



**UNIVERSIDAD DE PANAMÁ**



**VICERRECTORÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSTGRADO**

**FACULTAD DE MEDICINA**

**MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**

**TÍTULO:**

**CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE PARÁSITOS DEL GÉNERO  
*LEISHMANIA* EN LESIONES CUTÁNEAS CON FROTIS Y CULTIVO  
NEGATIVOS**

**AUTORA: ADELYS REINA**

**8-860-1514**

**DIRECTOR DE TESIS: Dr. AZAEL SALDAÑA**

**REPÚBLICA DE PANAMÁ**

**2022**

Para optar por el título en Magister  
en Ciencias Biomédicas que otorga  
la Universidad de Panamá

## DECLARACIÓN JURADA

Yo, **Adelys Reina** con cédula de identidad personal número **8-860-1514**, estudiante graduando de la Carrera de **Maestría en Ciencias Biomédicas** declaro bajo juramento, que el material que aparece en esta tesis es de mi producción intelectual u otros autores, razón por la cual asumo la responsabilidad sobre su uso.

Firma \_\_\_\_\_

Cédula \_\_\_\_\_

## **Agradecimientos**

A Dios que me ha brindado las fuerzas y voluntad para no decaer y seguir adelante con mis metas propuestas.

Al Dr. Azael Saldaña quien con su tiempo, esmero y dedicación me encamino, ayudó y orientó a que luchara para lograr mi esfuerzo sin declinar.

Al Instituto Conmemorativo Gorgas de Estudios de la Salud (ICGES) principalmente al Departamento de Investigaciones en Parasitología que me brindo su apoyo e Infraestructura para realizar esta investigación. También a Juan Castillo del departamento de Genómica y Proteómica quien me asesoró en la secuenciación y análisis filogenético de este proyecto.

A la Secretaria Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación (SENACYT-Panamá). Proyecto APY-NI-2019B-12 por financiar esta investigación,

**La autora**

## Contenido

Introducción.....	12
Planteamiento del Problema .....	13
Justificación y Uso de los Resultados .....	15
Capítulo I: Fundamento Teórico .....	18
1.1 Epidemiología .....	19
1.3 Ciclo de Vida.....	21
1.3 Características Clínicas .....	23
1.5 Identificación y Caracterización de <i>Leishmania</i> sp. ....	29
1.6 Vigilancia Epidemiológica .....	31
Objetivos.....	33
Objetivo General.....	33
Objetivos Específicos.....	33
Capítulo II: Metodología .....	34
2.1. Consideraciones éticas .....	35
2.2 Tipo de estudio .....	35
2.3 Ámbito del estudio.....	35
2.3.1 Universo.....	35

2.3.2 Población de Estudio .....	36
2.3.3 Muestra.....	36
2.3.4 Criterios de Inclusión .....	36
2.3.5 Criterios de Exclusión .....	36
2.4 Materiales y Métodos.....	36
2.5 Análisis estadísticos.....	38
2.6. Procedimiento de las PCR.....	39
Hsp-70 análisis de secuenciación y análisis filogenético .....	47
Capítulo III: Resultados .....	52
Resultados.....	53
Características Clínicas .....	53
Capítulo IV:.....	67
Discusión.....	67
Capítulo V:.....	77
Conclusiones y Recomendaciones .....	77
Conclusiones.....	78
Recomendaciones.....	81
Capítulo VI: Bibliografía.....	82

Bibliografía .....	83
Capítulo VII: Anexos.....	100

### Índice de Figuras

Figura 1. Taxonomía del género <i>Leishmania</i> . Fuente: Manual de procedimientos para la vigilancia y control de las leishmaniasis en las Américas 2019. ....	21
Figura 2. Ciclo de vida de la <i>Leishmania</i> sp. en las Américas. Fuente:Manual de procedimientos para la vigilancia y control de las leishmaniasis en las Américas 2019.....	23
Figura 3. Sensibilidad de las tres pruebas de PCR evaluadas. PCR (1) puede detectar 0.00098 pg de ADN de <i>L. V. panamensis</i> , PCR (2) 0.015 pg y PCR (3) 0.25 pg.....	60
Figura 4. Resultados obtenidos con los tres análisis de PCR. (A) KDNA- <i>Viannia</i> específico (B) KDNA-Género específico y (C) Hsp70-Género específico.....	61
Figura 5. PCR-RFLP Hsp-70 usando las enzimas de restricción Hae III (A)y BclI (B) en muestras de lesiones de LC con frotis negativos. Pan- <i>Leishmania panamensis</i> , guy- <i>Leishmania guyanensis</i> , bra- <i>Leishmania brasiliensis</i> ...	62
Figura 6. Gráfica amplificación lineal de las muestras con frotis (-), microscopía .	62
Figura 7. Árbol filogenético máximum Likelihood basado en una alineación de 1286 nucleótidos. Las distancias se estimaron utilizando el modelo de parámetros Kimura-3. Editado con Fig Tree v1.4.3. ....	66

