

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA
LA MOLINA**

FACULTAD DE CIENCIAS



**“IDENTIFICACIÓN DE LAS ESPECIES DEL GÉNERO
LEISHMANIA MEDIANTE MARCADORES MOLECULARES DE
ALTA SENSIBILIDAD A PARTIR DE LÁMINAS COLOREADAS
CON GIEMSA EMPLEANDO LA TÉCNICA *PCR-HIGH
RESOLUTION MELTING (HRM)*”**

Presentada por:

Juana Iris Silva Molina

Tesis para Optar el Título Profesional de:

BIÓLOGO

Lima – Perú

2018

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA
LA MOLINA
FACULTAD DE CIENCIAS**

**“IDENTIFICACIÓN DE LAS ESPECIES DEL GÉNERO
LEISHMANIA MEDIANTE MARCADORES MOLECULARES DE
ALTA SENSIBILIDAD A PARTIR DE LÁMINAS COLOREADAS
CON GIEMSA EMPLEANDO LA TÉCNICA PCR-HIGH
RESOLUTION MELTING (HRM)”**

Presentada por:

Juana Iris Silva Molina

Tesis para Optar el Título Profesional de:

BIÓLOGO

Sustentada y aprobada por el siguiente jurado:

Ph.D. Ana Kitazono Sugahara
PRESIDENTE

Biol. Roberto Ramos Chaupin
MIEMBRO

Mg.Sc. Rosario Castro Muñoz
MIEMBRO

Mg.Sc. Patricia Moreno Díaz
ASESORA

Mg. Gloria Minaya Gómez
CO - ASESORA

DEDICATORIA

Dedicado a mis padres, amigos y a todos los que formaron parte en esta etapa de mi vida profesional.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	i
ABSTRACT	ii
I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISION DE LITERATURA	3
2.1. EPIDEMIOLOGIA	3
2.2. DEFINICIONES CONCEPTUALES	4
2.2.1. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).....	4
2.2.2. Marcadores Moleculares	4
2.2.3. Técnicas moleculares para la identificación de especies.....	6
III. MATERIALES Y MÉTODOS	8
3.1. SELECCIÓN DE LÁMINAS	9
3.2. EXTRACCIÓN DEL ADN UTILIZANDO EL PROTOCOLO DEL KIT COMERCIAL PURELINK™ GENOMIC DNA (INVITROGEN).....	10
3.3. CUANTIFICACIÓN DEL ADN	11
3.3.1. Cuantificación del ADN de las Cepas Referenciales	11
3.3.2. Cuantificación del ADN de las muestra de pacientes	12
3.4. EVALUACIÓN DEL LÍMITE DE DETECCIÓN Y EFICIENCIA EN LA IDENTIFICACIÓN DE LA ESPECIE INFECTANTE.....	13
3.5. IDENTIFICACIÓN DE LA ESPECIE DE <i>LEISHMANIA SP</i> A PARTIR DE LÁMINA.....	13
3.5.1. Protocolo de PCR-HRM de la región conservada del minicírculo.....	14
3.5.2. Protocolo de PCR-HRM de cyt b	15
3.5.3. Protocolo de PCR-HRM de hsp70 e ITS 1.....	15
3.6. SECUENCIAMIENTO DEL GEN DEL CITOCROMO B PARA LA CONFIRMACIÓN DE LAS CEPAS REFERENCIALES	16
3.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	17
3.8. DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA	17
IV. RESULTADOS Y DISCUSION	18
4.1 SELECCIÓN DE LAS MUESTRAS INCLUIDAS EN EL ESTUDIO	18
4.2 SECUENCIAMIENTO DEL CYT B DE LAS CEPAS REFERENCIALES.....	19
4.3 CUANTIFICACIÓN DE ADN PARASITARIO DE LAS LÁMINAS.....	19
4.4. LÍMITE DE DETECCIÓN Y EFICIENCIA EN LA IDENTIFICACIÓN DE LA ESPECIE INFECTANTE	19
4.4.1 Región conservada del minicírculo	20

4.4.2. Marcador hsp 70.....	26
4.4.3. Marcador de la región intergénica 1 (ITS-1).....	29
4.4.4. Marcador del cyt b.....	33
4.5. ANÁLISIS DE PCR- HIGH RESOLUTION MELTING (HRM) DE LAS MUESTRAS	36
4.6. DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA	38
V. CONCLUSIONES.....	41
VI. RECOMENDACIONES.....	43
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	44
IX. ANEXOS	54

INDICE DE TABLAS

Tabla N° 1:	Láminas por grupos.....	9
Tabla N° 2:	Clasificación semicuantitativa de amastigotes en láminas.....	10
Tabla N° 3:	Primers y Sonda para el PCR cuantitativo (qPCR).....	12
Tabla N° 4:	Marcadores y primers del PCR-HRM.....	14
Tabla N° 5:	Láminas por grupos de clasificación.....	18
Tabla N° 6:	Identificación de Cepas Referenciales por Secuenciamiento del cyt b.....	19
Tabla N° 7:	Diluciones de <i>L. (L.)mexicana</i> para la región conservada del minicírculo.....	20
Tabla N° 8:	Diluciones de <i>L. (V.)braziliensis</i> para la región conservada del minicírculo.....	21
Tabla N° 9:	Temperatura Melting de las muestras por PCR-HRM.....	23
Tabla N° 10:	Diluciones de <i>L. (L.) mexicana</i> para hsp 70.....	26
Tabla N° 11:	Diluciones de <i>L. (V.) braziliensis</i> para hsp70.....	27
Tabla N° 12:	Temperatura melting hsp 70.....	29
Tabla N° 13:	Diluciones de <i>L. (V.)braziliensis</i> para ITS-1.....	30
Tabla N° 14:	Diluciones de <i>L. (L.)mexicana</i> para ITS-1.....	31
Tabla N° 15:	Temperatura melting ITS-1.....	32
Tabla N° 16:	Diluciones de <i>L. (V.) braziliensis</i> para cyt b.....	34
Tabla N° 17:	Diluciones de <i>L. (L.)mexicana</i> para cyt b.....	35
Tabla N° 18:	Identificación de especies por ITS-1 para las láminas del Grupo IV...	36
Tabla N° 19:	Identificación de especies con el minicírculo por HRM.....	37
Tabla N° 20:	Identificación de especies con el minicírculo por HRM.....	38
Tabla N° 21:	Identificación de especies con el minicírculo por HRM.....	39

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura N° 1:	Curva estándar la para la cuantificación de <i>Leishmania spp.</i>	12
Figura N° 2:	Representación gráfica del Ct para <i>L (L.) mexicana</i> con el marcador del minicírculo.....	20
Figura N° 3:	Representación gráfica del Ct para <i>L (L.) braziliensis</i> con el marcador del minicírculo.....	22
Figura N° 4:	Diagrama en cajas del Tm de las muestras para el marcador de la región conservada del minicírculo.....	25
Figura N° 5:	Representación gráfica del Ct para <i>L (L.) mexicana</i> con el marcador hsp 70.....	26
Figura N° 6:	Representación gráfica del Ct para <i>L (L.) braziliensis</i> con el marcador hsp70.....	27
Figura N° 7:	Diagrama en cajas del Tm de las muestras para el marcador de hsp70.....	29
Figura N° 8:	Representación gráfica del Ct para <i>L (L.) braziliensis</i> con el marcador ITS 1.....	30
Figura N° 9:	Representación gráfica del Ct para <i>L (L.) mexicana</i> con el marcador ITS 1.....	31
Figura N° 10:	Diagrama en cajas del Tm de las muestras para el marcador de ITS-1.....	33
Figura N° 11:	Representación gráfica del Ct para <i>L (L.) braziliensis</i> con el marcador cyt b.....	34
Figura N° 12:	Distribución geográfica de especies de <i>Leishmania spp.</i> en 8 departamentos del Perú.....	40

INDICE DE ANEXOS

Anexo N°1:	Tablas de identificación de especies para los cuatro marcadores moleculares por la técnica de PCR-HRM y la concentración de ADN de las muestras.....	54
Anexo N° 2:	Resultados del Secuenciamiento de las Cepas Referenciales.....	63

RESUMEN

La leishmaniasis es una enfermedad causada por el protozoario del género *Leishmania*, que se transmite a los humanos por la picadura de flebótomos infectados. El Perú reportó un promedio de 7000 casos de leishmaniasis cutánea y 430 de leishmaniasis cutáneo-mucosa en el 2016. Las principales especies infectantes del género *Leishmania* son *Leishmania (Viannia) braziliensis*, causante del 98% de los casos de leishmaniasis mucosa y cutáneo-mucosa; *Leishmania (V.) peruviana*, causante de la leishmaniasis cutánea y en menor proporción *Leishmania (V.) guyanensis*, *Leishmania (V.) lainsoni*, *Leishmania (Leishmania) amazonensis* y *Leishmania (V.) shawi*. La diversidad de especies del género *Leishmania* y su amplia distribución en el territorio peruano requieren la búsqueda de métodos que permitan identificar las especies de forma sencilla, reproducible y eficiente. En la investigación se realizó el análisis por PCR-High Resolution Melting (HRM) para cuatro marcadores moleculares, la región conservada del minicírculo, ITS-1, hsp70 y cyt b en 243 láminas coloreadas con Giemsa de los años 2010-2013 procedentes de pacientes con lesiones cutáneas. El análisis de genotipificación identificó las especies de *Leishmania (V.) peruviana*, *Leishmania (V.) braziliensis*, *Leishmania (V.) guyanensis*, *Leishmania (V.) lainsoni*, *Leishmania (L.) amazonensis*, cuya sensibilidad de técnica fue 93.00%. Además, el análisis de las curvas de disociación o HRMA permitió la identificación de especie de *Leishmania* desde la concentración equivalente a 1 parásito/reacción. La identificación de especies, el límite de detección y la eficiencia en la identificación especies de *Leishmania spp* a partir de láminas coloreadas con Giemsa mediante la técnica de PCR- HRM requiere el uso de marcadores multicopia, como la región conservada del minicírculo. La aplicación de la técnica PCR-HRM en muestras de láminas es una herramienta molecular novedosa, sencilla y útil por el fácil almacenamiento y transporte de las muestras de pacientes desde las regiones más lejanas del país, lo cual podría permitir el pronóstico del desarrollo de la enfermedad y estudios epidemiológicos.

Palabras clave: *Leishmania*, PCR, *High Resolution Melting*, marcadores moleculares

ABSTRACT

Leishmaniasis is a disease caused by the protozoan of the genus *Leishmania*, and is transmitted to humans by sandfly bites. Peru reported an average of 7,000 cases of cutaneous leishmaniasis and 430 cases of cutaneous-mucosal leishmaniasis in 2016. The most important causal agents of Leishmaniasis are *Leishmania (Viannia) braziliensis*, which causes 98% of cases of mucosal and cutaneous-mucosal leishmaniasis, *Leishmania (V.) peruviana*, which causes cutaneous leishmaniasis and *Leishmania (V.) guyanensis*, *Leishmania (V.) lainsoni*, *Leishmania (Leishmania) amazonensis* and *Leishmania (V.) shawi* in less rate. The diversity of species of the genus *Leishmania* and its wide distribution in the Peruvian territory require the search of methods that allow to identify the species in a simple, reproducible and efficient way. The investigation was carried out by PCR – *High Resolution Melting* (HRM) analysis for four molecular markers, the conserved region of the minicircle, ITS-1, hsp 70 and cyt b in 243 Giemsa stained smears of the years 2010-2013 with lesions cutaneous. The genotyping assay allowed the correct assignment of five *Leishmania* species (*Leishmania (V.) peruviana*, *Leishmania (V.) braziliensis*, *Leishmania (V.) guyanensis*, *Leishmania (V.) lainsoni*, *Leishmania (L.) amazonensis*), whose sensitivity of technique was 93.00% . In addition, the analysis of the dissociation curves or HRMA allowed the identification of *Leishmania* species from the concentration equivalent to 1 parasite / reaction. The identification of species, the limit of detection and the efficiency in identifying species of *Leishmania* spp from sheets colored with Giemsa by the PCR-HRM technique requires the use of multicopy markers, such as the conserved region of the minicircle. The application of the PCR-HRM technique in sheet samples is a novel molecular tool, simple and useful for the easy storage and transportation of patient samples from the most distant regions of the country, which could allow the prognosis of the development of the disease and epidemiological studies.

Keywords: *Leishmania*, PCR, *High Resolution Melting*, molecular markers

I. INTRODUCCIÓN

La leishmaniasis es una enfermedad causada por más de 20 especies del protozoo parásito *Leishmania spp*, que se transmite a los humanos por la picadura de flebótomos hembras infectados del género *Phlebotomus* en el Viejo Mundo y *Lutzomyia* en el Nuevo Mundo (OMS, 2017). Esta enfermedad afecta alrededor de 12 millones de personas en más de 98 países. Se estima 1.3 millones de casos nuevos, de los cuales entre 0.7 a 1.2 millones son casos de leishmaniasis cutánea y de 0.2 a 0.4 millones de leishmaniasis visceral (Alvar, 2012).

La forma clínica de la leishmaniasis depende principalmente de la respuesta inmune del hospedero y la especie infectante, donde las lesiones cutáneas causadas por especies del subgénero *Viannia* pueden evolucionar a formas más agresivas de la enfermedad con capacidad para invadir los tejidos mucosos o desarrollar formas cutáneo difusas (Osorio, 1998; Cuba, 2000; De Oliveira, 2011). En el Perú, las principales especies reportadas son *Leishmania (V.) braziliensis* y *Leishmania (V.) peruviana* (Lucas, 1998; Kato, 2010).

Las técnicas consideradas como referenciales en la identificación de las especies de *Leishmania spp* son la Electroforesis Multilocus Enzimática (MLEE) y la técnica de Tipificación por Secuenciamiento de Multilocus (MLST) (Mauricio, 2006; Tsukayama, 2013). Estas técnicas requieren un elevado número de parásitos viables en medios de cultivo para la extracción de proteínas o ADN, sin embargo en los últimos años las investigaciones se han enfocado en mejorar aspectos relacionados a la obtención rápida de resultados desarrollando técnicas más sencillas y eficientes, así como la búsqueda de

marcadores específicos que no requieran del secuenciamiento para definir la especie infectante.

Las técnicas moleculares basadas en la amplificación de ácidos nucleicos cuentan con una elevada sensibilidad y especificidad en la identificación de *Leishmania spp*, mediante el uso de marcadores moleculares dirigidos a las regiones conservadas del minicírculo y maxicírculo, ambos presentes en el ADN del kinetoplasto. Otros marcadores son los segmentos intergénicos 1 y 2 (ITS-1 y ITS-2) presentes en el ARN ribosomal y genes nucleares de la proteína de choque térmico 70 kDa y 20 kDa (hsp70 y hsp20), la glicoproteína metaloproteasa 63 kDa (gp63), la manosa fosfato isomerasa (mpi), entre otras (Foulet, 2007; Fraga, 2010; De Almeida, 2011; Chaouch, 2012).

La búsqueda y el análisis de marcadores moleculares multicopias presentes en el ADN del núcleo o kinetoplasto del parásito empleando la técnica de *PCR-High Resolution Melting* permite la identificación sencilla, rápida y eficiente de este parásito, sin embargo aún es necesaria la evaluación de estos marcadores a fin de determinar aquellos de mayor eficiencia, reproducibilidad y concordancia con respecto a una prueba patrón y que además no requieran el aislamiento previo del parásito para su identificación (Talmi, 2010; Khademvatan, 2011; Hernández, 2014; Ceccarelli, 2014).

En base a lo expuesto se tiene como objetivo general:

Evaluar los marcadores moleculares hsp70, ITS-1, cyt b y la región conservada del minicírculo para la identificación de especies de *Leishmania spp* a partir de frotises coloreados con Giemsa, empleando la técnica de *PCR-High Resolution Melting* (HRM).

Objetivos específicos:

- Analizar el límite de detección y eficiencia en la identificación de los cuatro marcadores moleculares teniendo como especies representantes del Subgénero *Viannia* y *Leishmania* a *Leishmania (Viannia) braziliensis* y *Leishmania (Leishmania) mexicana*
- Realizar la distribución geográfica de las especies identificadas en 8 departamentos del territorio peruano.

II. REVISION DE LITERATURA

2.1. EPIDEMIOLOGIA

La leishmaniasis es una enfermedad de alta incidencia y endémica en 18 países de las Américas, durante el período 2001-2016 se notificaron 892 846 nuevos casos de leishmaniasis cutánea (LC), reportándose 48 915 casos de LC y LM en el último año del intervalo mencionado previamente. Los países con mayor número de casos registrados fueron Brasil (12.690), Colombia (10.966), Nicaragua (5.423) y Perú (7.271) que juntos representaron el 74,3 por ciento del total de casos en la región (OPS/OMS, 2018).

En el Perú, hasta la semana epidemiológica 45 del 2017 se notificaron 5369 casos de leishmaniasis, de los cuales el 91.8 por ciento corresponden a leishmaniasis cutánea y el 8.2 por ciento a leishmaniasis cutáneo-mucosa. La incidencia acumulada para leishmaniasis cutánea fue de 15.55 x 1000 habitantes menor a lo reportado en el mismo periodo del año 2016 (19.97 x 1000 habitantes).

El 85.7 por ciento de los casos de leishmaniasis cutánea se concentran en los departamentos de Cusco, San Martín, Madre de Dios, Cajamarca, Junín, Ucayali, Piura, Amazonas, Puno, Ancash, Loreto y La Libertad, por otro lado el 91.4 por ciento de los casos de leishmaniasis cutánea-mucosa, se concentran en los departamentos de Cusco, Madre de Dios, Ucayali, Huánuco, Junín, Pasco y Ayacucho (Ministerio de Salud, 2017).

Las principales especies reportadas son *Leishmania (Viannia) braziliensis*, causante del 98 por ciento de los casos de leishmaniasis mucosa y cutáneo-mucosa en el Perú;

Leishmania (V.) peruviana, causante de la leishmaniasis cutánea, endémica de los Andes.

Leishmania (V.) guyanensis es de amplia distribución en el Perú, desde la región oeste de los valles interandinos de Ancash hasta Ucayali y las especies de menor distribución como *Leishmania (V.) lainsoni*, *Leishmania (Leishmania) amazonensis* y *Leishmania (V.) shawi* (Arana, 1990; Lucas, 1994; Lucas, 1998; Zhang, 2006; Kato, 2010).

2.2. DEFINICIONES CONCEPTUALES

2.2.1. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

La reacción se basa en la replicación *in vitro* del ADN usando termocicladores que automáticamente regulan el aumento y disminución de la temperatura en cada ciclo. La reacción consiste en ciclos repetitivos de desnaturalización de la doble hebra, seguido por la unión de primers o cebadores específicos a la región que flanquea el ADN diana y finalmente la extensión de la cadena de ADN por la adición de nucleótidos a partir de los primers utilizando una ADN polimerasa termoestable. Los productos de amplificación del PCR convencional y sus variantes se observan al final de la reacción en geles de agarosa.

2.2.2. Marcadores Moleculares

Los marcadores moleculares han sido definidos como cualquier molécula controlada genéticamente que permite diferenciar a los individuos, puede ser una proteína, ADN o ARN. Los marcadores del ADN se basan fundamentalmente en el análisis de las diferencias en secuencias pequeñas.

- a) Kinetoplasto: *Leishmania* es un protozoo que pertenece al orden *Kinetoplastida* dentro de la familia *Trypanosomatidae* que se caracterizan por tener una única mitocondria (kinetoplasto) con un genoma denso y largo que representa entre 10 – 20 por ciento del ADN celular. Incluye dos tipos de moléculas circulares interrelacionadas en un sistema, los maxicírculos y minicírculos.

- Minicírculos: Moléculas circulares pequeñas de aproximadamente 800 pares de bases, que presentan regiones conservadas de 120 nucleótidos y una alta variabilidad en la región codificante. La ventaja general del uso de minicírculos es el alto número de copias que es aproximadamente 10000 copias/parásito.
- Maxicírculos: Moléculas circulares de 20000 pares de bases análogas a otros genomas mitocondriales en eucariotas, se encuentran entre 50 a 100 copias/célula. El gen del Cyt b se encuentra situado en el maxicírculo, presentando entre 25 a 50 copias/parásito.

