRA CONTENITO TENEZACA PORTADORA DE CÉDULA DE CIUDADANÍA 1104024037, GERENTE GENERAL DE LA ACADEMIA DE CAPACITACIÓN Y NIVELACIÓN "GUILLERMO CONTENITO", a petición verbal de parte interesada

### **CERTIFICA:**

Que en nuestra Institución El Licenciado Pablo Patricio Quezada Pinzón con número de cédula 1104674849 realizó la debida traducción español-inglés del Resumen de tesis de la Srta. **CRISTINA NATHALY MANZABA JIMENEZ** con CI: 1900851690, correspondiente al Tema: "ESTANDARIZACIÓN DE UNA TÉCNICA MOLECULAR DE PCR PARA IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES DE LEISHMANIA"

Es todo cuanto puedo certificar en honor a la verdad, facultando a la parte interesada hacer uso del presente en lo que estime conveniente.

Para constancia firma:

Lilia Contento T.,  
**GERENTE PROPIETARIA**

Loja, 11 de marzo de 2019