## Índice de Gráficos

Gráfico 1. Sexo del grupo estudiado. N= 123 datos .....	54
Gráfico 2. Provincia de residencia del grupo estudiado. N= 123 .....	56

## Índice de Tablas

<i>Tabla 1. Mezcla de reactivos para el PCR1 .....</i>	40
<i>Tabla 2. Condiciones del programa PCR1 .....</i>	41
<i>Tabla 3. Mezcla de reactivos para PCR2 .....</i>	42
<i>Tabla 4. Condiciones del programa PCR2 .....</i>	42
<i>Tabla 5. Mezcla de reactivos para el PCR3 .....</i>	43
<i>Tabla 6. Condiciones del programa PCR3 .....</i>	44
<i>Tabla 7. Condiciones de la Enzima Hae III.....</i>	45
<i>Tabla 8. Condiciones de la Enzima Bccl .....</i>	46
<i>Tabla 9. Condiciones de la Enzima Rsa I.....</i>	46
Tabla 10. Reacción utilizada para la secuenciación .....	48
Tabla 11. Condiciones para el ciclado de secuenciación .....	49
<i>Tabla 12. Secuencias obtenidas del Genbank utilizadas como referencia.....</i>	50
Tabla 13. Edades de pacientes con frotis negativos . N= 122 datos .....	53
Tabla 14. Número de lesiones en el grupo de frotis Negativos. N=96.....	54
Tabla 15. Localización de lesiones de pacientes con frotis positivos. N=96 .....	55
Tabla 16. Número de lesiones en pierna y brazos. ....	55
Tabla 17. Distritos de las provincias con mayores casos. ....	56
Tabla 18. Provincia visitada en los tres últimos meses antes de su consulta con la Unidad Clínica de Investigación. N=123. ....	57

Tabla 19. Número de lesiones de pacientes con frotis positivo.....	57
Tabla 20. Localización de lesiones de pacientes con frotis positivos .....	58
Tabla 21. Número de lesiones en pierna y brazos en pacientes con frotis positivo .....	58
Tabla 22. Comparación de número de lesiones entre pacientes con frotis negativos y positivos .....	59
Tabla 23. Comparación de localización de lesiones entre pacientes con frotis negativos y positivos.....	59
Tabla 24. Resultados de los PCR y de la secuenciación a todas las muestras que fueron empleadas. ....	63

#### Índice de anexos

Anexo 1. Protocolo de PCR-Hsp-70 -RLFP.....	101
Anexo 2. Protocolo de purificación (Qiaquick gel extraction kit).....	102
Anexo 3. Secuenciación de Sanger: .....	103
Anexo 4. Purificación con Bigdye X terminator kit .....	104
Anexo 5. Tabla de datos de las muestras .....	105
Anexo 6. Tabla de datos de muestras secuenciadas .....	116
Anexo 7. Gráfico Boxplot del umbral de ciclos (ct) de frotis con diferentes concentraciones de amastigotes .....	117
Anexo 8. Aval de bioética.....	117
Anexo 9. Renovación del aval de bioética.....	117
<i>Anexo 10. Cargando gel de agarosa para el RFLP.....</i>	<i>122</i>
<i>Anexo 11. Cortando bandas en el gel para la purificación del fragmento.....</i>	<i>122</i>