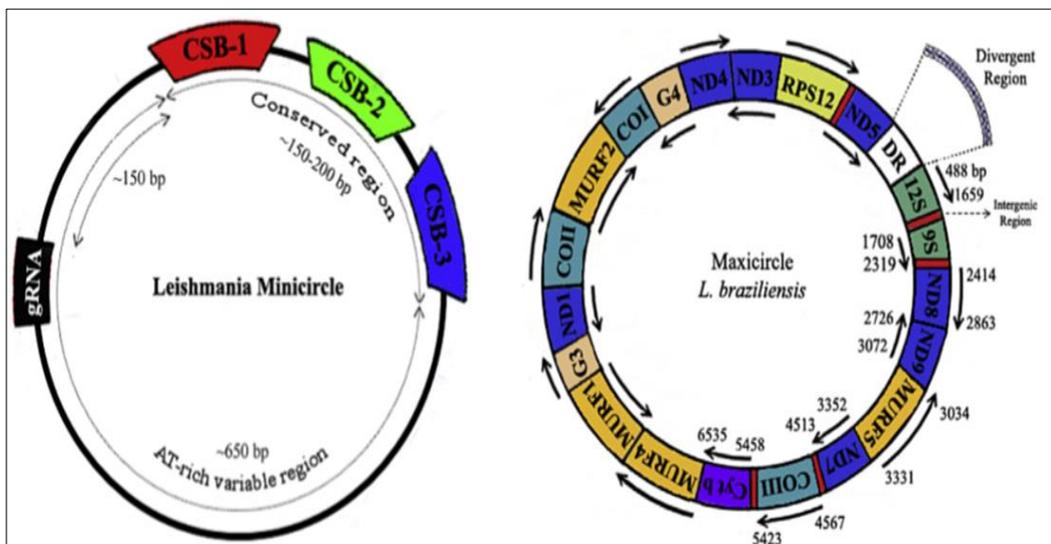


Fig. DNAK del minicírculo de *Leishmania* sp. y sus componentes. CSB: Secuencias en bloque conservadas

Fig. DNAK del maxicírculo de *Leishmania* sp. y sus componentes

- b) ADN ribosomal: Región del ADN que codifica al ARN. Se estima que presenta de 20 a 200 copias repetitivas en tándem por genoma del parásito. Cada unidad contiene genes y espaciadores.
- ITS-1: Segmento intergénico ribosomal 1

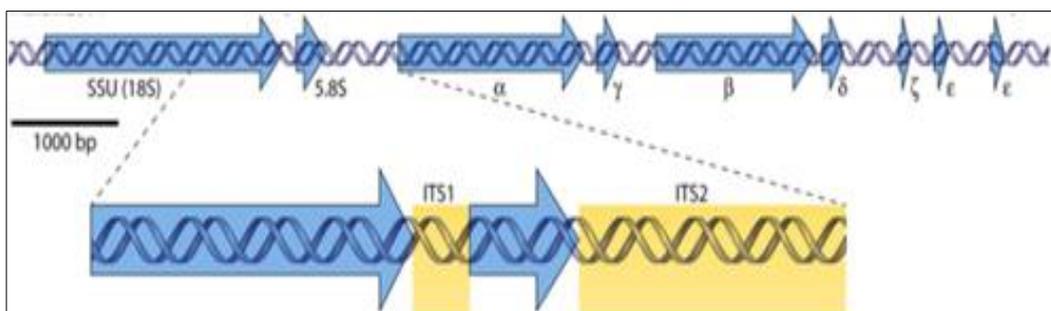
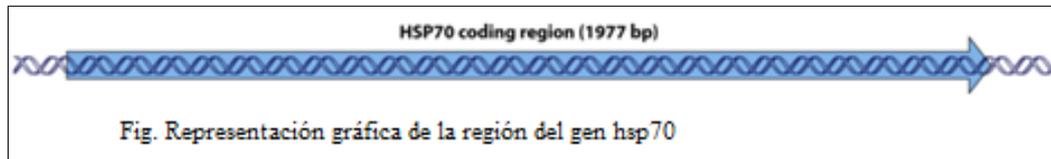


Fig. Representación gráfica de la región ribosomal.

c) Genes nucleares

- Hsp70: Gen de la proteína de choque térmico Hsp70, implicada en el transporte y plegamiento de otras proteínas. El gen tiene entre 5 a 10 copias en el genoma de *Leishmania*.



2.2.3. Técnicas moleculares para la identificación de especies

a) PCR tiempo real

El PCR en tiempo real monitoriza la reacción a medida que se va realizando por la emisión de señal fluorescente que es proporcional a la cantidad de ADN amplificado. Esta técnica utiliza fluoróforos que se intercalan en la doble hebra del ADN (bromuro de etidio, SYBR Green I, Eva Green) y sondas de hibridación (sondas TaqMan, sondas FRET, balizas moleculares), que permiten la amplificación y monitoreo simultáneo del producto en cada ciclo del PCR.

b) Curvas Melting

Finalizado el PCR en tiempo real, los productos de amplificación son sometidos a un incremento controlado de temperatura, para determinar la Temperatura Melting (T_m), a partir de la Curva Melting de cada producto. La T_m se define como la temperatura a la cual el 50 por ciento del ADN de la muestra está en doble hebra y el otro 50 por ciento en hebra simple, esta temperatura está relacionada a la concentración de guanina y citosina presentes en la doble hebra del ADN.

c) PCR-HRM (*HIGH RESOLUTION MELTING*)

La técnica de HRM consiste en el análisis de las curvas de disociación de la doble hebra del ADN o Curvas Melting obtenidas posteriormente al proceso de amplificación por

PCR en tiempo real de la región del ADN de interés. Se emplean colorantes intercalantes a la doble hebra, esta técnica es por lo tanto rápida, de alta sensibilidad y especificidad que permite la detección de género, subgénero, especies y poblaciones de microorganismos e incluso permite la detección de polimorfismos hasta de un solo nucleótido.

d) PCR cuantitativo (qPCR)

Basado en la proporcionalidad de la fluorescencia emitida y el producto formado durante la reacción del PCR en tiempo real es posible cuantificar el ADN presente en una muestra problema.

- Cuantificación absoluta: Comparación de los valores de Ct (Ciclo umbral) de muestras problema contra la curva estándar preparada a través de diluciones conocidas. En la curva estándar se puede determinar el punto en el cual la fluorescencia sobrepasa la fluorescencia basal, donde la reacción de amplificación empieza.
- Cuantificación relativa: Relación entre los niveles de expresión de un gen de interés con los niveles de expresión de un gen de referencia que se expresa constitutivamente.

e) Secuenciamiento automatizado

Es una técnica para determinar el orden nucleotídico del genoma de un organismo o un fragmento del ADN. El uso del PCR y moléculas fluorescentes contribuyeron al desarrollo de máquinas automatizadas para secuenciar. Los equipos iniciales usaban geles verticales para separar fragmentos y sistemas para la detección del orden de los marcadores fluorescentes, posteriormente se basaron en la electroforesis capilar, teniendo una separación más rápida y de alta resolución. El secuenciamiento es utilizado como patrón de oro o “*gold standard*” para la identificación de especies de *Leishmania spp.*

III. MATERIALES Y MÉTODOS

Tipo y diseño de estudio: Estudio observacional descriptivo retrospectivo

Población: Está conformada por láminas coloreadas con Giemsa de pacientes del Instituto Nacional de Salud, procedentes de los Laboratorios Regionales Referenciales (LRR) en el Marco del Control de Calidad para el diagnóstico por examen directo del 2010-2013.

Marco Muestral: Registro de ingreso de las láminas de pacientes coloreadas con Giemsa procedentes de LRR al Laboratorio de Referencia Nacional de Leishmaniasis (LRNL) del 2010 al 2013.

Diseño y tipo de selección de muestra

Diseño: Probabilístico

Selección de la muestra: El tamaño muestral total fue hallado según un estudio de concordancia y bajo la fórmula:

$$M = 3 \times g^2$$

Dónde: g representa el número de categorías o especies.

Las muestras fueron agrupadas de acuerdo al sistema de cruces y a lo reportado por Ramírez et al., 2000, el muestreo fue aleatorio estratificado en función a la proporcionalidad. (Tabla 1).

Tabla N° 1: Láminas por grupos			
Grupo I	Grupo II	Grupo III	Grupo IV
+	++	+++	++++
n1= M x (N1/MM)	n2= M x (N1/MM)	n3= M x (N1/MM)	n4= M x (N1/MM)

Dónde:

MM: Marco Muestral

M: Muestra total

N: Número total de láminas según las categorías de +, ++, +++, +++++

n: Muestra por categorías de +, ++, +++, +++++

Muestra: Conformada por 243 láminas coloreadas con Giemsa, el número de láminas fue seleccionado según los siguientes criterios de inclusión y exclusión.

Criterio de inclusión:

- Láminas con resultado positivo para los LRR y confirmado por el LRNL de los años 2010-2013.

Criterios de exclusión:

- Láminas negativas para los LRR y confirmadas por el LRNL de los años 2010-2013.
- Láminas sin procedencia o año de obtención.
- Láminas positivas con baja calidad de la muestra.
- Láminas positivas en mal estado de conservación (rotas).

3.1. SELECCIÓN DE LÁMINAS

- Seleccionar las láminas positivas procedentes de LRR que ingresaron al LRNL del año 2010 al 2013, por la técnica de diagnóstico de microscopia.
- Agrupar las láminas según la densidad parasitaria, utilizando la siguiente escala semicuantitativa (Ramírez et al., 2000).

Tabla N° 2: Clasificación semicuantitativa de amastigotes en láminas		
Grupo	N° de cruces	Número de amastigotes
I	+	1 amastigote en toda la lámina o en un total de al menos 100 campos
II	++	2-10 amastigotes por campo en un total de al menos 50 campos
III	+++	11-20 amastigotes por campo en un total de al menos 50 campos
IV	++++	21 amastigotes o más por campo en un total de al menos 10 campos

- Codificar las láminas seleccionadas según el año, región de procedencia y densidad parasitaria.
- Registrar en una base de datos la muestra codificada.

3.2. EXTRACCIÓN DEL ADN UTILIZANDO EL PROTOCOLO DEL KIT COMERCIAL PURELINK™ GENOMIC DNA (INVITROGEN).

- Decolorar con metanol cada lámina y dejar secar a temperatura ambiente.
- Colocar cada lámina en una placa petri para evitar la contaminación entre ellas.
- Agregar 180µL de Buffer de Digestión sobre cada lámina por 5 minutos y raspar con una hoja de bisturí hasta extraer toda la muestra.
- Trasvasar la muestra a un criovial y rotular.
- Centrifugar a 10 000 RPM por 10 segundos.
- Agregar 20 µL de proteinasa K.
- Mezclar utilizando un vortex.
- Centrifugar a 6000 RPM por 10 segundos.
- Incubar en baño maría a 55°C por 1hora.
- Centrifugar a 10000 RPM por 3 minutos.
- Trasvasar el sobrenadante a un nuevo criovial.
- Agregar 20 µL de RNasa A.

- Mezclar utilizando un vortex.
- Centrifugar 6000RPM por 10 minutos.
- Reposar por 3 minutos.
- Agregar 200 μ L de Buffer de Lisis.
- Agregar 200 μ L de Etanol absoluto frio.
- Mezclar utilizando un vortex.
- Trasvasar el sobrenadante a la Columna Cromatográfica.
- Centrifugar por 10000 RPM por 1 minuto.
- Lavar con 500 μ L del Wash 1.
- Centrifugar por 10000 RPM por 1 minuto.
- Descartar el tubo colector.
- Lavar con 500 μ L del Wash 2.
- Centrifugar por 10000 RPM por 1 minuto.
- Descartar el tubo colector.
- Colocar la columna en un nuevo criovial
- Agregar 30 μ L de Buffer de Elusión tibio.
- Centrifugar por 12000 RPM por 1 minuto.
- Agregar 30 μ L de Buffer de Elusión tibio.
- Centrifugar por 12000 RPM por 1 minuto.
- Rotular y conservar a -30°C .

3.3. CUANTIFICACIÓN DEL ADN

3.3.1. Cuantificación del ADN de las Cepas Referenciales

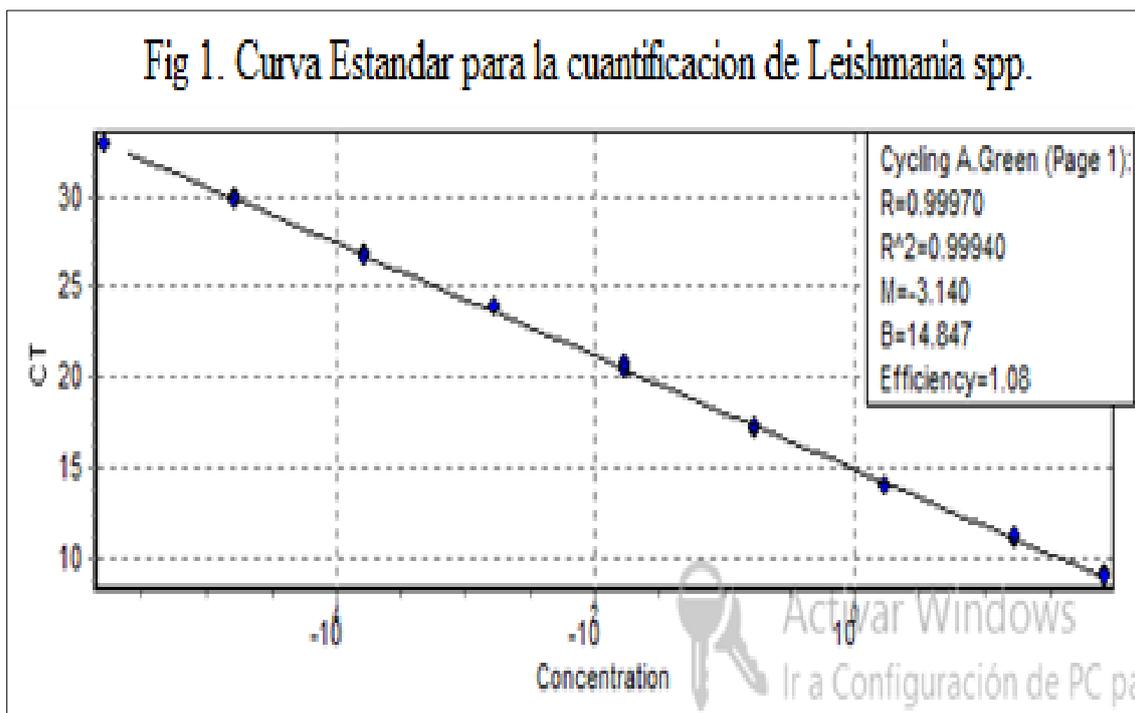
Los promastigotes de las cepas referenciales fueron mantenidos en medio bifásico de agar sangre base y Schneider Drosophila, suplementado al 20 por ciento con Suero Fetal Bovino inactivado por un periodo de 5 días hasta alcanzar la fase logarítmica de su desarrollo. La extracción del ADN fue según el protocolo de Kit PureLink™ Genomic ADN (Invitrogen) y se cuantificó con la lectora EON .Gen5 .versión 2.04.11 (BioTek), cuyo coeficiente de extinción es de $0.020 (\mu\text{g}/\text{mL})^{-1}\text{cm}^{-1}$ y la calidad del ADN se evaluó por la proporción entre las absorbancias a 260nm/280nm.

3.3.2. Cuantificación del ADN de las muestra de pacientes

El ADN total obtenido de las láminas fue cuantificado en la lectora EON .Gen5 .versión 2.04.11 (BioTek), mientras que la cuantificación del ADN parásitario fue realizado con la técnica estandarizada de qPCR del Laboratorio de Leishmaniasis, la cual emplea el gen ribosomal SSU RNA, con un producto esperado de 67pb. El volumen total de la reacción fue de 20µL, se utilizó 10µL del Mix Kapa Probe Fasta qPCR Kit (2X) y primers a 0.2µM (Tabla 3). El PCR consiste de 45 ciclos: denaturalización a 95°C x 30 seg., alineamiento y extensión a 60°C x 30 seg.

Tabla N° 3 : Primers y Sonda para el PCR cuantitativo (qPCR)	
Primers	Leish. U1- AAGTGCTTTCCCATCGCAACT Leish. L1 – GACGCACTAAACCCCTCCAA
Sonda	LEIS.P1 - FAM 5' CGGTTTCGGTGTGTGGCGCC-3' TAMR

La curva estándar se elaboró utilizando diluciones seriadas de ADN equivalentes a 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10^1 , 10^0 promastigotes de *Leishmania (V.) braziliensis* (Mary, 2004), utilizando la media de 2 réplicas por punto. Esta curva ofrece un coeficiente de determinación de 0.99970 y una eficiencia del 1.08 (Fig. 1).



3.4. EVALUACIÓN DEL LÍMITE DE DETECCIÓN Y EFICIENCIA EN LA IDENTIFICACIÓN DE LA ESPECIE INFECTANTE

La evaluación del límite de detección de los marcadores moleculares se realizó empleando *Leishmania (Viannia) braziliensis* como representante del Subgénero *Viannia* a diluciones de 49×10^4 , 49×10^3 , 49×10^2 , 49×10^1 , 49×10^0 , 5×10^0 , 10^0 parásito y *Leishmania (L.) mexicana* del Subgénero *Leishmania* a las diluciones de 19×10^4 , 19×10^3 , 19×10^2 , 19×10^1 , 19×10^0 , 10^0 parásito. En el caso de la eficiencia en la identificación, además de las especies descritas se utilizaron las cepas referenciales para obtener los porcentajes de identidad entre las diluciones y las muestras patrón.

3.5. IDENTIFICACIÓN DE LA ESPECIE DE *LEISHMANIA SP* A PARTIR DE LÁMINA

Se empleó la técnica molecular PCR-High Resolution Melting (PCR-HRM) para la identificación de especies del género *Leishmania spp*, empleando el fluoróforo Eva Green del kit comercial Type-it HRM PCR - Qiagen y como controles positivos el ADN de las cepas referenciales OMS pertenecientes al Laboratorio Referencial de Leishmaniasis – INS a una concentración de 10 ng/ul de DNA, 0.7 uM de los primers para la amplificación de la región conservada del minicírculo del kinetoplasto, gen hsp70 y ITS-1 y 1uM para el gen del cyt b. El ADN de las cepas referenciales procedía de las especies que se detallan a continuación:

<i>Leishmania (Viannia) braziliensis:</i>	MHOM/BR/75/M2904
<i>Leishmania (V.) peruviana:</i>	MHOM/PE/84/LC26
<i>Leishmania (V.) guyanensis:</i>	MHOM/BR/75/M4147
<i>Leishmania (V) lainsoni:</i>	MHOM/BR/81/M6426
<i>Leishmania (V.) panamensis:</i>	MHOM/PA/71/LS94
<i>Leishmania (Leishmania) amazonensis:</i>	MHOM/BR/73/M2269
<i>Leishmania (L.) mexicana:</i>	MNYC/BZ/62/M379

El control negativo estuvo constituido por agua libre de RNasa proveniente del Kit de HRM. Los protocolos dirigidos a la región conservada del minicírculo y al gen del citocromo B (cyt b) fueron estandarizados en el Laboratorio de Leishmaniasis del Instituto Nacional de Salud. Mientras que para la región del gen de la proteína de

choque térmico 70kDa (hsp70) y la región espaciadora 1 (ITS-1) fue utilizada la técnica de PCR-HRM estandarizada por Carolina Hernández et al., en el 2014, los oligonucleótidos empleados en el estudio se detallan a continuación:

Tabla N° 4: Marcadores y primers del PCR-HRM	
Marcador Molecular	Primers
Región conservada del minicírculo	OL1: (5'- GGG GAG GGG CGT TCT GCG AA -3') OL2: (5'-CCG CCC CTA TTT TAC ACC AAC CCC -3')
cyt b	LEI-CYTB11 (5'-TTT GTT ATT GAA TWT GAG GWA GTG A-3') LEI-CYTB12 (5'-TGC TAA AAA ACC ACT CAT AAA TAT ACT-3')
hsp70	HSP70F (5' AGG TGA AGG CGA CGA ACG 3') HSP70R (5' CGC TTG TCC ATC TTT GCG TC 3')
ITS-1	LITSR (5' CTG GAT CAT TTT CCG ATG 3') L5.8S (5' TGA TAC CAC TTA TCG CAC TT 3')

3.5.1. Protocolo de PCR-HRM de la región conservada del minicírculo

El PCR en tiempo real de la región conservada del minicírculo se desarrolló según el siguiente protocolo:

Type-it Qiagen 2X	1X	5.0 ul
OL1 (10 uM)	0.7 uM	0.7 ul
OL2 (10 uM)	0.7 uM	0.7 ul
Agua libre de RNAsa		1.6 ul
ADN		2.0 ul

Y a las siguientes condiciones de temperatura:

Denaturalización inicial de activación de la enzima a 95°C x 5 minutos y 35 ciclos de:

Denaturalización	95°C x 10 seg.
Alineamiento	55°C x 40 seg.
Extensión	72°C x 10 seg.

Seguido por un incremento progresivo de 1°C / seg. de temperatura en el intervalo de 65°C a 95°C

3.5.2. Protocolo de PCR-HRM de cyt b

El PCR en tiempo real de la región del citocromo b se desarrolló de la siguiente manera:

Type-it Qiagen 2X	1X	5.0 ul
LEI-CYTB11 (10 uM)	1.0 uM	1.0 ul
LEI-CYTB12 (10 uM)	1.0 uM	1.0 ul
ADN		3.0 ul

Y a las siguientes condiciones de temperaturas:

Denaturalización inicial para la activación de la enzima a 95°C x 5 minutos y 45 ciclos de:

Denaturalización	95°C x 10 seg.
Alineamiento	50°C x 40 seg.
Extensión	72°C x 60 seg.

Seguido por un incremento progresivo de 1°C / seg. de temperatura en el intervalo de 65°C a 95°C.

3.5.3. Protocolo de PCR-HRM de hsp70 e ITS 1

El PCR en tiempo real de la región del HSP70 e ITS 1 se desarrolló según el protocolo estandarizado por Carolina Hernández et al., 2014:

Type-it Qiagen 2X	1X	5.0 ul
HSP70 F/ ITS1, LITSR (10 uM)	0.7uM	0.7ul
HSP70 R/ L5.8S (10 uM)	0.7uM	0.7ul
ADN		3.6 ul

Y a las siguientes condiciones de temperatura:

Denaturalización inicial o de activación de la enzima 95°C x 5 minutos y 40 ciclos de:

Denaturalización 95°C x 10 seg.

Alineamiento y extensión 60°C x 60 seg.

Seguido por un incremento progresivo de 1°C / seg. de temperatura en el intervalo de 65°C a 95°C

Se realizó el *High Resolution Melting Analysis* (HRMA) para la identificación de especies de *Leishmania* de forma independiente para cada marcador, a un intervalo de confianza de 70 por ciento con el Software Rotor Gene.

3.6. SECUENCIAMIENTO DEL GEN DEL CITOCROMO B PARA LA CONFIRMACIÓN DE LAS CEPAS REFERENCIALES

El secuenciamiento se realizó a partir de los productos amplificados por PCR convencional del gen *cyt b* empleando los siguientes primers LEI-CYTB9 (5'- TAT GGT GTA GGT TTT AGT YTA GGT T - 3') y LEI-CYTB12 (5'-TGC TAA AAA ACC ACT CAT AAA TAT ACT - 3') y consistió de 35 ciclos: Denaturación a 95°C x 30seg, alineamiento a 53°C x 30 seg y la extensión a 72°C x 1 minuto, los productos fueron visualizados en agarosa al 1.5 por ciento y purificados por el kit de purificación PureLink PCR.

La reacción de Secuenciamiento utilizó el kit de Secuenciamiento BigDye (Life Technologies) independiente para cada primer. El primer *forward* tuvo 35 ciclos: denaturalización a 96°C x 10 seg., alineamiento a 50°C x 40 seg. y una extensión a 60°C x 4 minutos. En el caso del primer *reverse* la denaturalización fue a 96°C x 15 seg., el alineamiento a 51°C x 45 seg. y una extensión a 60°C x 4 minutos.

Finalmente los productos fueron purificados por precipitación con alcohol isopropílico y resuspendidos en Formamida HiDi para ser llevados al secuenciador ABI 3500xl (Applied Biosystem). La edición del Cromatograma se realizó con el programa Chromas Versión 2.6.4 y el alineamiento de las secuencias obtenidas en la amplificación con el programa Bioedit Versión 7.0.5, finalmente las secuencias nucleotídicas fueron comparadas con la base de datos del GenBank.

3.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

- Análisis del límite de detección y eficiencia en la identificación de las especies de *Leishmania spp* con los marcadores moleculares dirigidos a la región conservada del minicírculo, gen del citocromo B (cyt b), gen de la proteína de choque térmico70 (hsp 70) y el segmento intergénico 1 (ITS-1).
- Estimación de la sensibilidad en los marcadores moleculares.
- Análisis estadístico de la relación entre la identificación de las especies de *Leishmania spp* con el grado de parasitemia de los extendidos en las láminas y su antigüedad.

3.8. DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA

Finalmente se realizó la distribución geográfica de las especies de *Leishmania spp* en 8 departamentos del territorio peruano.

IV. RESULTADOS Y DISCUSION

4.1 SELECCIÓN DE LAS MUESTRAS INCLUIDAS EN EL ESTUDIO

La muestra del estudio estuvo constituida por 243 láminas coloreadas por Giemsa conformado por 29 del 2010, 54 del 2011, 98 del 2012 y 62 del 2013, el número total de láminas del frotis fue determinado mediante la fórmula descrita en material y métodos:

$$M = 3 * g^2$$

Se consideró 9 categorías relacionadas a las especies de *Leishmania* descritas para las Américas (7 especies empleadas como controles en el presente estudio, más las especies *Leishmania (Viannia) shawi* y *Leishmania (Leishmania) chagasi*, circulantes en Brazil). Por otro lado, el total de láminas fue agrupado según la carga parasitaria encontrada por campo durante la lectura microscópica a 1000X con objetivo de inmersión.

El número de cada grupo se resume en la siguiente tabla.

Tabla N° 5 : Láminas por grupos de clasificación			
Grupo I	Grupo II	Grupo III	Grupo IV
+	++	+++	++++
$n1 = M * (N1/MM)$	$n2 = M * (N1/MM)$	$n3 = M * (N1/MM)$	$n4 = M * (N1/MM)$
$n1 = 243*(33/861)$	$n2 = 243*(309/861)$	$n3 = 243*(154/861)$	$n4 = 243*(365/861)$
n1= 9	n2= 87	n3= 44	n4= 103

4.2 SECUENCIAMIENTO DEL CYT B DE LAS CEPAS REFERENCIALES

Las cepas referenciales utilizadas fueron identificadas fenotípicamente por Electroforesis Multilocus Enzimática (MLEE) por lo tanto para confirmar su identidad se realizó la tipificación genotípica mediante el secuenciamiento del cyt b. Las secuencias nucleotídicas de las cepas referenciales obtenidas mediante el secuenciamiento fueron comparadas e identificadas con la base de datos del GenBank, asegurando así su identidad antes de utilizarlas como Cepas Referenciales en el análisis de PCR-HRM (Tabla 6; Anexo 2).

Cepa	Especie	% de identidad
<i>MHOM/BR/73/M2269</i>	<i>Leishmania (L.) amazonensis</i>	99
<i>MNYC/BZ/62/M379</i>	<i>Leishmania (L.) mexicana</i>	97
<i>MHOM/BR/81/M6426</i>	<i>Leishmania (V) lainsoni</i>	99
<i>MHOM/BR/75/M4147</i>	<i>Leishmania (V.) guyanensis</i>	99
<i>MHOM/BR/75/M2904</i>	<i>Leishmania (V.) braziliensis</i>	99
<i>MHOM/PE/84/LC26</i>	<i>Leishmania (V.) peruviana</i>	99
<i>MHOM/PA/71/LS94</i>	<i>Leishmania (V.) panamensis</i>	99

4.3 CUANTIFICACIÓN DE ADN PARASITARIO DE LAS LÁMINAS

Se cuantificó el ADN total mediante espectrofotometría (ADN del hospedero mas ADN del parásito) y sólo el ADN parasitario mediante qPCR procedentes de las láminas con coloración Giemsa. No se encontró asociación estadísticamente significativa entre la concentración de ADN total con el ADN parasitario ni entre la concentración de ADN total y la carga parasitaria (Anexo 1).

4.4 LÍMITE DE DETECCIÓN Y EFICIENCIA EN LA IDENTIFICACIÓN DE LA ESPECIE INFECTANTE

La evaluación del límite de detección se realizó por duplicado con las diluciones descritas en materiales y métodos, mientras que la eficiencia en la identificación de la

especie fue desarrollada empleando además de las diluciones de *Leishmania* (*Leishmania*) *mexicana* y *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* descritas, los ADN de las cepas referenciales de *Leishmania* (*L.*) *amazonensis*, *Leishmania* (*L.*) *mexicana*, *Leishmania* (*V.*) *lainsoni*, *Leishmania* (*V.*) *guyanensis*, *Leishmania* (*V.*) *braziliensis*, *Leishmania* (*V.*) *peruviana* y *Leishmania* (*V.*) *panamensis*.

4.4.1 Región conservada del minicírculo

El límite de detección encontrado para la región conservada del minicírculo fue equivalente a 1 parásito/reacción en ambos subgéneros, con valores de Ct que fueron incrementándose proporcionalmente según las diluciones empleadas para ambas especies (Fig.2, 3).

Tabla N° 7: Diluciones de *L. (L.)mexicana* para la región conservada del minicírculo

Concentración de ADN	N° de parásitos	Ct	Especie	%
16.15 ng/ μ L	19×10^4 parásitos	5.56	<i>L. (L.)mexicana</i>	86.60
1.615 ng/ μ L	19×10^3 parásitos	8.37	<i>L. (L.)mexicana</i>	99.78
0.1615 ng/ μ L	19×10^2 parásitos	11.70	<i>L. (L.)mexicana</i>	98.89
0.1615 ng/ μ L	19×10^1 parásitos	15.18	<i>L. (L.)mexicana</i>	97.88
0.01615 ng/ μ L	19×10^0 parásitos	19.00	<i>L. (L.)mexicana</i>	98.52
0.001615ng/ μ L	1×10^0 parásitos	22.37	<i>L. (L.)mexicana</i>	98.06

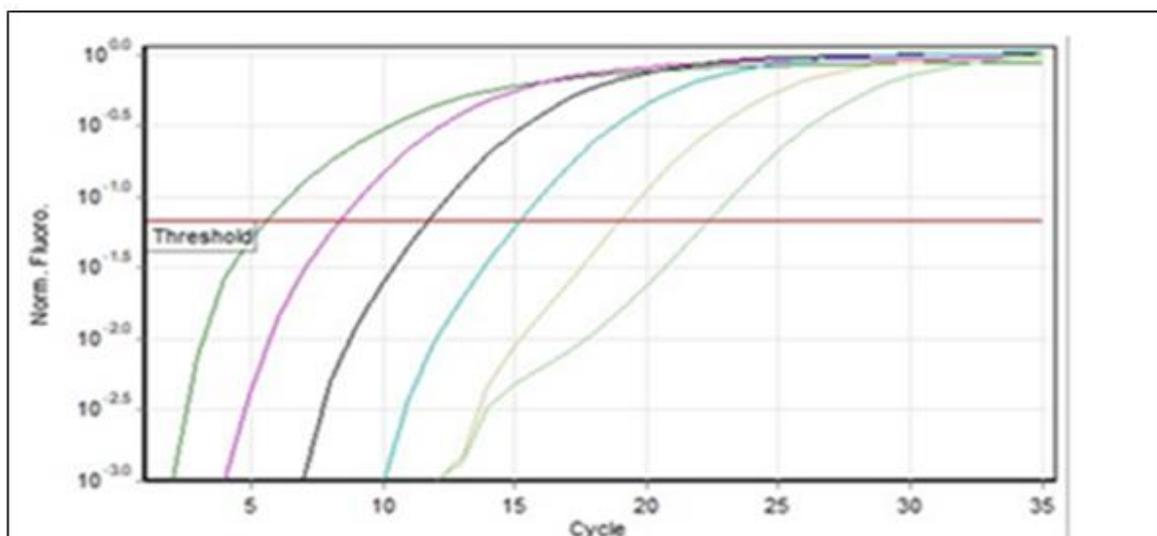


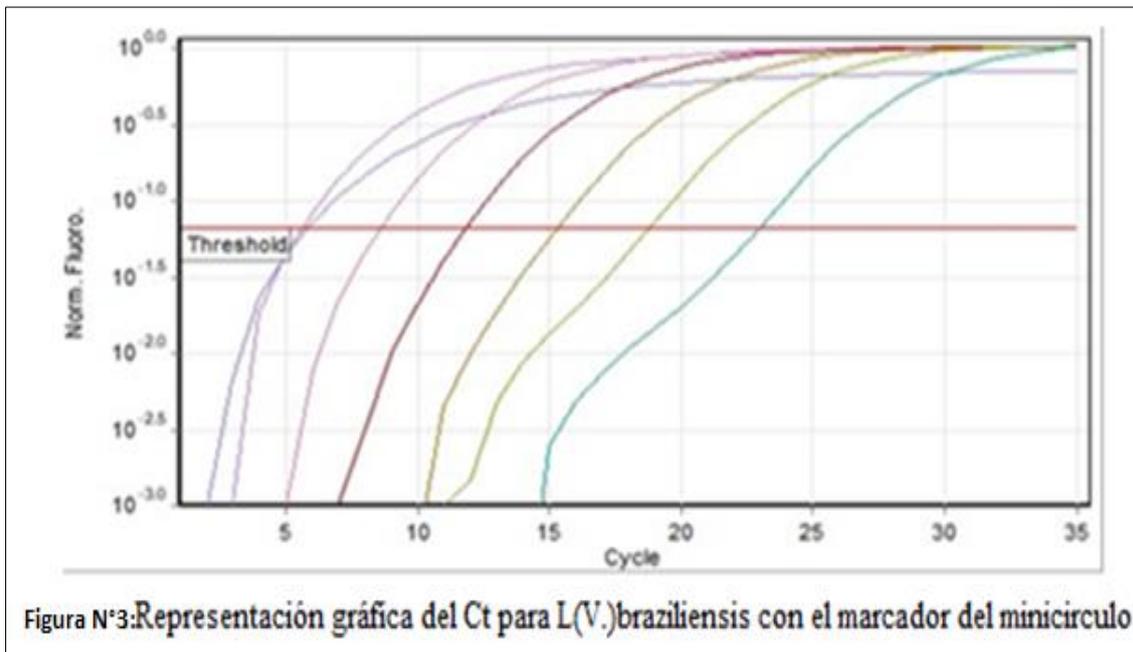
Figura N°2: Representación gráfica del Ct para *L.(L.)mexicana* con el marcador del minicírculo.

La especie *Leishmania (Leishmania) mexicana* fue identificada correctamente en las 6 diluciones empleadas, el intervalo de identificación a las concentraciones de 19×10^3 a 1×10^0 parásitos/reacción alcanzaron valores de similitud por encima del 95 por ciento, mientras que a la concentración 19×10^4 parásitos/reacción, el porcentaje de similitud con la muestra patrón fue menor al 90 por ciento, en este caso del 86.6 por ciento (Tabla 7).

Similar a lo anterior, *Leishmania (V.) braziliensis* fue correctamente identificada en todas las diluciones empleadas, la identificación a las concentraciones de 49×10^3 a 5×10^0 parásitos/reacción alcanzaron un valor de similitud mayor al 95 por ciento, al igual que *Leishmania (L.) mexicana*. Sin embargo, a las concentraciones de 49×10^4 parásitos/reacción y 1 parásito/reacción el porcentaje de similitud fue menor, 92.2 por ciento y 89.6 por ciento respectivamente (Tabla 8).

Tabla N° 8: Diluciones de <i>L. (V.)braziliensis</i> para la región conservada del minicírculo				
Concentración de ADN	N° de parásitos	Ct	Especie	%
41.00 ng/ μ L	49×10^4 parásitos	5.85	<i>L. (V.)braziliensis</i>	92.92
4.1 ng/ μ L	49×10^3 parásitos	5.60	<i>L. (V.)braziliensis</i>	96.67
0.41 ng/ μ L	49×10^2 parásitos	8.60	<i>L. (V.)braziliensis</i>	98.98
0.041 ng/ μ L	49×10^1 parásitos	11.86	<i>L. (V.)braziliensis</i>	99.03
0.0041 ng/ μ L	49×10^0 parásitos	15.34	<i>L. (V.)braziliensis</i>	98.41
0.00041ng/ μ L	5×10^0 parásitos	18.83	<i>L. (V.)braziliensis</i>	97.64
0.000041 ng/ μ L	1×10^0 parásito	23.00	<i>L. (V.)braziliensis</i>	89.59

Por otro lado, las concentraciones de ADN no produjeron variaciones significativas en la temperatura melting (Tm) de las especies evaluadas en concordancia con estudios previos realizados a intervalos de concentraciones de ADN correspondientes a 0.1 a 10^5 parásitos /reacción en especies del Viejo Mundo (Nicolás, 2002; Khademvagan, 2011). El análisis del presente estudio fue realizado con las diluciones de 49×10^4 a 1 parásito/reacción, encontrando valores de Tm promedio para *Leishmania (V.) braziliensis* de $83^\circ\text{C} \pm 0.29$ y $85.1^\circ\text{C} \pm 0.19$ para *L. (L.) mexicana*.



El límite de detección de parásitos de *Leishmania spp* empleando la región conservada de los minicírculo fue equivalente a 1 parásito/reacción tanto para *L. (V.) braziliensis* como *L. (L.) mexicana*, en concordancia con los resultado obtenido para el mismo marcador en especies del Viejo Mundo, como *Leishmania (L.) major* cuyo límite de detección fue de 0.1 a 1 parásito/reacción (Anders, 2002; Nicolás, 2002).

En contraste a los resultados obtenidos investigaciones previas determinaron como límite de detección el equivalente a 0.012 parásitos /reacción con el uso del PCR convencional, así como los resultados del análisis de PCR cuantitativo (qPCR) cuyo límite de detección fue optimizado a partir de 0.0125 parásitos/mL para la especie de *Leishmania (L.) infantum* (Salotra, 2001; Nicolás, 2002; Mary, 2004).

Asimismo los límites de detección para especies del Nuevo Mundo con la técnica de PCR cuantitativo fueron concentraciones menores. Según Jara, 2013 quien evaluó lesiones de biopsias procedentes de manifestaciones clínicas cutáneas y mucosas la concentración mínima de ADN para la identificación y cuantificación en el Subgénero *Viannia* fue equivalente a 0.005 parásitos/reacción. Otro estudio evaluó la misma técnica en la especie de *L. (V.) braziliensis* para el diagnóstico en humanos y reservorios, obteniendo como límite de detección el equivalente a 1.2 parásitos /reacción, mientras que León, en el 2017 determinó como límite de detección para 6 especies de *Leishmania* en Colombia en equivalente a 0.01 parásitos /mL (Jara, 2013; León, 2017).

Análisis de las Curvas Melting para muestras de pacientes

Las Tm promedio de las muestras obtenidas por el software del Rotor Gene fueron representados en gráficas de cajas en la plataforma R, indicando la media y la desviación estándar para cada una de las especies evaluadas, el análisis identificó los Subgéneros *Viannia* y *Leishmania* (Fig. 4).

Tabla N° 9: Temperatura Melting de las muestras por PCR-HRM				
Especie	Posible Cepa	Tm	s	(LS-LI)
<i>L. (L.)amazonensis</i>	-	83.63	0.13	83.50-83.76
<i>L. (L.)mexicana</i>	-	85.03	0.15	84.88-85.18
<i>L. (V.)lainsoni</i>	A	80.38	0.29	80.09-80.67
	B	81.20	0.19	81.01-81.39
	C	82.47	0.17	82.30-82.64
<i>L. (V.)panamensis</i>	A	84.38	0.19	84.19-84.57
	B	82.11	0.14	81.97-82.25
<i>L. (V.)guyanensis</i>	A	80.60	0.14	80.46-80.74
	B	81.57	0.11	81.46-81.68
	C	82.05	0.08	81.97-82.13
	D	83.33	0.19	83.14-83.52
<i>L. (V.)braziliensis</i>	A	82.39	0.19	82.20-82.58
	B	84.45	0.15	84.30-84.60
	C	85.00	-	85.00
<i>L. (V.)peruviana</i>	-	82.37	0.16	82.21-82.53

Las especies del Subgénero *Leishmania*, *L. (L.) amazonensis* y *L. (L.) mexicana* fueron identificadas efectivamente debido a que las temperaturas melting entre ellas no se solapan a diferencia de las especies del Subgénero *Viannia*. Las temperaturas melting de las especies *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) panamensis*, *L. (V.) guyanensis* y *L. (V.) braziliensis* presentan variaciones que indican la presencia de diferentes cepas dentro de cada especie.

Algunas de las temperaturas melting promedio de las cepas pueden solaparse con otras especies generando errores de identificación, en el caso de *L. (V.) braziliensis*, presenta 3 cepas, la posible cepa A (Tm = 82.39, s= 0.19) puede solaparse con la temperatura melting de *L. (V.) peruviana* (Tm = 82.37, s= 0.16) a diferencia de las otras dos cepas que si permiten la diferenciación entre ambas especies.

El solapamiento también ocurre en otras especies que pertenecen al mismo complejo, en el caso de *L. (V.) guyanensis* que presenta 4 cepas, la cepa B (81.57, s= 0.11) y cepa C

(82.05, s= 0.08) tienen valores promedio de las temperaturas melting que se solapa con la cepa B de *L. (V.) panamensis*, ambas especies del complejo *L.guyanensis*.

Además del solapamiento entre especies del mismo complejo también se generó entre especies de complejos diferentes como son los casos entre la cepa de C de *L. (V.) lainsoni* (82.47, s = 0.17), *L. (V.) peruviana* (Tm = 82.37, s= 0.16) y la cepa A de la especie de *L. (V.) braziliensis* (Tm = 82.39, s= 0.19), así también entre las cepas A de *L. (V.) lainsoni* (Tm = 80.38, s=0.29) y *L.guyanensis* (Tm = 80.60, s=0.14).

Los resultados indican la presencia de posibles variaciones en las secuencias nucleotídicas de la región conservada de los minicírculos dentro de una misma especie, resultados que coinciden con investigaciones recientes del secuenciamiento de alto rendimiento de toda la molécula en la región Neotropical, donde coexisten una alta diversidad de especies del género *Leishmania*. Debido a que estas moléculas genómicas tienen la peculiaridad de coexistir en varias clases dentro de una sola célula parásita es necesario para su caracterización, el aislamiento de la población de minicírculos, el clonamiento de los productos de PCR y el secuenciamiento posterior (Kocker, 2017).

Otra dificultad en la evaluación del minicírculo como marcador molecular es la variabilidad en el número y la identidad de las clases de minicírculos entre las cepas e incluso dentro de la misma especie, para lo cual se está utilizando la estrategia similar al Barcoding que no se basa en el conocimiento previo de homología entre los minicírculos.

Por lo tanto, a pesar de que los minicírculos son considerados marcadores de alta sensibilidad por las aproximadamente 10000 copias/ parásito y sus secuencias conservadas de amplia cobertura de identificación, la diversidad de la región conservada del minicírculo reportada por el secuenciamiento de alto rendimiento demostró los posibles solapamientos entre las temperaturas melting, entre las especies, dentro de ellas o incluso en una sola célula parasitaria lo que llevaría a un error en la identificación de especies.