## Abreviaturas

LC: Leishmaniasis Cutánea

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa

ADN: Ácido Desoxirribonucleico

Hsp70: Proteína de Choque térmico 70

KDNA: Ácido Desoxirribonucleico del Kinetoplasto

RFLP: Polimorfismo en el Tamaño de Fragmentos de Restricción

BLAST: Herramienta Básica de Búsqueda de Alineación Local

LCL: Leishmaniasis Cutánea Localizada

LCD: Leishmaniasis Cutánea Difusa

LCM: Leishmaniasis Cutánea Mucocutánea

LD: Leishmaniasis Cutánea Diseminada

LV. Leishmaniasis Visceral

ICGES: Instituto Conmemorativo Gorgas de Estudios de la Salud

TBE: Tris Borato de EDTA

## Resumen

Entre las zoonosis parasitarias endémicas en Panamá, la Leishmaniasis Cutánea (LC) presenta las incidencias más altas con 1,000-3,000 casos anuales. El diagnóstico parasitológico de esta infección se basa en la demostración microscópica del parásito en frotis teñidos y cultivos realizados a partir de las lesiones. Sin embargo, con frecuencia estos análisis resultan negativos aun cuando las pruebas moleculares (PCR) confirman posteriormente la infección. El objetivo principal de este estudio fue detectar y caracterizar molecularmente los parásitos del género *Leishmania* presentes en lesiones cutáneas con frotis y cultivo negativos. Para ello se evaluaron 123 muestras de ADN procedentes de lesiones de LC de pacientes que asistieron a la Unidad de Diagnóstico, Investigación Clínica y Medicina Tropical del ICGES entre el período del 2015 al 2019. Estos casos presentaron diagnósticos directos negativos, pero fueron confirmados por alguna metodología molecular.

Las muestras fueron evaluadas inicialmente con 4 técnicas de PCR que amplifican las siguientes regiones: (1) KDNA-*Viannia* específico, (2) KDNA-Género específico, (3) Hsp70-Género específico y (4) qPCR 18S ribosomal. Los hallazgos confirman la mayor sensibilidad de la PCR KDNA-*Viannia* específico (100%). Los resultados de la qPCR18S ribosomal, mostraron una sensibilidad de 77.6%.

Adicionalmente, 69 muestras positivas en el PCR-Hsp-70 fueron caracterizadas a nivel de especie mediante un análisis RFLP con las enzimas Hae III y Bcc I; correspondiendo un 59.4% a *L. (V.) panamensis* y 40.6% a *L. (V.) guyanensis*.

Finalmente, los productos de amplificación del PCR-Hsp-70 fueron purificados y secuenciados para un análisis filogenético que incluyó 38 secuencias. Veintiuna de las secuencias evaluadas se agruparon con una secuencia referencia de *L. (V.) panamensis*, mientras que 11 caracterizadas por RFLP como *L. (V.) guyanensis* se agruparon con el grupo de la variante genética denominada *Leishmania* sp.1.

Según nuestros resultados, en estas lesiones de LC con baja carga parasitaria predomina *L. (V.) panamensis*, sin embargo, la variante genética *Leishmania* sp.1 también se vincula con frecuencia con este tipo de lesiones. En ningún caso se logró demostrar una asociación significativa entre estas lesiones con baja carga parasitaria y otra característica clínico-epidemiológica.

Los resultados de este estudio refuerzan la utilidad de los métodos moleculares en el diagnóstico de la LC, especialmente en lesiones con baja carga parasitaria. Además, señalan las especies/variantes genéticas de *Leishmania* involucradas, así como las características clínico/epidemiológicas vinculadas con este tipo de lesión.

## Introducción

La leishmaniasis cutánea (LC) es una parasitosis ocasionada por parásitos del género *Leishmania*, su transmisión es principalmente zoonótica, es transmitida por la picadura de mosquitos de la subfamilia phlebotominae. En el humano infectado causan síndromes clínicos que pueden comprometer la piel y las mucosas. El diagnóstico parasitológico de esta infección se basa en la detección microscópica del parásito en frotis teñidos a partir de muestras de las lesiones y cultivos del parásito. Sin embargo, con frecuencia estos análisis pueden resultar negativos aun cuando las características clínicas/epidemiológicas sugieren que el individuo sufre de una LC. Por ejemplo, en Panamá, entre los años 2015 al 2019 se registraron un total de 342 pruebas negativas por frotis de las cuales 179 (52.34 %) resultaron ser positivas al realizarse una prueba de PCR standard que detecta KDNA.L Los resultados de una prueba microscópica pueden verse influenciados por distintos factores como: la especie, la carga parasitaria de la muestra, la experiencia del personal técnico que realiza la detección microscópica, entre otras. El principal objetivo de estudio fue determinar la especie involucrada en las lesiones que se diagnostican con frotis y cultivos negativos y PCR positivos

## Planteamiento del Problema

La leishmaniasis cutánea (LC) es una enfermedad zoonótica, endémica en muchas regiones rurales de la República de Panamá, con un registro anual de mil a tres mil casos (OPS/OMS, 2016). Esta infección es causada por un protozoo parásito del género *Leishmania* el cual cuenta con más de 20 especies asociadas con infecciones en humanos (a. Montalvo et al., 2012). *Leishmania Viannia panamensis* es considerada la especie responsable de la mayoría de los casos de LC en el país (OPS/OMS, 2016). La presentación clínica de esta parasitosis es muy variada, la más común son úlceras localizadas de evolución crónica que pueden o no formar costras, sin embargo otras formas clínicas más severas son también reportadas (Consuelo V. & Craft, 2009).