REGION CONSERVADA DEL MINICIRCULO

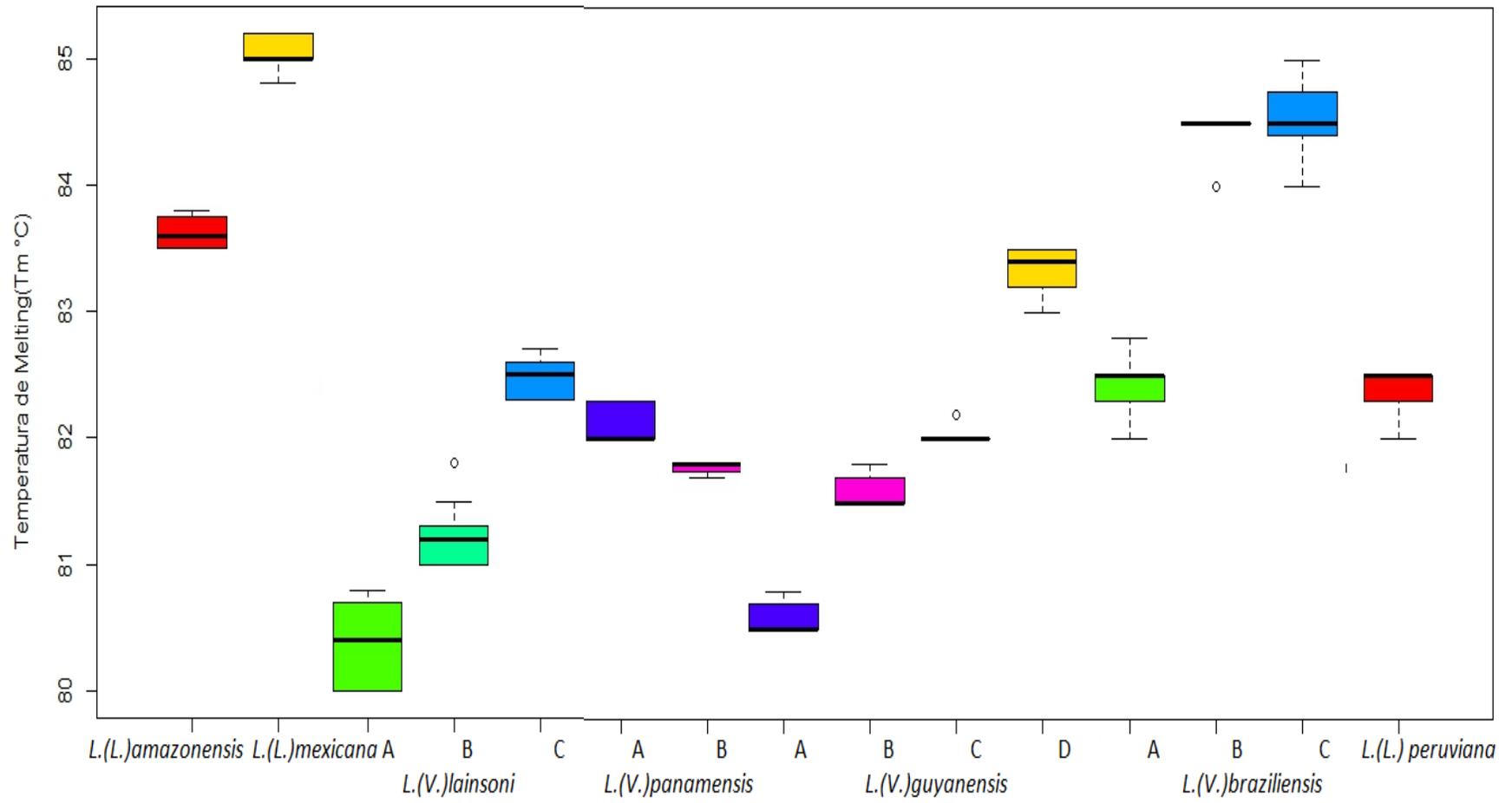


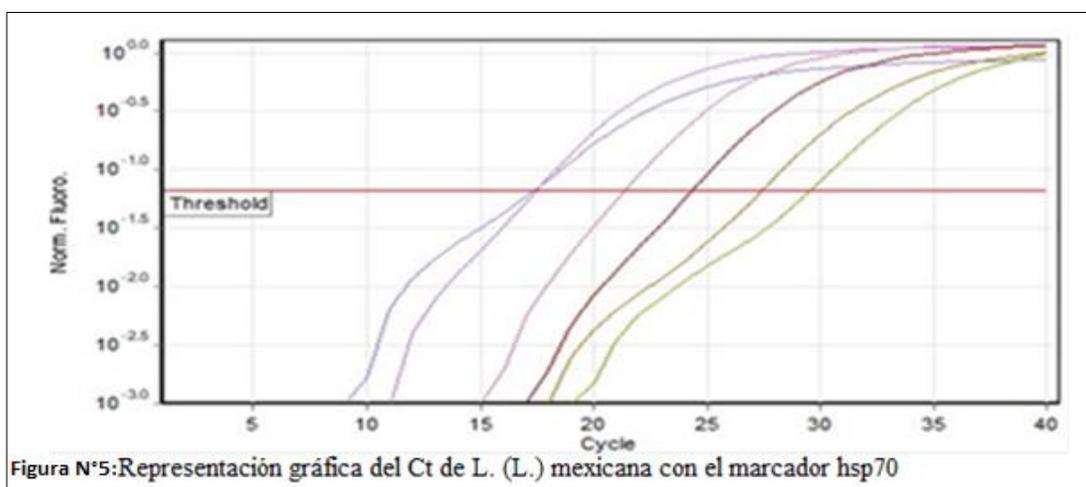
Figura N° 4: Diagrama en caías del Tm de las muestras para el marcador de la región conservada del minicirculo

4.4.2. Marcador hsp 70

El límite de detección encontrado fue equivalente a 1 parásito para ambas especies, con valores de Ct proporcionales a la dilución empleada en *Leishmania (L.) mexicana*, similar al marcador descrito líneas arriba (Fig. 5), sin embargo en *Leishmania (V.) braziliensis* los valores de proporcionalidad no se mantuvieron en las diluciones (Fig. 6).

La identificación de *Leishmania (L.) mexicana* fue correcta en 4 de las 6 diluciones empleadas, las concentraciones de 19×10^3 y 19×10^2 parásitos/reacción presentaron un valor de similitud con la muestra control superior al 95 por ciento, sin embargo a la concentración de 19×10^4 /reacción el valor de similitud fue de 89.3 por ciento y a la concentración de 19×10^1 parásitos/reacción la similitud fue del 87.6 por ciento, por debajo de esta concentración no se logró identificar las diluciones restantes (Tabla 10).

Tabla N° 10: Diluciones de <i>L. (L.) mexicana</i> para hsp 70				
Concentración de ADN	N° de parásitos	Ct	Especie	%
16.15 ng/ μ L	19×10^4 parásitos	17.39	<i>L. (L.) mexicana</i>	89.29
1.615 ng/ μ L	19×10^3 parásitos	17.50	<i>L. (L.) mexicana</i>	97.05
0.1615 ng/ μ L	19×10^2 parásitos	21.41	<i>L. (L.) mexicana</i>	98.71
0.1615 ng/ μ L	19×10^1 parásitos	24.35	<i>L. (L.) mexicana</i>	87.60
0.01615 ng/ μ L	19×10^0 parásitos	27.45	Variación	-
0.001615ng/ μ L	1×10^0 parásitos	29.62	Variación	-



En el caso de *Leishmania (V.) braziliensis* hubieron discordancias debido a que 2 de las 3 diluciones fueron identificadas como *Leishmania (Viannia) guyanensis*. La identificación eficiente de la especie fue posible a la concentración de 49×10^3 parásitos/reacción, con una similitud del 99.93 por ciento con la muestra control, mientras que a las concentraciones de 49×10^4 y 49×10^2 parásitos/reacción la muestra de *Leishmania (Viannia) braziliensis* fue identificada como *Leishmania (Viannia) guyanensis* con una similitud del 98.83 por ciento y 94.85 por ciento respectivamente, concentraciones por debajo de 49×10^2 parásitos/reacción no lograron ser identificadas (Tabla 11).

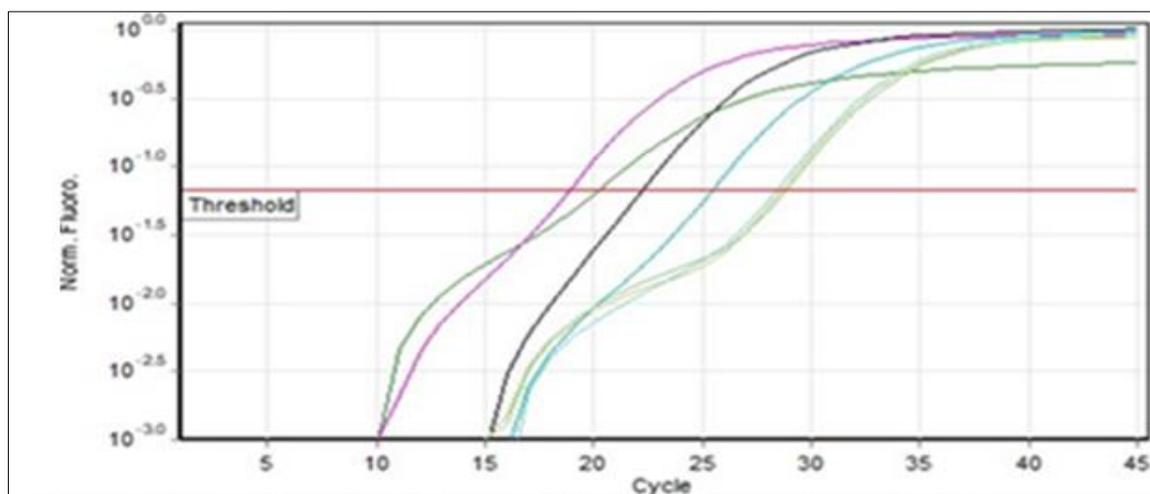


Figura N°6: Representación gráfica del Ct para L.(V.) braziliensis con el marcador hsp70

Tabla N° 11: Diluciones de <i>L.(V.) braziliensis</i> para hsp70				
Concentración de ADN	N° de parásitos	Ct	Especie	%
41.00 ng/ μ L	49×10^4 parásitos	20.29	<i>L. (V.) guyanensis</i>	98.83
4.1 ng/ μ L	49×10^3 parásitos	18.89	<i>L. (V.) braziliensis</i>	99.93
0.41 ng/ μ L	49×10^2 parásitos	22.28	<i>L. (V.) guyanensis</i>	94.85
0.041 ng/ μ L	49×10^1 parásitos	25.46	Variación	-
0.0041 ng/ μ L	49×10^0 parásitos	28.68	Variación	-
0.00041ng/ μ L	5×10^0 parásitos	28.86	Variación	-
0.000041 ng/ μ L	1×10^0 parásito	28.47	Variación	-

Al igual que en el marcador anterior se determinó la T_m en cada una de las diluciones, en *Leishmania (L.) mexicana*, la T_m promedio fue 93.1°C ± 0.17, mientras para *Leishmania (V.) braziliensis* fue 94°C en este caso se solapo con la T_m de *Leishmania (V.) guyanensis* impidiendo la correcta identificación de la especie, la causa probable del resultado es la cercana relación entre las especies del subgénero *Viannia*, resultados similares fueron obtenidos en estudios previos donde evaluaron diluciones de 50ng a 50fg (correspondientes al ADN de 5.0 x 10⁵ a 0.5 parásitos) identificando fluctuaciones en los valores de la T_m y el solapamiento con otras especies (Zampieri, 2016).

El análisis de Melting para el marcador hsp70 determinó al intervalo 19x10⁴ a 19 x 10 parásitos/reacción como la concentración de ADN adecuada para la identificación eficiente de *Leishmania (Leishmania) mexicana*, en el caso de *Leishmania (Viannia) braziliensis*, este marcador sólo permitió la identificación a la concentración de 49x10³ parásitos, otros autores evaluaron series de diluciones (factor 10) para la identificación de *Leishmania spp* en el Nuevo Mundo, en el 2014, León et al., en muestras procedentes de cultivo axénico y empleando el mismo marcador, determinó que el equivalente a 0.1 parásito/reacción es la concentración mínima necesaria para generar las curvas de disociación específicas, 0.5 parásitos/reacción en el 2016 según Zampieri, y el equivalente a 10 parásitos/ mL en 6 especies de *Leishmania spp* en Colombia (Hernández , 2014, Zampieri, 2016, León, 2017).

Análisis de las Curvas Melting para muestras de pacientes

La T° Melting de las especies con el marcador hsp70 diferenció el Subgénero *Leishmania* de *Viannia*, resultado que se evidencio previamente en el estudio realizado en el 2014 por Hernández et al, que a su vez diferenció el complejo *L.(L.) mexicana* de *L (L.) infantum* - *L.(L.) amazonensis*, así como *L. (V.) panamensis* de *L. (V.) guyanensis* - *L. (V.) braziliensis* (Hernández et al.,2014), sin embargo los resultados de la presente evaluación que solo diferenciaron los subgéneros son atribuidos al mínimo número de muestras evaluadas, correspondientes a las cepas referenciales usadas durante la identificación por la técnica PCR- HRM (Tabla 12, Fig.7).

Especie	Tm	s	(LS-LI)
<i>L.(L.)amazonensis</i>	93.17	0.40	92.77-93.57
<i>L.(L.)mexicana</i>	93.17	0.15	93.02-93.32
<i>L.(V.)lainsoni</i>	93.60	0.17	93.43-93.77
<i>L.(V.)panamensis</i>	93.93	0.12	93.81-94.05
<i>L.(V.)guyanensis</i>	93.83	0.29	93.54-94.12
<i>L.(V.)braziliensis</i>	94.00	0	94.00
<i>L.(V.)peruviana</i>	94.00	0	94.00

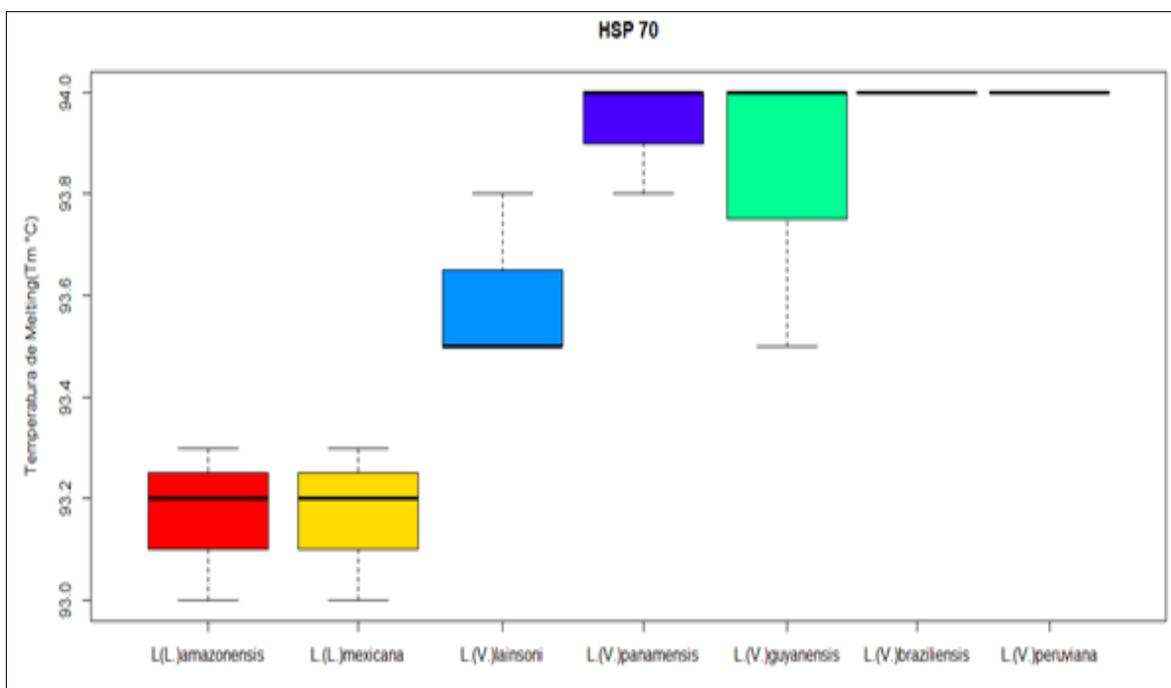


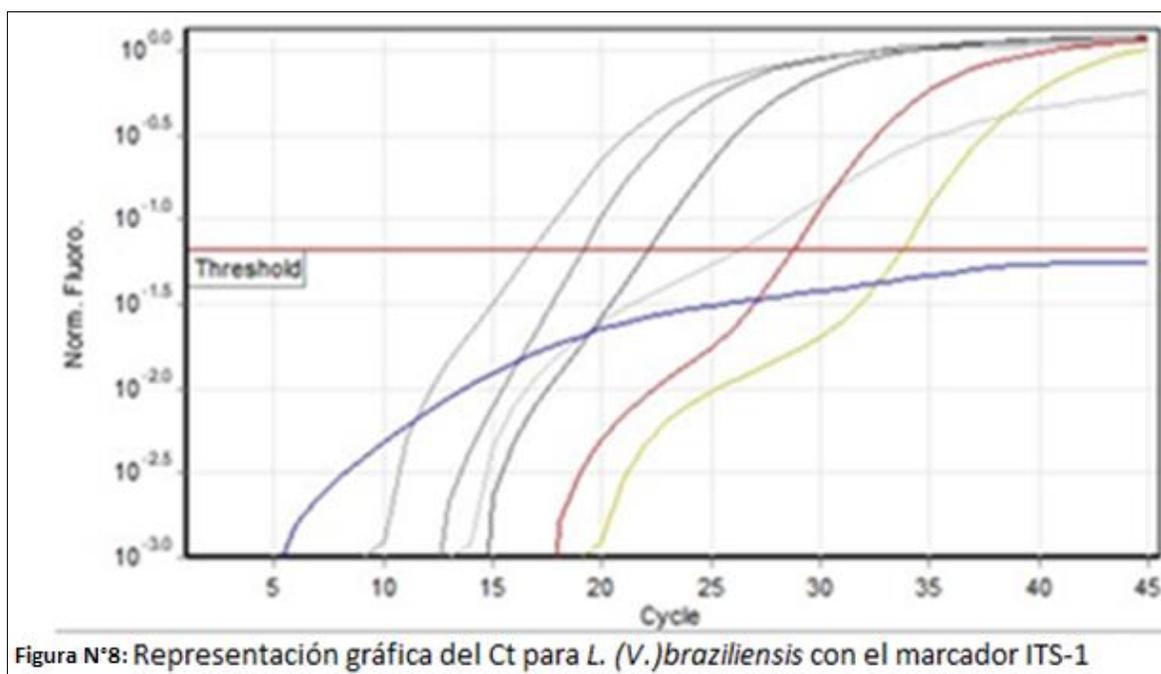
Figura N° 7: Diagrama en cajas del Tm de las muestras para el marcador de hsp70

4.4.3. Marcador de la región intergénica 1 (ITS-1)

Al igual que los marcadores anteriores, éste presentó un aumento proporcional del Ct según las diluciones para ambas especies (Fig.8, 9). El límite de detección fue diferenciado, para la especie *Leishmania (Viannia) braziliensis* fue de 5×10^0 parásitos/reacción, mientras para *Leishmania (Leishmania) mexicana* fue a partir de 1×10^0 parásito/reacción.

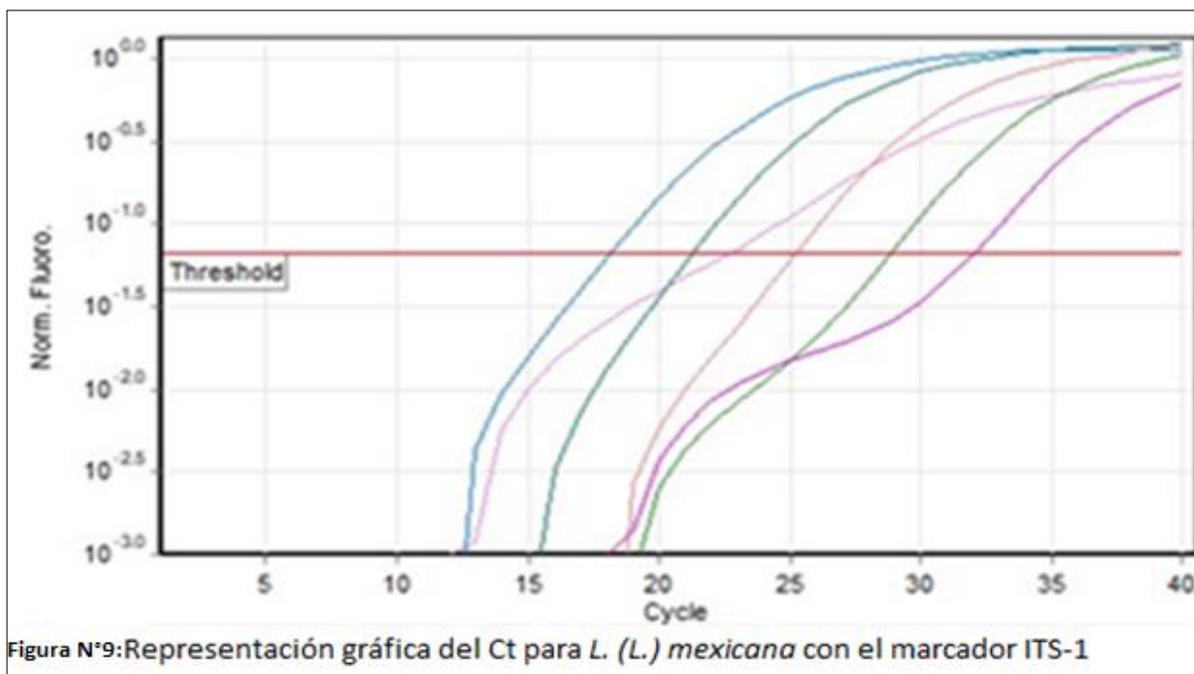
Tabla N° 13: Diluciones de <i>L. (V.)braziliensis</i> para ITS-1				
Concentración de ADN	N° de parásitos	Ct	Especie	%
41.00 ng/ μ L	49×10^4 parásitos	24.46	<i>L. (V.)braziliensis</i>	86.93
4.1 ng/ μ L	49×10^3 parásitos	16.83	<i>L. (V.)braziliensis</i>	98.87
0.41 ng/ μ L	49×10^2 parásitos	19.12	<i>L. (V.)braziliensis</i>	99.70
0.041 ng/ μ L	49×10^1 parásitos	22.18	<i>L. (V.)braziliensis</i>	97.26
0.0041 ng/ μ L	49×10^0 parásitos	28.80	<i>L. (V.)braziliensis</i>	95.39
0.00041ng/ μ L	5×10^0 parásitos	33.73	<i>L. (V.)braziliensis</i>	75.83
0.000041 ng/ μ L	1×10^0 parásito	-	Variación	-

En el caso de *Leishmania (Viannia) braziliensis* se pudo identificar correctamente 6 de las 7 diluciones empleadas, el intervalo de identificación con un porcentaje de similitud mayor del 95 por ciento fue de 49×10^3 parásitos a 49×10^0 parásitos/reacción, mientras para la concentraciones de 49×10^4 parásitos y 5×10^0 parásitos/reacción el porcentaje alcanzado es de 87 por ciento y 76 por ciento de similitud con la muestra referencial. A la concentración de 1×10^0 parásito/reacción no se logró la identificación de la especie. (Tabla 13).



En cambio para la especie *Leishmania (Leishmania) mexicana* sólo se identificó adecuadamente en 4 de las 6 diluciones, las concentraciones de 19×10^3 y 19×10^2 parásitos/reacción alcanzaron porcentajes de similitud mayores al 95 por ciento, mientras que a la concentración 19×10^4 parásitos/reacción disminuye hasta el 79 por ciento de similitud, por otro lado a la concentración 19×10^1 parásitos/reacción la identificación es correcta con un porcentaje de similitud del 94.6 por ciento. A las concentraciones de 19×10^0 y 1×10^0 parásito/reacción no se logró realizar la identificación de especie (Tabla 14).

Concentración de ADN	N° de parásitos	Ct	Especie	%
16.15 ng/ μ L	19×10^4 parásitos	22.74	<i>L. (L.) mexicana</i>	79.22
1.615 ng/ μ L	19×10^3 parásitos	18.17	<i>L. (L.) mexicana</i>	99.10
0.1615 ng/ μ L	19×10^2 parásitos	21.32	<i>L. (L.) mexicana</i>	98.93
0.1615 ng/ μ L	19×10^1 parásitos	25.21	<i>L. (L.) mexicana</i>	94.58
0.01615 ng/ μ L	19×10^0 parásitos	28.89	Variación	-
0.001615ng/ μ L	1×10^0 parásito	32.05	Variación	-



La Tm promedio de las diluciones de *Leishmania (Viannia) braziliensis* fue 85.39 ± 1.08 , la desviación amplia es producida por la Tm de la máxima y mínima dilución, 49×10^4 parásitos/reacción y 1 parásitos/reacción respectivamente, mientras para *Leishmania (L.) mexicana* la Tm encontrada fue de 85.02 ± 0.18 .

El análisis Melting con el marcador ITS-1 empleando el equipo Rotor Gene Q, determinó el límite de detección de 5 parásitos / reacción para *Leishmania (Viannia) braziliensis* y el equivalente a 1 parásito / reacción para *Leishmania (Leishmania) mexicana*, sin embargo investigaciones previas obtuvieron mayor sensibilidad en la región evaluada del gen hsp70, equivalentes a 0.1 parásitos/mL para especies de *Leishmania* en el Nuevo Mundo y a 0.25 parásitos/reacción en el 2010 con la técnica de PCR cuantitativo para especies del Viejo Mundo (Talmi, 2010, Hernandez, 2014, León, 2017).

Análisis de las Curvas Melting para muestras de pacientes

Las medianas y las desviaciones estándar evidencian que el análisis de la Tm para el marcador ITS-1 tiene el alcance de identificar los Subgéneros *Leishmania* y *Viannia*, sin embargo no diferencia especies dentro del mismo subgénero (Tabla 15, Fig.10).

Tabla N° 15: Temperatura melting ITS-1			
Especie	Tm	S	(LS-LI)
<i>L.(L.)amazonensis</i>	86.26	0.72	85.54-86.98
<i>L.(L.)mexicana</i>	86.12	0.69	85.43-86.81
<i>L.(V.)lainsoni</i>	83.84	1.74	82.10-85.58
<i>L.(V.)panamensis</i>	84.77	0.47	84.30-85.24
<i>L.(V.)guyanensis</i>	84.71	0.58	84.13-85.29
<i>L.(V.)braziliensis</i>	84.33	2.23	82.10-86.56
<i>L.(V.)peruviana</i>	84.86	0.68	84.18-85.54

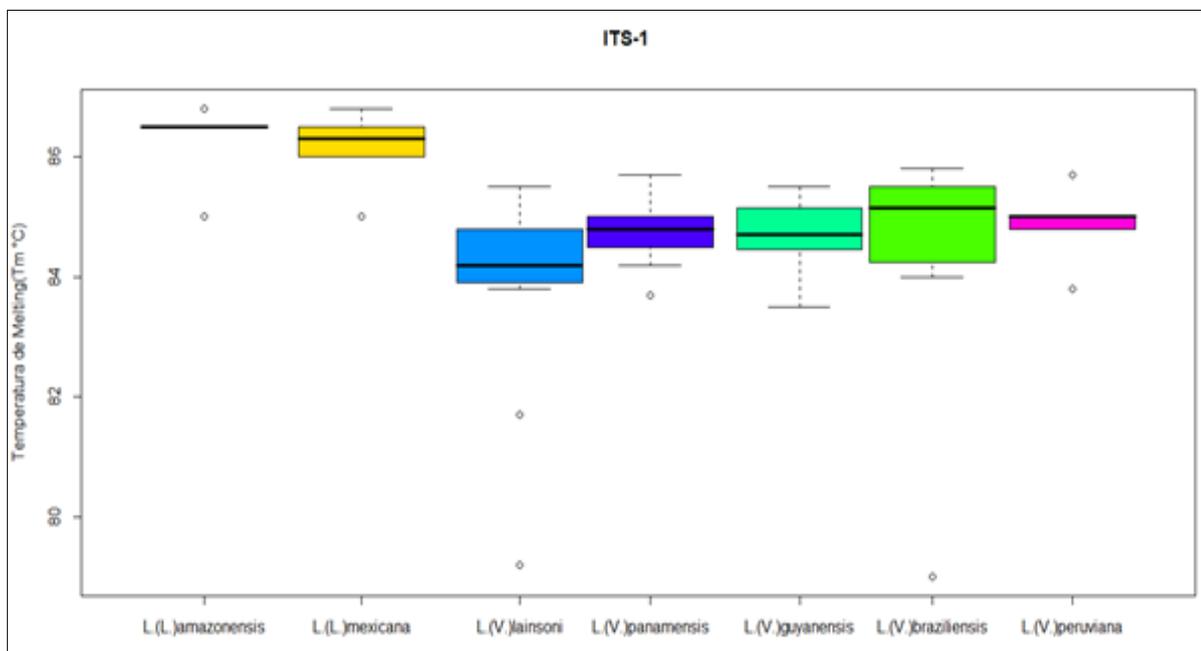


Figura N°10: Diagrama en cajas del Tm de las muestras para el marcador de ITS-1

Los resultados obtenidos contrastan con la investigación previa de Hernández et al., donde se identificó eficientemente las especies de *Leishmania spp* por la técnica PCR- HRM en el Nuevo Mundo usando el marcador ITS-1. Discriminó entre las especies de *L.infantum* (78.32 ± 0.41) de *L. (L.) amazonensis* (80.90 ± 0.39), así como *L. (V.) braziliensis* (78.75 ± 0.21) de *L.(V.) guyanensis* (79.23 ± 0.02) (Hernández ,2014), sin embargo en el presente estudio los valores de Tm no diferenciaron especies dentro del mismo Subgénero lo cual se atribuye al escaso número de muestras identificadas por el marcador, que corresponde a las cepas referenciales de cada reacción de PCR-HRM y 26 de las 243 láminas evaluadas en el estudio.

4.4.4. Marcador del cyt b

El límite de detección para este marcador fue de 1 parásito para ambas especies, sin embargo solo se identificó correctamente la especie de *L. (V.) braziliensis* a la concentración 49×10^1 parásitos/reacción con 98.55 por ciento de similitud con la muestra

referencial (Tabla 16). Los errores en la identificación de las diluciones 49×10^3 parásitos, 49×10^2 parásitos y 5×10^0 parásitos/reacción es atribuido a la amplificación irregular del marcador (Fig.11).

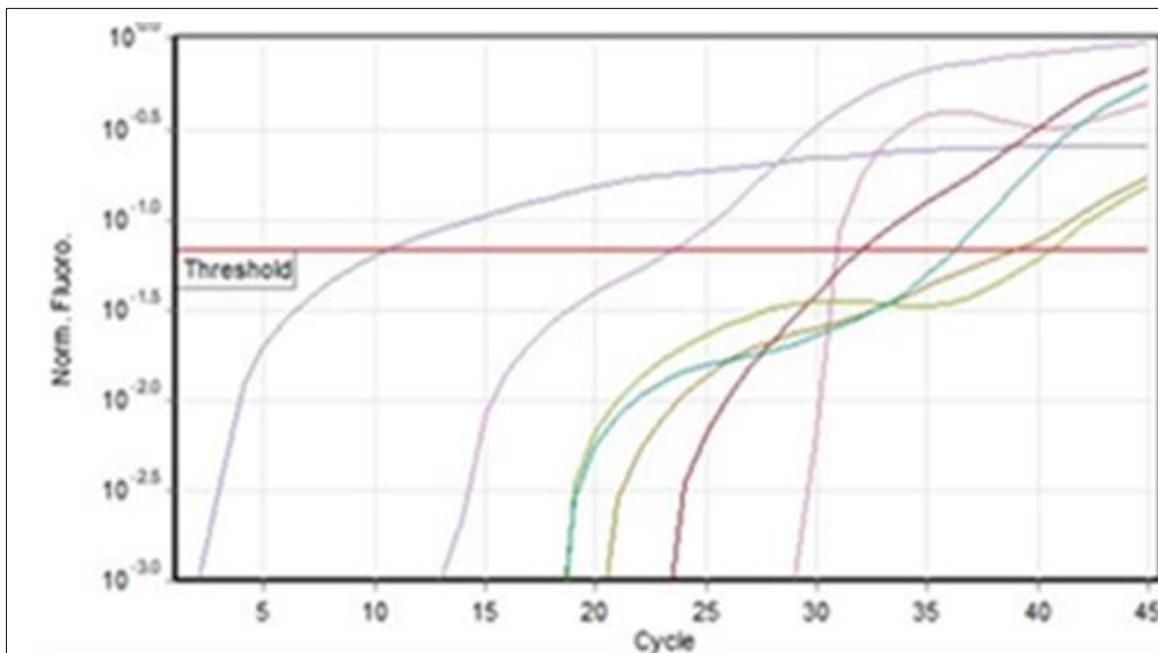


Figura N°11: Representación gráfica del Ct para *L. (V.) braziliensis* con el marcador cytB

Tabla N° 16: Diluciones de <i>L. (V.) braziliensis</i> para cyt b				
Concentración de ADN	N° de parásitos	Ct	Especie	%
41.00 ng/ μ L	49×10^4 parásitos	10.55	Variación	-
4.1 ng/ μ L	49×10^3 parásitos	23.48	<i>L. (V.)peruviana</i>	99.12
0.41 ng/ μ L	49×10^2 parásitos	30.77	<i>L. (V.)lainsoni</i>	96.03
0.041 ng/ μ L	49×10^1 parásitos	31.96	<i>L. (V.)braziliensis</i>	98.55
0.0041 ng/ μ L	49×10^0 parásitos	39.02	Variación	-
0.00041ng/ μ L	5×10^0 parásitos	40.51	<i>L. (V.)peruviana</i>	74.28
0.000041 ng/ μ L	1×10^0 parásito	36.24	Variación	-

En el caso de *L. (L.) mexicana* no se identificó ninguna de las diluciones, aunque los valores del Ct aumentaron proporcionalmente a las diluciones como en el caso de *L. (V.) braziliensis* (Tabla 17)

Tabla N° 17: Diluciones de <i>L. (L.) mexicana</i> para cyt b				
Concentración de ADN	N° de parásitos	Ct	Especie	%
16.15 ng/ µL	19 x 10 ⁴ parásitos	26.17	Variación	-
1.615 ng/ µL	19 x 10 ³ parásitos	19.85	Variación	-
0.1615 ng/µL	19 x 10 ² parásitos	22.98	Variación	-
0.1615 ng/ µL	19 x 10 ¹ parásitos	26.24	Variación	-
0.01615 ng/ µL	19 x 10 ⁰ parásitos	30.24	Variación	-
0.001615ng/ µL	1 x 10 ⁰ parásitos	34.07	Variación	-

El comportamiento irregular durante el proceso de amplificación del PCR en tiempo real pudo ser causado por el tamaño de la región amplificada del cyt b, 480pb, ya que la longitud adecuada de los productos de PCR se encuentra entre 70-350pb, mientras que para un análisis de *Single Nucleotide Polymorphisms* (SNP) es recomendable secuencias más cortas de 70 a 150pb.

Por lo tanto, una alternativa es el uso del marcador en el Secuenciamiento. El gen del cyt b está conformado aproximadamente por 1077 a 1100 pares de bases, de los cuales se requiere una extensión aproximada de 500 pares de bases para la identificación de todas las especies de *Leishmania* del Viejo y Nuevo Mundo, menor cantidad identificaría un número reducido de especies. Por lo tanto, investigaciones previas realizaron el secuenciamiento de regiones de 872pb y 510pb a partir de muestras directas de sangre, aspirados de médula y biopsias con alta carga parasitaria identificando eficientemente especies de *Leishmania spp* (Foulet, 2007; Gebhardt, 2015).

4.5. ANÁLISIS DE PCR- HIGH RESOLUTION MELTING (HRM) DE LAS MUESTRAS

El software del Rotor Gene evaluó la identificación de las especies para cada marcador, según los resultados el análisis fue centrado en el marcador de la región conservada del minicírculo, por el alto porcentaje de muestras identificadas (Anexo 1). En el caso del marcador ITS-1 el número de muestras identificadas fue 26 de las 243 evaluadas, procedentes todas ellas del grupo de clasificación IV (Tabla 18), mientras que para los marcadores hsp70 y cyt b la identificación no fue posible en su totalidad.

Especie	Porcentaje respecto al total
<i>L. (V.)guyanensis</i>	5.83%
<i>L. (V.)braziliensis</i>	2.91%
<i>L. (V.)panamensis</i>	9.71%
<i>L. (V.)lainsoni</i>	6.80%
ND	74.76%

El mínimo número de láminas identificadas por el marcador ribosomal ITS-1 y la nula identificación para los marcadores hsp70 y cyt b se atribuye a 3 aspectos fundamentales, el número de copias de los marcadores moleculares a comparación de las aproximadamente 10 000 copias de la región conservada del minicírculo, la longitud del amplificado que excede la recomendación en el diseño del ensayo para el HRM y la calidad del ADN.

El ADN procedente de las láminas probablemente contenía residuos del colorante Giemsa, aceite de inmersión y tejido del paciente, los que pueden generar problemas en la detección e identificación por interferencia o inhibición en la amplificación por PCR en tiempo real a diferencia del PCR convencional, cuya robustez es mayor como se evidencia en estudios previos donde se identificó especies de *Leishmania spp* en el Viejo Mundo a partir de láminas.

Kheirandish et al., evaluó la región intergénica ribosomal ITS-1 en 178 láminas identificando las especies de *L. (L.) tropica* y *L. (L.) major* comprobándose la efectividad de la técnica para la identificación en áreas endémicas, posteriormente el mismo marcador fue evaluado mediante las técnicas de PCR-RFLP y Nested PCR con el posterior

Secuenciamiento en 48 y 22 láminas confirmadas de leishmaniasis respectivamente, identificando las especies *L. (L.) major*, *L. (L.) infantum* y *L. (L.) tropica* (Kheirandish, 2013; Kazemi-Rad, 2008; Mohammed , 2010).

Identificación de la especie infectante usando el marcador de la región conservada del minicírculo.

El marcador identificó 226 de las 243 láminas evaluadas, el cual representa una sensibilidad en la identificación de la especie infectante de 93.00 por ciento. La región conservada de los minicírculos permitió identificar 97/103 láminas del Grupo IV, 40/44 láminas del grupo III, 81/87 láminas del Grupo II y 8/9 láminas pertenecientes al Grupo I (Tabla 19).

Tabla N° 19: Identificación de especies con el minicírculo por HRM					
Especie	Clasificación de láminas				% Porcentaje respecto al total
	Grupo IV	Grupo III	Grupo II	Grupo I	
Identificadas	97 (94.17%)	40 (90.91%)	81 (93.10%)	8 (88.89%)	93.00%
No Identificadas	6 (5.83%)	4 (9.09%)	6 (6.90%)	1 (11.11%)	7.00%
Total	103	44	87	9	243

Por lo tanto, se evaluó el efecto del grado de parasitemia de la muestra con la identificación de las especies, determinándose que estadísticamente no existe relación significativa entre las variables (p-valor: 0.08493) a diferencia de los resultados de Khademvatan S et al., que implican la disminución de la sensibilidad en láminas con baja carga parasitaria (Khademvatan, 2011), los resultados discordantes se atribuyen al escaso número de muestras del grupo I.

Las láminas coloreadas con Giemsa fueron almacenadas en el Laboratorio Referencial de Leishmaniasis procedentes de los años 2010 al 2013, investigaciones previas también utilizaron láminas almacenadas para realizar el diagnóstico de la enfermedad con la técnica molecular de PCR convencional , Motazedian et al., en el 2002 analizó el PCR de la región del kinetoplasto en 92 láminas con 4 años de antigüedad concluyendo que es una técnica adecuada para casos complejos como son las lesiones crónicas (Motazedian , 2002) ,así

mismo Lima, R et al., en el 2007 evaluó 91 láminas con el mismo marcador para aspirados de la medula espinal almacenadas por 4 años , determinó la sensibilidad y especificidad del PCR 92.3 por ciento y 97.5 por ciento respectivamente , permitiendo el diagnóstico retrospectivo de leishmaniasis visceral en láminas almacenadas (Lima, 2007) .

Para evidenciar si el tiempo de antigüedad de las láminas almacenadas afecta la identificación especies por HRM se realizó el análisis de contingencia, determinándose que estadísticamente si existe relación significativa (p-valor: 0.0002) (Tabla. 20), a diferencia de previas investigaciones donde no se evidencio diferencias significativas en el tiempo de almacenamiento (Kazemi-Rad, 2107; Mohammed, 2010). Por lo tanto las láminas con menor tiempo de almacenamiento tienen mayor probabilidad en la identificación de la especie infectante.

Especie	Año de antigüedad de las láminas almacenadas				% Porcentaje respecto al total
	2010	2011	2012	2013	
Identificadas	22 (75.86%)	48 (88.89%)	95 (96.94%)	61 (98.39%)	93.00%
No Identificadas	7 (24.14)	6 (11.11%)	3 (3.06%)	1 (1.61%)	7.00%
Total	29	54	98	62	243

4.6. DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA

El análisis por HRM de la región conservada del minicirculo permitió la identificación de las especies circulantes en los 8 departamentos a partir de las láminas coloradas con Giemsa enviadas al Laboratorio de Referencia Nacional de Leishmaniasis (LRNL) en marco del Control de Calidad. Las especies identificadas por la técnica de HRM fueron *L (V.) lainsoni* (36.6 por ciento), *L (V.) guyanensis* (22.3 por ciento), *L (V.) braziliensis* (17.36 por ciento), *L (V.) peruviana* (8.26 por ciento), *L. (V.) panamensis* (7.9 por ciento) y *L (L.) amazonensis* (0.83 por ciento).

Especie	Departamentos de procedencia							
	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8
<i>L. (L.) amazonensis</i>	1	-	-	-	-	-	-	2
<i>L. (V.) panamensis</i>	5	1	-	1	-	11	-	-
<i>L. (V.) guyanensis</i>	19	4	-	6	1	20	3	1
<i>L. (V.) braziliensis</i>	3	2	-	1	-	34	2	-
<i>L. (V.) peruviana</i>	8	-	-	2	1	8	-	1
<i>L. (V.) lainsoni</i>	31	4	2	10	-	40	1	1

Dónde:

P1: Amazonas

P2: Ancash

P3: Ayacucho

P4: Cajamarca

P5: Junín

P6: La Libertad

P7: Lima

P8: San Martín

Las especies se encuentran distribuidas en las regiones andinas y amazónicas del país, en este estudio se encontró a *L. (V.) lainsoni* en láminas procedentes de las regiones de Amazonas, San Martín, Ancash, Ayacucho, Cajamarca, la Libertad y Lima. *L. (V.) guyanensis* en las regiones de Amazonas, San Martín, Ancash, Cajamarca, Junín, La Libertad y Lima. *L. (V.) braziliensis* en Amazonas, Ancash, Cajamarca, La Libertad y Lima. *L. (V.) peruviana* en Amazonas, San Martín, Cajamarca, Junín y La Libertad. , *L. (V.) panamensis* en Amazonas, Ancash, Cajamarca, La Libertad y *L. (L.) amazonensis* en Amazonas y San Martín, resultados que se grafican en el mapa del Perú donde cada especie está representada con una figura geométrica en cada departamento de muestreo (Fig. 12).

La amplia distribución coincide con las investigaciones previas de la distribución geográfica de las especies en el Perú basadas en técnicas como el gold estándar MLEE, análisis de Secuenciamiento del cyt b y el PCR-RFLP del gen MPI (Lucas, 1998; Kato, 2010). Investigaciones previas reportaron la presencia de *Leishmania (Viannia) guyanensis* en la región de la Libertad en vectores, evidenciando el fenómeno de dispersión de esta especie, al igual que *Leishmania (Viannia) braziliensis*.

Se observó el fenómeno de la dispersión a regiones de la Sierra central y Norte de *Leishmania (Viannia) peruviana*, especie considerada endémica para la zona costa centro y

norte del país, del mismo modo, *Leishmania (Viannia) lainsoni*. Se evidenció el incremento de la presencia de *Leishmania (Viannia) panamensis*, especie que hasta la fecha había sido esporádica y sólo en las regiones de Cusco (Urbano, 2011).

Por otro lado, no se evidenció la dispersión de *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, en el presente estudio esta especie fue encontrada en Amazonas y San Martín, áreas que junto con las regiones del VRAEM han reportado su circulación.

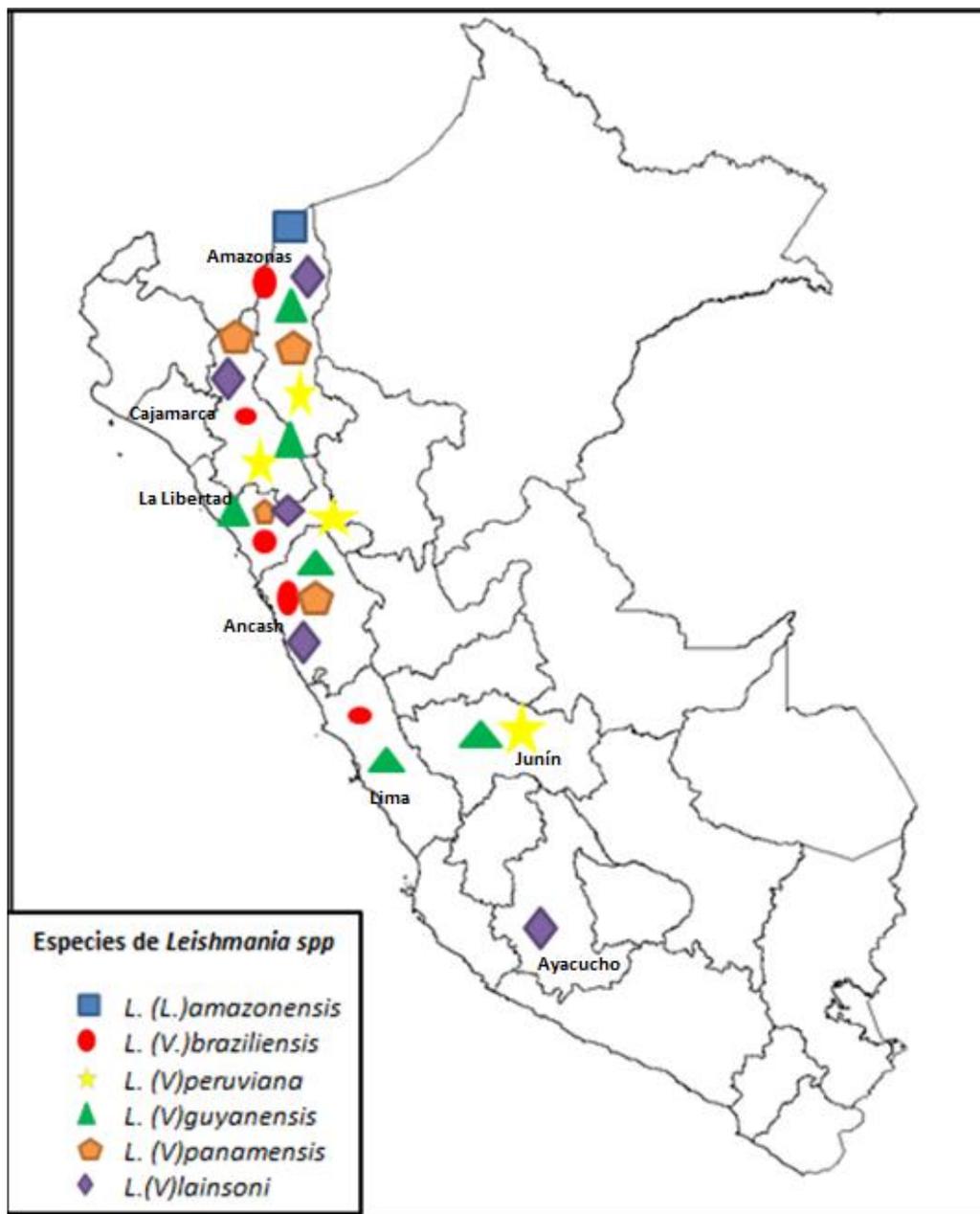


Figura N° 12. Distribución geográfica de especies de *Leishmania* spp. en 8 departamentos del Perú

V. CONCLUSIONES

- La identificación de especies de *Leishmania spp* por PCR-HRM de muestras procedentes de láminas almacenadas es aplicable utilizando marcadores con alta sensibilidad como la región conservada del minicírculo que posee más de 10 000 copias /parásito.
- El marcador de la región conservada del minicírculo identifica eficientemente especies que pertenecen a diferentes complejos. Sin embargo, dentro del mismo complejo la diversidad del marcador puede generar el solapamiento de las temperaturas melting durante el PCR en tiempo real, lo que conduce a un error en la identificación de las especies.
- El límite de detección e identificación es dependiente del número de copias del marcador empleado, en el presente estudio se detectaron concentraciones de ADN equivalentes a 1 parásito para la región conservada del minicírculo en especies representativas del Subgénero *Viannia* y *Leishmania* con el aumento proporcional del valor Ct en las respectivas diluciones.
- La conservación y el tiempo de almacenamiento de las láminas coloreadas con Giemsa presenta una relación estadísticamente significativa con la eficiencia en la identificación de las especies de *Leishmania spp* por PCR-HRM.

- El uso de marcadores multicopia permite realizar un análisis retrospectivo de las especies circulantes en determinadas regiones a partir de láminas cuyo almacenamiento y transporte no requiere de altos costos o instalaciones especializadas.

VI. RECOMENDACIONES

- Desarrollar la identificación simultánea a partir de láminas coloreadas con Giemsa y los cultivos en medio bifásico agar sangre mediante el PCR-HRM y un método de identificación de especies de *Leishmania* estándar con la finalidad de evaluar el grado de correlación entre los resultados.
- Evaluar el grado de interferencia causada por colorantes u otros reactivos durante la amplificación del marcador de interés en la identificación de especies por PCR en tiempo real.
- Desarrollar la validación del qPCR con un mayor número de muestras confirmadas por visualización microscópica del parásito y con muestras negativas a la enfermedad.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alcolea, P. Alonso, A. Gómez, M. ..., A. Moreno, M. González, E. Toraño, A. Parro, V. Larraga, V. 2010. Temperature increase prevails over acidification in gene expression modulation of amastigote differentiation in *Leishmania infantum*.
- Anders, G. Eisenberger, C. Jonas, F. Greenblatt, Ch. 2002. Distinguishing *Leishmania tropica* and *Leishmania major* in the Middle East using the polymerase chain reaction with kinetoplast DNA-specific primers. Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. 96
- Alvar, J. Velez, I. Bern, C. Herrero, M. Desjeux, P. Cano. J. Jannin, J. den Boer, M. 2012. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. PLoS ONE. 7(5): e35671
- Alves, L. dos Santos, C. Cardoso, 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. Infection, Genetics and Evolution. 10: 77–83.

- Arana, M. Evans, D. Zolessi, A. Llanos, A. Arévalo, J.1990. Biochemical characterization of *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Viannia) peruviana* by isoenzyme electrophoresis .Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene (1990) 84, 526-529.
- Aransay, Ana M. Scoulica, Efstathia Tselentis, Yannis. 2000. Detection and identification of Leishmania DNA within naturally infected sand flies by seminested PCR on minicircle kinetoplastic DNA. Applied and Environmental Microbiology. 66 (5): 1933-1938
- Bensoussan, E. Nasereddin, A. Jonas, F. Schnur, L. Jaffe, Ch .2006. Comparison of PCR assays for diagnosis of cutaneous leishmaniasis. Journal of Clinical Microbiology .44(4): 1435–1439
- Berzunza, M. Bricaire, G. Salaiza, N. Pérez, R. Becker, I. 2009. PCR for identification of species causing american cutaneous leishmaniasis. Parasitol Res .104:691–699
- Brustoloni, Y. Lima, R. da Cunha, R. Dorval, M. Oshiro, E. Lyrio, A. Pirmez, C. 2007. Sensitivity and specificity of polymerase chain reaction in giemsa stained slides for diagnosis of visceral leishmaniasis in children. 102(2): 497-500.
- Castaño, L. Bilbao, J. 1997. Introducción a la biología molecular y aplicación a la pediatría: Estudio de mutaciones en ADN amplificado por PCR. *An Esp Pediatr.* 46 (3):305-310.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). 2013.Parasites – Leishmaniasis. Disponible en <http://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/biology.html>

- Ceccarelli, M. Luca Galluzzi, L. Migliazzo, A. Magnani, M. 2014. Detection and Characterization of *Leishmania* (*Leishmania*) and *Leishmania* (*Viannia*) by SYBR Green-Based Real-Time PCR and High Resolution Melt Analysis Targeting Kinetoplast Minicircle DNA. PLoS ONE. 9(2).
- Chaouch, M. Fathallah, A. Driss, M. Lahmadi, R. Ayari, C. Guizani, I. Ben, M. Abderrazak, S. 2012. Identification of Tunisian *Leishmania* spp. by PCR amplification of cysteine proteinase B (cpb) genes and phylogenetic analysis. Acta Tropica 125 (2013): 357–365
- Cuba, C. 2000. Diagnostico parasitológico de la leishmaniasis tegumentaria americana. Revista Médica Experimental .17 : 1-4
- Dawit, G. Girma, Z. Simenew, K. 2012. A Review on biology, epidemiology and public health significance of leishmaniasis. Acta Parasitológica Globalis. 3 (3): 43-53.
- De Almeida, M. Steurer, F. Koru, O. Herwaldt, B. Pieniazek, N. Da Silva, A. 2011. Identification of *Leishmania* spp. by molecular amplification and DNA sequencing analysis of a fragment of rRNA Internal Transcribed Spacer 2. Journal of clinical Microbiology: 3143–3149.
- De Oliveira, J. Ribeiro, S. Silveira, H. De Aguiar, L. Camara, R. Gama, P. Moura, A. Amato, V. Das Gracias. M. De Lima, L. 2011. Mucosal Leishmaniasis caused by *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* and *Leishmania* (*Viannia*) *guyanensis* in the Brazilian Amazon. PLoS Negl Trop Dis. 5(3): e98
- Foulet, F. Botterel, F. Buffet, P. Morizot, G. Rivollet, D. Deniau, M. Pratlong, F. Costa, J. Bretagne, S. 2007. Detection and identification of *Leishmania* species

from clinical specimens by using a Real-Time PCR assay and sequencing of the Cytochrome *B* gene. *Journal of Clinical Microbiology*.45 (7) : 2110–2115 .

- Fraga, J. Veland, N. Montalvo, A. Praet, N. Boggild, A. Valencia, M. Arévalo, J. Llanos, A. Dujardin, J. Van der Auwera, G.2012. Accurate and rapid species typing from cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis lesions of the New World. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 74: 142–150.
- Fraga, J. Montalvo, A. De Doncker, S. Dujardin, J. Van der Auwera, G.2010. Phylogeny of *Leishmania* species based on the heat-shock protein 70 gene. *Infection, Genetics and Evolution* 10: 238–245.
- Garcia, L. Kindt, A. Bermúdez, H. Llanos, A. De Doncker, S. Arévalo, J. Quispe, K. Dujardin, J. 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.
- Gramiccia, M. Gradoni, L. 2005. The current status of zoonotic leishmaniases and approaches to disease control. *International Journal for Parasitology*. 35: 1169–1180
- Gebhardt, M. Ertas, B. Falk, T M. Blödorn-Schlicht, N. Metze, D. Böer-Auer, A. 2015. Fast, sensitive, and specific diagnosis of infections with *Leishmania* species by Cytochrome b PCR in formalin-fixed, paraffin-embedded skin biopsies. *The British journal of dermatology*.173: 1-11.
- Hernández, C. Alvarez, C. González, C. Ayala, M. León, C. Ramírez, J. 2014. Identification of six new world leishmania species through the implementation of a High-Resolution Melting (HRM) genotyping assay. *Parasites & Vectors*. 7: 501

- Kato, H. Caceres, A. Mimori, T. Ishimaru, Y. Sayed, A. Fujita, M. Iwata, H. Uezato, H. Velez, L. Gomez, E. Hashiguchi, Y. 2010. Use of FTA cards for direct sampling of patients' lesions in the ecological study of cutaneous leishmaniasis. *Journal of Clinical Microbiology*. 48 (10): 3661–3665.
- Khademvatan, S. Neisi, N. Maraghi, S. Saki, J. 2011. Diagnosis and identification of *Leishmania* spp. from Giemsa-stained slides, by real-time PCR and melting curve analysis in south-west of Iran. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*. 105 (8) 559–565.
- Kheirandish, F. Chegeni, A. Kazemi, B. Mohebbi, M. Sarlak, A. Tarahi, Holakouee, K. Hajaran, H. 2013. Identification of *Leishmania* species using PCR assay on giemsa-stained slides prepared from cutaneous leishmaniasis patients. *Iranian Journal Parasitology*. 8 (3): 382-388.
- Khosravi, S. Hejazi, S. Hashemzadeh, M. Eslami, G. Yousofi, H. 2012. Molecular diagnosis of Old World leishmaniasis: Real-time PCR based on trypanothione peroxidase gene for the detection and identification of *Leishmania* spp. *J Vector Borne Dis* 49: 15–18.
- Lucas, C. Franke, E. Cachay, M. Tejada, A. Cruz, M. Kreutzer, R. Barker, D. McCann, Watts, D. 1998. Distribution and clinical description of leishmaniasis cases in Peru. *The Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 59(2): 312-317.
- Lucas, C. Franke, D. Cachay, M. Tejada, A. Carrizales, D. Kreutzer, R. 1994. *Leishmania (Viannia) lainsoni*: first isolation in Peru. *The Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 51(5): 533-537.

- Mauricio, Isabel L., Yeo, Matthew, Baghaei, Mehdi, Doto, Daniela, Pralong, Francine, Zemanova, Eva, Dedet, Jean Pierre, Lukes, Julius, Miles, Michael A. 2006. Towards multilocus sequence typing of the *Leishmania donovani* complex: Resolving genotypes and haplotypes for five polymorphic metabolic enzymes (ASAT, GPI, NH1, NH2, PGD). *International Journal for Parasitology*. 36: 757-769.
- Mahboudi, F. Abolhassani, M. Yaran M. Mobtaker, H. Azizi M. 200|. Identification and Differentiation of Iranian *Leishmania* Species by PCR Amplification of kDNA. *Scand J Infect. Dis*. 33: 596-598.
- Mcgwire, B. Satoskar, A. 2013. *Leishmaniasis: clinical syndromes and treatment*. *Q J Med*. 107:7–14
- Ministerio Nacional de Salud (MINSA). Dirección General de Epidemiología PE. 2013. Situación epidemiológica de la leishmaniosis en el Perú. *Boletín Epidemiológico* 23 (1):6-10.
- Mahdy, Mohammed A .K, Al-Mekhlafi, Hesham M., Al-Mekhlafi, Abdulsalam M., Lim, Yvonne a L., Shuaib, Naemah O M Bin, Azazy, Ahmed a.2010. Molecular characterization of *Leishmania* species isolated from cutaneous leishmaniasis in Yemen. *PLoS ONE*. 5(9):1-4
- Monroy, A. Nasereddin, A. Monteon, V. Guzmán, C. Jaffe. C. 2014. ITS1 PCR-RFLP Diagnosis and characterization of *Leishmania* in clinical samples and strains from cases of human cutaneous leishmaniasis in States of the Mexican Southeast.

- Montalvo, M. Fraga, J. Maes, I. Dujardin, C. Van der Auwera G.2012. Three new sensitive and specific heat-shock protein 70 PCRs for global *Leishmania* species identification. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 31:1453–1461.
- Motazedian, H. Karamian, M. Noyes, H. Ardehali, S. 2002. DNA extraction and amplification of *Leishmania* from archived, Giemsa-stained slides, for the diagnosis of cutaneous leishmaniasis by PCR. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology* 96 (1): 31–34.
- Nicola, L. Milon, G. Prina, E .2002. Rapid differentiation of Old World *Leishmania* species by LightCycler polymerase chain reaction and melting curve analysis. *Journal of Microbiological Methods.* 51 : 295–299.
- Osorio, L. Castillo, C. Ochoa, M .1998. Mucosal Leishmaniasis due to *Leishmania (Viannia) Panamensis* in Colombia: Clinical Characteristics. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 59(1): 49–52
- OPS/OMS (Organización Panamericana de la Salud/Organización Mundial de la Salud) 2018. Informe Epidemiológico de las Américas. Disponible en <https://www.paho.org/hq/>
- OMS (Organización Mundial de la Salud).2014. Leishmaniasis. Nota descriptiva N°375. Disponible en <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/es/>.
- Ramirez, J. R. Agudelo, S. Muskus, C. Alzate, J. F. Berberich, C. Barker, D. Velez, I. D. 2000. Diagnosis of cutaneous leishmaniasis in Colombia: The sampling site within lesions influences the sensitivity of parasitologic diagnosis. *Journal of Clinical Microbiology.* 38: 3768-3773.

- Rapela, A. Silva, W. Roselino, A. 2008. DNA Sequencing confirms the involvement of *Leishmania (L.) amazonensis* in American tegumentary leishmaniasis in the state of São Paulo, Brazil. CLINICS. 64:451-6.
- Ready, P. 2013. Biology of *Phlebotomine* sand flies as vectors of disease agents. Annu. Rev. Entomol. 58:227–50.
- Romero, G. Arama, M. Lopez, M. Montoya, I. Bohl, R. Campos, M. Arevalo, J. Llanos, A. 1987. Characterization of *Leishmania* species from Peru. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. 81: 14-24.
- Salotra, P. Sheenivas, G. Pogue, G. Lee, N. Nakhasi, H. Ramesh, V. Negi, N. 2001. Development of a Species-Specific PCR Assay for Detection of *Leishmania donovani* in Clinical Samples from Patients with Kala-Azar and Post-Kala-Azar Dermal Leishmaniasis. Journal of Clinical Microbiology. 39 (3): 849-854
- Stanley, T. Wilson, I. 2003. Multilocus Enzyme Electrophoresis - A Practical Guide. Molecular Biotechnology. 24 (2): 203-220.
- Szargiki, R. Alcântara, E. Luz, E. Kowalthuk, W. Machado, A. Thomaz, V. 2009. Comparison of serological and parasitological methods for cutaneous leishmaniasis diagnosis in the State of Paraná, Brazil. The Brazilian Journal of Infectious Diseases. 13(1): 47-52.
- Talmi, D. Nasereddin, A. Schnur, L. Schonian, G. Ozensoy, Jaffe, Ch, Baneth, G. 2010. Detection and Identification of Old World *Leishmania* by High Resolution Melt Analysis. PLoS Negl Trop Dis . 4(1): 581.

- Tsukayama, P. Lucas, C. Bacon, D. 2009. Typing of four genetic loci discriminates among closely related species of New World Leishmania. *International Journal for Parasitology*. 39: 355–362.
- Tsukayama., P. Nuñez, J. De Los Santos, M. Soberon, V. Lucas, C. Matlashewski, G. Llanos, A. Ore, M. Baldeviano, C. Edgel, K. Lescano, A, Graf, P. Bacon, D. 2013. A Real-Time ITS1-PCR based method in the diagnosis and species identification of leishmania parasite from human and dog clinical samples in Turkey. *PLOS Neglected Tropical Diseases* 7 (1).
- Tsukayama, P. Nuñez, J. De Los Santos, M. Soberon, V. Lucas, C. Matlashewski, G. Llanos, A. Ore, M. Baldeviano, G. Edgel, K. Lescano, A. Graf, P. Bacon, D. 2013. A FRET-Based Real-Time PCR Assay to Identify the Main Causal Agents of New World Tegumentary Leishmaniasis. *PLoS Negl Trop Dis* 7(1): e1956.
- Tuon, F. Bombonato, G. Battaglin, E. Sakumoto, M. Amato, V. de Camargo, R. Nicodemo, A. 2014. Reactivation of mucosal and cutaneous leishmaniasis in a renal transplanted patient. *The Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 91(1):81-3.
- Urbano, Jesús. Minaya-Gómez, Gloria Sonia. Sanchez-Moreno, Manuel. Gutiérrez-ánchez, Ramón. Marín, Clotilde. 2011. Molecular characterization and geographical distribution of leishmaniasis aethiological agents in Peru. *Rev. Ibero-Latinoam. Parasitol.* 70 (2): 145-156
- Valencia, B. Veland, N., Alba, M. Adai, V. Arevalo, J. Donald E. Low, D. Llanos-Cuentas, A. Boggild, A. Non-Invasive Cytology Brush PCR for the

Diagnosis and Causative Species Identification of American Cutaneous Leishmaniasis in Peru. PLoS ONE 7(11): e49738

- Victoir, K. De Doncker, S. Cabrera, L. Alvarez, E. Arevalo, J. Llanos-Cuentas, A. Le Ray, D. Dujardin, J.C. 2003. Direct identification of *Leishmania* species in biopsies from patients with American tegumentary leishmaniasis. *The Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 97(1): 80-7.
- Volpini, A. Passos, V. Correa, G. Romanha, A. 2004. PCR-RFLP to identify *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *L. (Leishmania) amazonensis* causing American cutaneous leishmaniasis. *Acta Tropica* 90: 31–37.
- Weiole, K. Valderrama, L. Arias, A. Santrich, C. Saravia, N. 1991. Leishmanin skin test standardization and evaluation of safety, dose, storage, longevity of reaction and sensitization. *The Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 44(3): 90-197.
- Zampieri, Ricardo Andrade, Laranjeira-Silva, Maria Fernanda, Muxel, Sandra Marcia, Stocco de Lima, Ana Carolina, Shaw, Jeffrey Jon, Floeter-Winter, Lucile Maria. 2016. High Resolution Melting Analysis Targeting hsp70 as a Fast and Efficient Method for the Discrimination of *Leishmania* Species. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 10(29):1-8
- Zhang, W. Miranda, C., Arévalo, J. Ndao, M. Ward, B. Llanos, A. Matlashewski, G. 2006. Development of a genetic assay to distinguish between *Leishmania viannia* species on the basis of Isoenzyme differences.

VIII. ANEXOS

ANEXO 1: Tablas de identificación de especies para los cuatro marcadores moleculares por la técnica de PCR-HRM y la concentración de ADN de las muestras.

Tabla1. Identificación de las especies de Leishmania spp en láminas de ++++						
Muestra	Concentración del ADN		Marcador Molecular			
	ADN total	ADN parasitario				
N°	Lectora EON	qPCR	MINICIRCULO	ITS-1	HSP70	cytb
1	5.53ng/ul	1.18E-03	L.lainsoni	/	/	/
2	9.24ng/ul	1.61E-03	L.peruviana	L.(V.)braziliensis	/	/
3	7.27ng/ul	1.23E-03	L.braziliensis	/	/	/
4	2.30ng/ul	1.29E-03	L.peruviana	/	/	/
5	0.66ng/ul	4.19E-03	L.guyanensis	L.(V.)lainsoni	/	/
6	8.60ng/ul	3.10E-03	L.peruviana	L.(V.)braziliensis	/	/
7	4.24ng/ul	8.60E-03	L.guyanensis	/	/	/
8	2.13ng/ul	2.92E-03	L.guyanensis	/	/	/
9	2.25ng/ul	3.94E-02	L.lainsoni	/	/	/
10	6.70ng/ul	2.92E-02	L.lainsoni	/	/	/
11	10.29ng/ul	1.37E-02	L.lainsoni	/	/	/
12	6.28ng/ul	9.58E-03	L.lainsoni	/	/	/
13	11.81ng/ul	1.98E-03	L.guyanensis	/	/	/
14	6.59ng/ul	1.66E-02	L.lainsoni	/	/	/
15	3.80ng/ul	8.18E-03	L.lainsoni	/	/	/
16	3.45ng/ul	6.41E-03	L.lainsoni	/	/	/
17	3.18ng/ul	8.72E-03	L.braziliensis	L.(V.)lainsoni	/	/
18	2.87ng/ul	2.79E-03	L.panamensis	L.(V.)braziliensis	/	/

Continuación...

Muestra	Concentración del ADN		Marcador Molecular			
	ADN total	ADN parasitario	MINICIRCULO	ITS-1	HSP70	cytb
N°	Lectora EON	qPCR				
20	8.27ng/ul	7.04E-03	/	/	/	/
21	9.20ng/ul	2.33E-02	L.lainsoni	/	/	/
22	9.69ng/ul	1.58E-03	L.lainsoni	/	/	/
23	4.13ng/ul	9.97E-03	L.guyanensis	/	/	/
24	12.59ng/ul	4.46E-02	L.peruviana	/	/	/
25	2.09ng/ul	2.00E-03	L.peruviana	/	/	/
26	4.00ng/ul	1.66E-03	L.peruviana	/	/	/
27	1.31ng/ul	1.64E-03	L.guyanensis	/	/	/
28	1.60ng/ul	3.64E-03	L.peruviana	/	/	/
29	3.65ng/ul	8.19E-03	L.lainsoni	/	/	/
30	1.73ng/ul	6.03E-03	L.peruviana	/	/	/
31	1.64ng/ul	6.83E-03	L.guyanensis	/	/	/
32	2.87ng/ul	9.57E-03	L.peruviana	/	/	/
33	10.36ng/ul	2.60E-02	L.lainsoni	/	/	/
34	10.54ng/ul	2.60E-02	L.guyanensis	/	/	/
35	5.40ng/ul	9.70E-03	L.guyanensis	/	/	/
36	9.61ng/ul	9.31E-04	/	/	/	/
37	1.83ng/ul	6.46E-03	L.guyanensis	/	/	/
38	3.45ng/ul	9.31E-03	L.lainsoni	/	/	/
39	5.22ng/ul	5.92E-04	L.lainsoni	/	/	/
40	3.58ng/ul	3.08E-03	L.lainsoni	/	/	/
41	3.58ng/ul	3.08E-03	/			
42	5.80ng/ul	1.30E-03	L.lainsoni	/	/	/
43	9.95ng/ul	3.60E-03	L.lainsoni	/	/	/
44	6.38ng/ul	1.18E-03	L.lainsoni	/	/	/
45	4.92ng/ul	5.45E-03	L.peruviana	L.(V.)panamensis	/	/
46	11.46ng/ul	4.89E-03	L.braziliensis	/	/	/
47	4.67ng/ul	5.75E-03	/	/	/	/
48	7.70ng/ul	5.07E-03	L.panamensis	/	/	/
49	5.43ng/ul	2.20E-03	L.guyanensis	L.(V.)panamensis	/	/
50	9.68ng/ul	1.13E-02	L.braziliensis	L.(V.)guyanensis	/	/

Continuación...

Muestra	Concentración del ADN		Marcador Molecular			
	ADN total	ADN parasitario	MINICIRCULO	ITS-1	HSP70	cytb
N°	Lectora EON	qPCR				
51	6.20ng/ul	8.94E-02	L.panamensis	/	/	/
52	10.31ng/ul	2.97E-03	L.braziliensis	L.(V.)guyanensis	/	/
53	4.71ng/ul	9.11E-03	L.guyanensis	L.(V.)panamensis	/	/
54	4.57ng/ul	4.92E-03	L.braziliensis	/	/	/
55	9.29ng/ul	1.40E-03	L.panamensis	/	/	/
56	5.73ng/ul	3.86E-03	L.braziliensis	/	/	/
57	4.98ng/ul	6.99E-03	L.guyanensis	L.(V.)panamensis	/	/
58	5.45ng/ul	2.56E-03	L.braziliensis	L.(V.)guyanensis	/	/
59	6.25ng/ul	1.00E-03	L.panamensis	L.(V.)panamensis	/	/
60	7.72ng/ul	2.32E-03	L.braziliensis	L.(V.)guyanensis	/	/
61	4.36ng/ul	3.17E-03	L.peruviana	/	/	/
62	8.33ng/ul	1.47E-01	L.guyanensis	L.(V.)panamensis	/	/
63	9.84ng/ul	1.46E-03	L.braziliensis	L.(V.)panamensis	/	/
64	5.63ng/ul	1.30E-03	L.braziliensis	L.(V.)panamensis	/	/
65	5.89ng/ul	2.79E-03	L.guyanensis	L.(V.)panamensis	/	/
66	4.14ng/ul	1.37E-03	L.guyanensis	/	/	/
67	6.10ng/ul	1.28E-03	L.lainsoni	/	/	/
68	6.67ng/ul	3.55E-02	/	/	/	/
69	6.13ng/ul	1.23E-02	L.guyanensis	/	/	/
70	23.30ng/ul	8.48E-02	L.panamensis	/	/	/
71	24.64ng/ul	1.47E-01	L.braziliensis	L.(V.)lainsoni	/	/
72	9.41ng/ul	5.31E-03	L.panamensis	L.(V.)guyanensis	/	/
73	10.11ng/ul	4.59E-02	L.panamensis	/	/	/
74	7.51ng/ul	3.75E-03	L.lainsoni	/	/	/
75	8.00ng/ul	5.42E-03	L.guyanensis	/	/	/
76	39.00ng/ul	1.37E-01	L.braziliensis	/	/	/
77	4.61ng/ul	2.87E-02	L.peruviana	L.(V.)guyanensis	/	/
78	12.96ng/ul	2.66E-02	L.guyanensis	/	/	/
79	8.81ng/ul	5.90E-03	L.guyanensis	/	/	/
80	12.26ng/ul	1.60E-03	L.panamensis	/	/	/
81	5.23ng/ul	4.93E-03	L.lainsoni	/	/	/

Continuación...

Muestra	Concentración del ADN		Marcador Molecular			
	ADN total	ADN parasitario	MINICIRCULO	ITS-1	HSP70	cytb
N°	Lectora EON	qPCR				
82	3.68ng/ul	4.50E-03	L.peruviana	L.(V.)panamensis	/	/
83	4.45ng/ul	3.85E-03	L.peruviana	/	/	/
84	4.73ng/ul	8.79E-03	L.panamensis	L.(V.)lainsoni	/	/
85	4.10ng/ul	1.69E-03	L.guyanensis	/	/	/
86	5.74ng/ul	4.86E-03	L.lainsoni	/	/	/
87	6.56ng/ul	4.10E-03	L.lainsoni	/	/	/
88	8.08ng/ul	7.79E-03	L.braziliensis	L.(V.)lainsoni	/	/
89	6.04ng/ul	1.23E-03	L.lainsoni	/	/	/
90	10.44ng/ul	9.48E-03	L.guyanensis	/	/	/
91	7.40ng/ul	1.79E-02	/	/	/	/
92	5.88ng/ul	1.41E-02	L.guyanensis	/	/	/
93	31.88ng/ul	4.67E-02	L.guyanensis	/	/	/
94	6.45ng/ul	1.08E-03	L.lainsoni	/	/	/
95	2.97ng/ul	1.61E-03	L.guyanensis	/	/	/
96	30.69ng/ul	6.80E-02	L.lainsoni	/	/	/
97	12.14ng/ul	7.44E-02	L.guyanensis	/	/	/
98	4.94ng/ul	1.22E-02	L.panamensis	/	/	/
99	6.65ng/ul	7.34E-03	L.lainsoni	L.(V.)lainsoni	/	/
100	7.97ng/ul	4.05E-03	L.guyanensis	/	/	/
101	24.41ng/ul	2.13E-02	L.lainsoni	/	/	/
102	7.86ng/ul	1.88E-02	L.lainsoni	/	/	/
103	3.86ng/ul	1.28E-02	L.guyanensis	/	/	/

Tabla2. Identificación de las especies de Leishmania spp en láminas de +++						
Muestra	Concentración del ADN		Marcador Molecular			
	ADN total	ADN parasitario	MINICIRCULO	ITS-1	HSP70	Cytb
N°	Lectora EON	qPCR (ng/μL)				
1	5.53ng/μL	1.03E-03	<i>L.(V.)lainsoni</i>	/	/	/
2	2.20ng/μL	6.83E-04	<i>L.(V.)guyanensis</i>	/	/	/
3	12.28ng/μL	2.73E-04	<i>L.(V.)lainsoni</i>	/	/	/
4	12.13ng/μL	7.23E-08	<i>L.(V.)lainsoni</i>	/	/	/
5	4.40ng/μL	4.41E-04	<i>L.(V.)lainsoni</i>	/	/	/
6	5.12ng/μL	2.70E-03	<i>L.(V.)lainsoni</i>	/	/	/
7	12.78ng/μL	1.60E-03	<i>L.(V.)lainsoni</i>	/	/	/
8	5.91ng/μL	0.013340166	<i>L.(V.)lainsoni</i>	/	/	/
9	10.23ng/μL	6.16E-03	<i>L.(V.)lainsoni</i>	/	/	/
10	5.68ng/μL	3.06E-03	<i>L.(V.)lainsoni</i>	/	/	/
11	4.39ng/μL	5.50E-03	<i>L.(V.)lainsoni</i>	/	/	/
12	15.51ng/μL	4.27E-04	/	/	/	/
13	8.7ng/μL	3.14E-03	<i>L.(V.)lainsoni</i>	/	/	/
14	8.67ng/μL	1.07E-03	<i>L.(V.)lainsoni</i>	/	/	/
15	2.89ng/μL	1.69E-04	<i>L.(V.)guyanensis</i>	/	/	/
16	5.38ng/μL	8.59E-04	<i>L.(V.)guyanensis</i>	/	/	/
17	4.76ng/μL	4.32E-03	<i>L.(V.)guyanensis</i>	/	/	/
18	12.84ng/μL	3.04E-03	<i>L.(V.)lainsoni</i>	/	/	/
19	7.62ng/μL	3.02E-03	<i>L.(V.)lainsoni</i>	/	/	/
20	5.65ng/μL	7.69E-03	<i>L.(V.)lainsoni</i>	/	/	/
21	11.56ng/μL	3.97E-03	<i>L.(V.)lainsoni</i>	/	/	/
22	17.19ng/μL	1.07E-03	/	/	/	/
23	7.55ng/μL	4.78E-03	<i>L.(V.)lainsoni</i>	/	/	/
24	11.04ng/μL	5.86E-04	<i>L.(V.)lainsoni</i>	/	/	/
25	32.69ng/μL	3.82E-03	<i>L.(V.)lainsoni</i>	/	/	/
26	7.47ng/μL	1.86E-03	<i>L.(V.)lainsoni</i>	/	/	/
27	3.66ng/μL	6.66E-05	<i>L.(V.)guyanensis</i>	/	/	/
28	7.31ng/μL	4.44E-04	<i>L.(V.)lainsoni</i>	/	/	/
29	7.96ng/μL	6.08E-03	<i>L.(V.)lainsoni</i>	/	/	/
30	6.08ng/μL	9.55E-04	<i>L.(V.)lainsoni</i>	/	/	/
31	4.27ng/μL	9.53E-04	<i>L.(V.)lainsoni</i>	/	/	/
32	12.51ng/μL	1.27E-03	<i>L.(V.)lainsoni</i>	/	/	/
33	9.20ng/μL	3.83E-03	<i>L.(V.)guyanensis</i>	/	/	/
34	9.21ng/μL	7.01E-03	<i>L.(V.)lainsoni</i>	/	/	/
35	4.98ng/μL	1.06E-03	<i>L.(V.)lainsoni</i>	/	/	/
36	2.41ng/μL	8.22E-04	<i>L.(V.)lainsoni</i>	/	/	/

Continuación...

Muestra	Concentración del ADN		Marcador Molecular			
	ADN total	ADN parasitario	MINICIRCULO	ITS-1	HSP70	CytB
N°	Lectora EON	qPCR (ng/μL)				
37	8.44ng/μL	2.88E-04	/	/	/	/
38	6.03ng/μL	1.29E-03	/	/	/	/
39	7.46ng/μL	3.59E-03	<i>L.(V.)lainsoni</i>	/	/	/
40	2.61ng/μL	8.64E-03	<i>L.(V.)peruviana</i>	/	/	/
41	3.59ng/μL	3.30E-03	<i>L.(V.)lainsoni</i>	/	/	/
42	0.20ng/μL	2.19E-03	<i>L.(V.)peruviana</i>	/	/	/
43	1.87ng/μL	1.31E-03	<i>L.(V.)lainsoni</i>	/	/	/

Tabla 3. Identificación de las especies de *Leishmania* spp en láminas de ++

Muestra	Concentración del ADN		Marcador Molecular			
	ADN total	ADN parasitario	MINICIRCULOS	ITS-1	hsp70	cytB
N°	Lectora EON	qPCR				
1	4.36ng/μL	4.41E-03	<i>L.(V.)lainsoni</i>	/	/	/
2	8.01ng/μL	6.66E-07	/	/	/	/
3	3.07ng/μL	1.18E-03	<i>L.(V.)braziliensis</i>	/	/	/
4	4.64ng/μL	8.18E-03	<i>L.(V.)braziliensis</i>	/	/	/
5	1.62ng/μL	4.45E-05	<i>L.(V.)guyanensis</i>	/	/	/
6	2.26ng/μL	4.18024E-05	<i>L.(V.)lainsoni</i>	/	/	/
7	0.30ng/μL	5.14E-04	<i>L.(V.)lainsoni</i>	/	/	/
8	1.73ng/μL	3.18E-03	<i>L.(V.)lainsoni</i>	/	/	/
9	1.73ng/μL	4.11E-04	<i>L.(V.)guyanensis</i>	/	/	/
10	19.31ng/μL	/	<i>L.(V.)guyanensis</i>	/	/	/
11	4.14ng/μL	7.29E-04	<i>L.(V.)lainsoni</i>	/	/	/
12	3.14ng/μL	6.41E-04	<i>L.(V.)guyanensis</i>	/	/	/
13	3.14ng/μL	4.32E-03	/	/	/	/
14	22.79ng/μL	0.031643983	<i>L.(V.)lainsoni</i>	/	/	/
15	1.40ng/μL	1.17E-04	/	/	/	/
16	1.30ng/μL	7.59E-05	<i>L.(V.)lainsoni</i>	/	/	/
17	0.61ng/μL	1.03E-03	<i>L.(V.)guyanensis</i>	/	/	/
18	0.91ng/μL	7.97E-08	/	/	/	/
19	4.25ng/μL	3.07E-03	<i>L.(V.)lainsoni</i>	/	/	/
20	8.54ng/μL	1.20E-03	<i>L.(V.)lainsoni</i>	/	/	/

Continuación...

Muestra	Concentración del ADN		Marcador Molecular			
	ADN total	ADN parasitario				
N°	Lectora EON	qPCR	MINICIRCULOS	ITS-1	hsp70	cytB
21	1.88ng/μL	2.13E-04	<i>L.(V.) guyanensis</i>	/	/	/
22	3.48ng/μL	1.78E-05	<i>L.(V.)lainsoni</i>	/	/	/
23	3.48ng/μL	1.66E-02	<i>L.(V.) guyanensis</i>	/	/	/
24	1.74ng/μL	8.89E-04	<i>L.(V.)lainsoni</i>	/	/	/
25	1.74ng/μL	6.48E-03	<i>L.(V.) guyanensis</i>	/	/	/
26	4.09ng/μL	2.15E-03	<i>L.(V.)lainsoni</i>	/	/	/
27	4.09ng/μL	2.66E-04	<i>L.(V.) guyanensis</i>	/	/	/
28	3.04ng/μL	1.66E-03	<i>L.(V.)lainsoni</i>	/	/	/
29	7.16ng/μL	8.91E-04	<i>L.(V.) guyanensis</i>	/	/	/
30	6.15ng/μL	3.88E-03	<i>L.(V.) guyanensis</i>	/	/	/
31	6.10ng/μL	8.68E-03	/	/	/	/
32	4.25ng/μL	4.05E-03	<i>L.(V.)lainsoni</i>	/	/	/
33	7.72ng/μL	5.95E-05	<i>L.(V.) guyanensis</i>	/	/	/
34	8.67ng/μL	1.47E-02	<i>L.(V.) guyanensis</i>	/	/	/
35	2.03ng/μL	3.93E-04	<i>L.(V.)braziliensis</i>	/	/	/
36	11.17ng/μL	5.83E-03	<i>L.(V.)lainsoni</i>	/	/	/
37	20.87ng/μL	7.36E-02	<i>L.(V.)lainsoni</i>	/	/	/
38	3.96ng/μL	1.99E-03	<i>L.(V.)panamensis</i>	/	/	/
39	3.38ng/μL	2.89E-04	<i>L.(V.)lainsoni</i>	/	/	/
40	3.65ng/μL	1.90E-03	<i>L.(V.)braziliensis</i>	/	/	/
41	4.38ng/μL	6.58E-03	/	/	/	/
42	1.72ng/μL	1.61E-04	<i>L.(V.)braziliensis</i>	/	/	/
43	4.47ng/μL	2.27E-03	<i>L.(V.)lainsoni</i>	/	/	/
44	2.36ng/μL	1.80E-03	<i>L.(V.)peruviana</i>	/	/	/
45	6.44ng/μL	6.06E-04	<i>L.(V.)peruviana</i>	/	/	/
46	5.63ng/μL	1.21E-03	<i>L.(V.) guyanensis</i>	/	/	/
47	4.08ng/μL	4.86E-03	<i>L.(V.)braziliensis</i>	/	/	/
48	5.25ng/μL	8.20E-04	<i>L.(V.)lainsoni</i>	/	/	/
49	2.14ng/μL	2.37E-03	<i>L.(V.)peruviana</i>	/	/	/
50	2.94ng/μL	5.20E-04	<i>L.(V.)braziliensis</i>	/	/	/
51	3.96ng/μL	3.54E-04	<i>L.(V.)braziliensis</i>	/	/	/

Continuación...

Muestra	Concentración del ADN		Marcador Molecular			
	ADN total	ADN parasitario	MINICIRCULOS	ITS-1	hsp70	cytB
N°	Lectora EON	qPCR				
52	3.43ng/μL	3.62E-03	L.(V.)braziliensis	/	/	/
53	2.51ng/μL	1.35E-04	L.(V.)panamensis	/	/	/
54	6.09ng/μL	1.40E-02	L.(V.)braziliensis	/	/	/
55	1.56ng/μL	8.45E-03	L.(V.)braziliensis	/	/	/
56	2.95ng/μL	3.61E-04	L.(V.)lainsoni	/	/	/
57	3.38ng/μL	2.44E-03	L.(V.)braziliensis	/	/	/
58	8.87ng/μL	5.04E-06	L.(V.)lainsoni	/	/	/
59	3.20ng/μL	4.21E-03	L.(V.) guyanensis	/	/	/
60	9.84ng/μL	2.19E-04	L.(V.)braziliensis	/	/	/
61	5.88ng/μL	3.17E-04	L.(V.)braziliensis	/	/	/
62	3.96ng/μL	2.05E-04	L.(V.)braziliensis	/	/	/
63	3.38ng/μL	9.92E-05	L.(V.)braziliensis	/	/	/
64	3.05ng/μL	4.60E-04	L.(V.)braziliensis	/	/	/
65	4.93ng/μL	1.09E-04	L.(V.)braziliensis	/	/	/
66	6.44ng/μL	2.96E-03	L.(V.)panamensis	/	/	/
67	6.40ng/μL	0.013948496	L.(V.)panamensis	/	/	/
68	4.10ng/μL	4.32E-03	L.(V.)lainsoni	/	/	/
69	3.50ng/μL	1.15E-03	L.(V.)peruviana	/	/	/
70	6.50ng/μL	2.05E-04	L.(V.)braziliensis	/	/	/
71	5.60ng/μL	4.45E-03	L.(V.)panamensis	/	/	/
72	3.15ng/μL	5.90E-05	L.(V.)braziliensis	/	/	/
73	5.08ng/μL	2.08E-03	L.(V.)braziliensis	/	/	/
74	3.93ng/μL	3.83E-03	L.(V.)panamensis	/	/	/
75	24.06ng/μL	3.58E-03	L.(V.) guyanensis	/	/	/
76	1.99ng/μL	1.61E-04	L.(V.)braziliensis	/	/	/
77	11.67ng/μL	2.86E-03	L.(V.)braziliensis	/	/	/
78	6.79ng/μL	1.01E-03	L.(V.)panamensis	/	/	/
79	5.74ng/μL	1.18E-04	L.(V.)braziliensis	/	/	/
80	1.99ng/μL	7.44E-06	L.(L.)amazonensis	/	/	/
81	13.41ng/μL	/	L.(V.) guyanensis	/	/	/
82	2.25ng/μL	4.37E-04	L.(V.)panamensis	/	/	/

Continuación...

Muestra	Concentración del ADN		Marcador Molecular			
	ADN total	ADN parasitario				
N°	Lectora EON	qPCR	MINICIRCULOS	ITS-1	hsp70	cytB
83	70.88ng/μL	4.39E-03	L.(V.)braziliensis	/	/	/
84	27.83ng/μL	0.022523552	L.(V.) guyanensis	/	/	/
85	1.78ng/μL	4.89E-04	L.(L.)amazonensis	/	/	/
86	1.9ng/μL	2.40E-05	L.(V.)braziliensis	/	/	/
87	17.59ng/μL	3.62E-03	L.(V.)braziliensis	/	/	/

Tabla 4. Identificación de las especies de Leishmania spp en láminas de +							
Muestra	Concentración del ADN		Marcador Molecular				
	ADN total	ADN parasitario					
N°	Lectora EON	qPCR	TEJIDO	MINICIRCULOS	ITS-1	hsp70	cytb
1	7.18ng/μl	5.21E-04	ABUNDANTE	L.lainsoni	/	/	/
2	2.18ng/μl	1.94E-04	ADECUADO	L.lainsoni	/	/	/
3	15.73ng/μl	3.35E-04	ABUNDANTE	L.lainsoni	/	/	/
4	7.06ng/μl	2.56E-04	ADECUADO	L.lainsoni	/	/	/
5	1.57ng/μl		ESCASO	/	/	/	/
6	1.77ng/μl	5.51E-05	ABUNDANTE	L.lainsoni	/	/	/
7	2.30ng/μl	9.37E-06	ESCASO	L.guyanensis	/	/	/
8	5.78ng/μl	1.42E-04	ABUNDANTE	L.guyanensis	/	/	/
9	0.86ng/μl	3.76E-05	ESCASO	L.lainsoni	/	/	/

Secuencia de la región del gen citocromo b de *Leishmania panamensis*

Leishmania panamensis kinetoplast pre-edited version of Cytb gene for cytochrome b
 Sequence ID: [AB095968.1](#) Length: 1078 Number of Matches: 1

Range 1: 62 to 984 [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1700 bits(920)	0.0	922/923(99%)	0/923(0%)	Plus/Plus
Query 3	TTTAGTTTAGGTTTTTTTATTGTATGCAAATAATATGTGGTgtttgttttagcatgacta			62
Sbjct 62	TTTAGTTTAGGTTTTTTTATTGTATGCAAATAATATGTGGTGTTTGTTTAGCATGACTA			121
Query 63	tttttagttgttttatttgtactaattgatattttgttttattttatgagattttgat			122
Sbjct 122	TTTTTAGTTGTTTTATTGTACTAATTGATATTTGTTTTATTTTATGAGATTTTGAT			181
Query 123	ttaggtttgtgataagaagtacacatatattgttttaCATCATTACTATTTTTCTTCTT			182
Sbjct 182	TTAGGTTTTGTGATAAGAAGTACACATATTTGTTTACATCATTACTATTTTTCTTCTT			241
Query 183	TATGTTTCATATATTTAAATGtatagttattaataatattttgatactcatattttagtt			242
Sbjct 242	TATGTTTCATATATTTAAATGTATAGTATTAATAATATTATTGATACTCATATTTAGTT			301
Query 243	tgaattataggtttttattttatatttatatttatagtaataataggtttttattggttatGTA			302
Sbjct 302	TGAATTATAGGTTTTATTATTATATATTTATAGTAATAATAGGTTTTATTGGTTATGTA			361
Query 303	CTGCCGTGTACAATGATGTCGTATTGAGGATTAACAGTTTTTAGTAATTTTTAGCTACT			362
Sbjct 362	CTGCCGTGTACAATGATGTCGTATTGAGGATTAACAGTTTTTAGTAATTTTTAGCTACT			421
Query 363	GTGCCAGTGATTGGTGTGGATTATGTTATTGAATTTGAGGAAGTGAATATATAAATGat			422
Sbjct 422	GTGCCAGTGATTGGTGTGGATTATGTTATTGAATTTGAGGAAGTGAATATATAAATGAT			481
Query 423	tttactttacttaaaattacatgttttacatgttttactacccttttattttattaataata			482
Sbjct 482	TTTACTTTACTTAAATTACATGTTTTACATGTTTTACTACCTTTTATTTTATAAATA			541
Query 483	atttttatgcattttattttgtttacattttttatgagttctgatggtttttgtgataga			542
Sbjct 542	ATTTTATGCATTTATTTGTTTACATTATTTATGAGTTCTGATGGTTTTGTGATAGA			601
Query 543	tttgcattttattgtgagcggattatgtttttgtatgtgattttatttaagagatatgttt			602
Sbjct 602	TTTGCATTTTATTGTGAGCGATTATGTTTTGTATGTGATTTTATTAAGAGATATGTTT			661
Query 603	ttagcgTTTTAAATATTATTTTGTAGTGTATTTATATTTATAAATTGATATTTGTT			662
Sbjct 662	TTAGCGTTTTAAATATTATTTTGTAGTGTATTTATATTTATAAATTGATATTTGTT			721
Query 663	tttCATGAGGAGTCATGAGTAATAGTAGACACATTAATAACTCTGATAAAATTTACCT			722
Sbjct 722	TTTATGAGGAGTCATGAGTAATAGTAGACACATTAATAACTCTGATAAAATTTACCT			781
Query 723	GAATGGTTTTTTTTTATTTTATTGGTTTTTAAAAGCAGTACCTGATAAatttactggt			782
Sbjct 782	GAATGGTTTTTTTTTATTTTATTGGTTTTTAAAAGCAGTACCTGATAAATTACTGGT			841
Query 783	ttattattaatggttatactattattttcattgtttttattttatattaaattgtatatta			842
Sbjct 842	TTATTATTAATGGTTATACTATTATTTTATTGTTTTTATTATATTAATTTGATATTA			901
Query 843	tgattttgtttattgtcgaagttcgttattatgatttacttattcattaattttattttat			902
Sbjct 902	TGATTTGTTTTATTGTCGAAGTTCGTTATTATGATTACTTATTCATTAATTTTATTTAT			961
Query 903	agtatatttatgagtgTTTTTTT 925			
Sbjct 962	AGTATATTTATGAGTGGTTTTTTT 984			

Secuencia de la región del gen citocromo b de *Leishmania guyanensis*

Leishmania guyanensis kinetoplast pre-edited version of Cytb gene for cytochrome b
 Sequence ID: [AB095969.1](#) Length: 1078 Number of Matches: 1

Range 1: 54 to 874 [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1491 bits(807)	0.0	814/821(99%)	0/821(0%)	Plus/Plus
Query 1	GTGTAGGTTTTAGTTAGGTTTTATATGTATGCAAATAATATGGTgtttgttttag	60		
Sbjct 54	GTGTAGGTTTTAGTTAGGTTTTATATGTATGCAAATAATATGGTGTTTGTTTAG	113		
Query 61	catgattatTTTTtagttgttttatttgtactaattgatattttgttttattttatgag	120		
Sbjct 114	CATGATTATTTTTAGTTGTTTTATTGTACTAATTGATTTTTGTTTTATTTTATGAG	173		
Query 121	atTTTgatttaggttttTgataagaagTAcacatattTgttttaCATCATTACTATTTT	180		
Sbjct 174	ATTTTGATTAGGTTTTGTGATAAGAAGTACACATATTGTTTTACATCATTACTATTTT	233		
Query 181	TTCTTCTGTATGTTcATATATTTAAATGtatagtattaataatattatttTgatactcata	240		
Sbjct 234	TTCTTCTGTATGTTcATATATTTAAATGTATAGTATTAATAATATTATTGATACTCATA	293		
Query 241	tttttagtttgaattataggatttattttatataatttatagtaataataggttttattg	300		
Sbjct 294	TTTTAGTTTGAATTATAGGATTTATTATTATATATTATAGTAATAATAGGTTTTATTG	353		
Query 301	gttatgtattGCCATGTACAATGATGTCGTATTGAGGATTAACAGTTTTTAGTAATATTC	360		
Sbjct 354	GTTATGTATTGCCATGTACAATGATGTCGTATTGAGGATTAACAGTTTTTAGTAATATTC	413		
Query 361	TAGCTACTGTGCCAGTATTGGTGTTTGAYTWTGTTATTGAATWTGAGGAAGTGAATATA	420		
Sbjct 414	TAGCTACTGTGCCAGTATTGGTGTTGACTATGTTATTGAATTTGAGGAAGTGAATATA	473		
Query 421	TAAATGatTTTactttactTaaattacatgttttacatgttttactacmTwtattttat	480		
Sbjct 474	TAAATGATTTTACTTTACTTAAATTACATGTTTTACATGTTTACTACCTTTTATTTTAT	533		
Query 481	taataataatTTTTatgcatttattttgtttacattattttatgagttctgatggTTTT	540		
Sbjct 534	TAATAATAATTTTTATGCATTTATTTGTTTACATTATTTATGAGTTCTGATGGTTTT	593		
Query 541	gtgatagatttGCATTTTATTGTGAGCGACtatgtttttgtatgtgattttatttaagag	600		
Sbjct 594	GTGATAGATTTGCATTTTATTGTGAGCGACTATGTTTTGTATGTGATTTTATTTAAGAG	653		
Query 601	atatgttttttagcatttttaataattattttttatagtgtattttatattataaaattgat	660		
Sbjct 654	ATATGTTTTTAGCATTTTTAATATTATTTTTATAGTGTATTTATATTATAAATTGAT	713		
Query 661	atTTTgtttttCATGAGGAGTCATGAGTAATAGTAGACACATTA AAAA ACTTCWGATAAAA	720		
Sbjct 714	ATTTTGTTTTCATGAGGAGTCATGAGTAATAGTAGACACATTA AAAA ACTTCGATAAAA	773		
Query 721	TTTTACCTGAATGGTTTTTTTTatttttatttggTTTTTTAAAAGCAGTACCTGATAAAT	780		
Sbjct 774	TTTTACCTGAATGGTTTTTTTTATTTTATTTGGTTTTTTAAAAGCAGTACCTGATAAAT	833		
Query 781	YTA CTGGTTTATTATTAATGGTTATACTATTATTTTCATTG 821			
Sbjct 834	TTACTGGTTTATTATTAATGGTTATACTATTATTTTCATTG 874			

Secuencia de la región del gen citocromo b de *Leishmania lainsoni*

Leishmania lainsoni kinetoplast cyt b gene for cytochrome b, partial cds, isolate: 13-8EC14
 Sequence ID: [LC055632.1](#) Length: 817 Number of Matches: 1

Range 1: 1 to 817 [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1489 bits(806)	0.0	815/819(99%)	2/819(0%)	Plus/Plus
Query 6	tttttttATTGATGCAAATAATATGGGTGTTGTTTAGCATGACTatTTTTTTtagtt	65		
Sbjct 1	TTTTTTTATTGATGCAAATAATATGGGTGTTGTTTAGCATGACTA-TTTTTAGTT	59		
Query 66	gctttatTTgtactaattgatattttgttttatttttatgagatTTtgatttaggttttg	125		
Sbjct 60	GTTTTATTGTAATAATTGATATTTGTTTTATTTTATGAGATTTTGATTAGGTTTTG	119		
Query 126	taattagaagtacacatatTTgttttaCATCattattatTTTTtcttctttatgttccata	185		
Sbjct 120	TAATTAGAAGTACACATATTTGTTTTACATCATTATTATTTTTCTTCTTATGTTTCATA	179		
Query 186	tatttaaatgtatagtattataataatattttgatactcatatTTtagtttgaattatag	245		
Sbjct 180	TATTTAAATGTATAGTATTAATAATATTATTTGATACTCATATTTAGTTTGAATTATAG	239		
Query 246	gttttattatttatatattttatagtagtaataggttttattggttatgtattGCCATGTA	305		
Sbjct 240	GTTTTATTATTTATATATTTATAGTAGTAATAGGTTTTATTGGTTATGTATTGCCATGTA	299		
Query 306	CAATGATGTCATATTGAGGATTAACAGTTTTAGTAATATTTAGCTACTGTACCAGTTA	365		
Sbjct 300	CAATGATGTCATATTGAGGATTAACAGTTTTAGTAATATTTAGCTACTGTACCAGTTA	359		
Query 366	TTGGTGTGACTATGTTATTGAATTTGAGGAAGTGAATATATAAATGatttcactttac	425		
Sbjct 360	TTGGTGTGACTATGTTATTGAATTTGAGGAAGTGAATATATAAATGATTTCACTTAC	419		
Query 426	ttaaattacatgttttacatgttttattaccttttattttattaataataatTTTTatgc	485		
Sbjct 420	TTAAATACATGTTTACATGTTTATTACCTTTTATTTATTAATAATAATTTTATGC	479		
Query 486	atTTatTTTgcttacattatTTtatGAGTTCTGATGGTTTTgtgatagatttgcatttt	545		
Sbjct 480	ATTTATTTTGCTTACATTATTTATGAGTTCTGATGGTTTTGTGATAGATTGCAATTT	539		
Query 546	attgcgagcgtttatgtttttgtatgtattttatTTaagagatatgttttagcatttt	605		
Sbjct 540	ATTGCGAGCGTTTATGTTTTGTATGTGATTTTATTTAAGAGATATGTTTTAGCAATTT	599		
Query 606	taatattgtttttgtagtgtattttatattataaaattgatattttgttttCATGAGG	665		
Sbjct 600	TAATATTGTTTTGTAGTGTATTTATATTTATAAATTGATATTTGTTTTCATGAGG	659		
Query 666	AGTCATGAGTAATAGTAGATACATTA AAAACTTCTGATAAAAATTTACCTGAATGatTTT	725		
Sbjct 660	AGTCATGAGTAATAGTAGATACATTA AAAACTTCTGATAAAAATTTACCTGAATGA-TTT	718		
Query 726	tttttatttttatttggTTTTAAAAAGCAGTACCTGATAaatttactggtttattatta	785		
Sbjct 719	TTTTTATTTTATTTGGTTTTTAAAAAGCAGTACCTGATAAAAATTTACTGGTTTATTATTA	778		
Query 786	atggtaactactattatTTtcttatttttatttatatta	824		
Sbjct 779	ATGGTAATACTATTATTTTCTTATTGTTTTTATTATATTA	817		

Secuencia de la región del gen citocromo b de *Leishmania amazonensis*

Leishmania amazonensis kinetoplast pre-edited version of Cytb gene for cytochrome b
 Sequence ID: [AB095964.1](#) Length: 1078 Number of Matches: 1

Range 1: 58 to 974 [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1685 bits(912)	0.0	917/919(99%)	2/919(0%)	Plus/Plus
Query 15	AGGTTTTAGTTTAGGTTTTTTTTATTTGTATGCAAATTAATTTGTGGTGTGTGTTTAGCAT			74
Sbjct 58	AGGTTTTAGTTTAGG-TTTTTTATTTGTATGCAAATTAATTTGTGGTGTGTGTTTAGCAT			116
Query 75	GACTTTTTTTTAGTTGTTTTATTTGTACAAATTGGTATTTGTATTATTTTATGAGAT			134
Sbjct 117	GAC-TTTTTTATTTAGTTGTTTTATTTGTACAAATTGGTATTTGTATTATTTTATGAGAT			175
Query 135	TTTGATTTAGGTTTTGTAATACGAAGTACACATATTTGTTTACTTCTTATTATTTTTTC			194
Sbjct 176	TTTGATTTAGGTTTTGTAATACGAAGTACACATATTTGTTTACTTCTTATTATTTTTTC			235
Query 195	CTTTTATATATTCATATATTTAAGTGTATAGTATAATAATTTTATTTGACACTCATATT			254
Sbjct 236	CTTTTATATATTCATATATTTAAGTGTATAGTATAATAATTTTATTTGACACTCATATT			295
Query 255	TTAGTGTGAGTAGTAGGTTTTGTTATATATATTTTATAGTTATAAATGGTTTTATTGGT			314
Sbjct 296	TTAGTGTGAGTAGTAGGTTTTGTTATATATATTTTATAGTTATAAATGGTTTTATTGGT			355
Query 315	TATGTTTTACCATGTACAATGATGCTTATTGAGGCTTAACTGTATTTAGTAATATTTTA			374
Sbjct 356	TATGTTTTACCATGTACAATGATGCTTATTGAGGCTTAACTGTATTTAGTAATATTTTA			415
Query 375	GCAACAGTACCTGTTATAGGCACCTTGACTTTGTTATTGAATATGAGGTAGTGAATATATT			434
Sbjct 416	GCAACAGTACCTGTTATAGGCACCTTGACTTTGTTATTGAATATGAGGTAGTGAATATATT			475
Query 435	AATGATTTTACATTACTTAAATTACATGTTTTACATGTTTTATTGCTTTTGTATTAATA			494
Sbjct 476	AATGATTTTACATTACTTAAATTACATGTTTTACATGTTTTATTGCTTTTGTATTAATA			535
Query 495	TTAGTTATATTTATGCATTTATTTGTTTACATTATTTTATGAGTTCAGATGGTTTTTGT			554
Sbjct 536	TTAGTTATATTTATGCATTTATTTGTTTACATTATTTTATGAGTTCAGATGGTTTTTGT			595
Query 555	GATAGATTTGCATTTTATTTGTGAACGTTTATGTTTTGTATGTGGTTTTATTTAAGAGAT			614
Sbjct 596	GATAGATTTGCATTTTATTTGTGAACGTTTATGTTTTGTATGTGGTTTTATTTAAGAGAT			655
Query 615	ATGTTTTTAGCATTTTTAAATATTTTATGTAATATATTTTATTTTCAATTAATTGATAT			674
Sbjct 656	ATGTTTTTAGCATTTTTAAATATTTTATGTAATATATTTTATTTTCAATTAATTGATAT			715
Query 675	TTGCTGAATGGTTTTTTTTATTTTATTCGGTTTTTTAAAAGCAGTACCAGATAAATTT			734
Sbjct 716	TTGCTGAATGGTTTTTTTTATTTTATTCGGTTTTTTAAAAGCAGTACCAGATAAATTT			775
Query 735	ACTGGTTTATTGTTAATGGTTATTTTATTGTTTCTTATTTTGTATATTTAAATTGT			794
Sbjct 776	ACTGGTTTATTGTTAATGGTTATTTTATTGTTTCTTATTTTGTATATTTAAATTGT			835
Query 795	ATATTATGATTTGTATATTGTAGAAGTTCATTATTATGATTTACATATTCATTTATTTTA			854
Sbjct 836	ATATTATGATTTGTATATTGTAGAAGTTCATTATTATGATTTACATATTCATTTATTTTA			895
Query 855	TTTATAGTATATTTATGA 933			914
Sbjct 896	TTTATAGTATATTTATGA 974			955
Query 915	TTTATAGTATATTTATGA 933			
Sbjct 956	TTTATAGTATATTTATGA 974			

Secuencia de la región del gen citocromo b de *Leishmania amazonensis*

Leishmania mexicana mexicana kinetoplast pre-edited version of Cytb gene for cytochrome b
 Sequence ID: [AB095983.1](#) Length: 1079 Number of Matches: 1
[▶ See 1 more title\(s\)](#)

Range 1: 309 to 807 [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
848 bits(459)	0.0	487/502(97%)	4/502(0%)	Plus/Plus
Query 1	GTAGGTTTTGTTATATATATATTTATAGTCATAATCGGTTTTATTGGTTATGTTTTACCA	60		
Sbjct 309	GTAGGTTTTGTTATATATATATTTATAGTCATAATCGGTTTTATTGGTTATGTTTTACCA	368		
Query 61	TGTACAATGATGTCCTTATTGAGGYTAWCTGATTTAGTAATATTTAGCAACAGTACCT	120		
Sbjct 369	TGTACAATGATGTCCTTATTGAGGTTAACTGATTTAGTAATATTTAGCAACAGTACCT	428		
Query 121	GTTATAGGCACCTTGACTTTGTTATTGAATATGA-GTAGTGAATATATTAATGATTTTACA	179		
Sbjct 429	GTTATAGGCACCTTGACTTTGTTATTGAATATGAGGTAGTGAATATATTAATGATTTTACA	488		
Query 180	CTACTTAAATTACattgtttttcatgtttttattacccttttgatttaaatattagtgat	239		
Sbjct 489	CTACTTAAATTACAT-G-TTTTACATGTTTTATTACCTTTTGTATTAATATTAGTGATAT	546		
Query 240	ttatgcattttattttgcttacattattttatGAGTTCAGATGgtttttgtgatagatttg	299		
Sbjct 547	TTATGCATTTATTTTGTACATTATTTATGAGTTCAGATGGTTTTTGTGATAGATTG	606		
Query 300	cattttattgtgaacgtttatgtttttgtatgtggttttatttaagagatatgtttttag	359		
Sbjct 607	CATTTTATTGTGAACGTTTATGTTTTGTATGTGGTTTTATTTAAGAGATATGTTTTAG	666		
Query 360	catttttaaatattatytatgtaatatattttatttttatttaattgatcttttgtttttC	419		
Sbjct 667	CATTTTAAATATTATTTATGTAATATATTTATTTTATTAATTGATATTTGTTTTTC	726		
Query 420	ATGAAGAGTCTTGTGTTACTGTGGATACATCAAAAAACCTCTGATAAAATTCTGCCAGAA	479		
Sbjct 727	ATGAAGAGTCTTGGGTTATTGTGGATACATT-AAAAACCTCTGATAAAATTCTGCCAGAA	785		
Query 480	TGGAtttttttatttttATTCCG	501		
Sbjct 786	TGGTTTTTTTTATTTTATTCCG	807		