El diagnóstico parasitológico de la LC depende de la visualización microscópica del agente etiológico. En este sentido, la cantidad de amastigotas presentes en la lesión (carga parasitaria) puede estar ligada a diversos factores: tiempo de evolución de la lesión, estado inmunitario del paciente y características genéticas del parásito (Zerpa et al., 2002). Generalmente las formas amastigotas son detectadas mediante la revisión microscópica de un frotis teñido de la lesión, lo cual requiere experiencia por parte de técnico, sobre todo cuando la carga parasitaria es baja. De este modo, una exploración insuficiente y/o un frotis mal procesado pueden conducir a resultados falsos negativos. Los métodos de diagnóstico parasitológicos para la LC tienen entonces importantes inconvenientes de ejecución y sensibilidad. Una alternativa para esto son los métodos moleculares (Chena et al. 2013; Merino-Espinosa et al. 2018), los cuales han demostrado tener no sólo mayor sensibilidad,

sino que también permiten la identificación de la especie de *Leishmania* involucrada, así como otras características genéticas de estos parásitos. La discrepancia negativa es una de las razones para que se recomiende utilizar más de un método de diagnóstico para LC, uno convencional y uno de base molecular (Al-Jawabreh et al., 2018).

Si bien *L.(V.) panamensis* es el agente causal de la mayoría de los casos de LC en Panamá, recientemente se ha identificado una variante genética de esta especie presente en cerca del 20% de los casos hasta ahora evaluados en Panamá (Miranda et al., 2021). De igual manera nuevos estudios moleculares sugieren que algo menos del 1% de los casos de LC están asociados a otras especies de leishmanias como: *L. (V.) brasiliensis*, *L. (V.) guyanensis* y *L. (V.) naiffi* o variantes genéticas de las mismas.

Por lo tanto, surgen las siguientes interrogantes **¿la ausencia de amastigotes en un frotis de una lesión inducida por LC está vinculado con alguna variante genética de *L. (V.) panamensis* u otras especies circulantes en Panamá? ¿Qué otros factores clínicos/epidemiológicos pueden asociarse con frotis negativos a la presencia microscópica de *Leishmania* sp.?**

## Justificación y Uso de los Resultados

La LC es una enfermedad parasitaria que afecta las poblaciones más desprotegidas socialmente de nuestro país. En el período del 2010 al 2018 se reportaron 13,815 siendo el año con mayor número de casos el 2010 (3,221). Las regiones con mayor riesgo de transmisión en este período fueron: Bocas del Toro, Coclé, Panamá Metro y Panamá Oeste Según los datos estadísticos del MINSA (Ministerio de Salud de Panamá).

El diagnóstico de la LC es desafiante debido en parte al amplio espectro de manifestaciones clínicas involucradas. Las lesiones cutáneas inducidas varían en gravedad, apariencia clínica, duración y, en algunos casos, pueden ser indistinguibles de las lesiones causadas por bacterias y hongos, como botriomicosis cutánea, lepra lepromatosa, lobomicosis cutánea o cáncer (Moreira, et al. 2018).

El estándar de oro actualmente aceptado para el diagnóstico requiere el aislamiento de los parásitos involucrados y la visualización microscópica de amastigotes en fragmentos de tejido de una lesión (Calvo-Fonseca, et al. 2018; da Graça et al. 2012).

La microscopía directa tiene una relativamente baja sensibilidad en el diagnóstico de casos LC (Moreira et al. 2018; Rasti et al. 2016), ya que están influenciados por las especies causales, la carga de parásitos y la experiencia del personal técnico (Merino-Espinosa et al., 2018).

Como el frotis tiene una alta especificidad, pero una baja sensibilidad, las técnicas moleculares se convierten en una opción atractiva para un diagnóstico exitoso ya

que la mayoría reporta mejores sensibilidades que los análisis de frotis teñidos (Merino-Espinosa et al., 2018).

Las ventajas de la PCR para la detección de LC son más notables en las muestras clínicas con amastigotas escasos (Oddone et al. 2014). Los métodos convencionales (frotis/cultivo) dependen de cargas parasitarias relativamente altas y a la ausencia de contaminación bacteriana (Weigle et al., 2002). Esta última puede inducir no solo resultados falsos positivos sino también falsos negativos (Tsokana et al. 2018; Vergel et al. 2005).

*Leishmania (V.) panamensis* ha sido el principal agente etiológico de LC reportado en pacientes panameños desde que fue aceptado como una nueva especie en 1972 (Lainson et al. 1972). Sin embargo, la posibilidad de una mayor diversidad genética de parásitos del subgénero *Viannia* en esta región geográfica siempre ha permanecido abierta. Esta posibilidad se refuerza si consideramos que la clasificación taxonómica subgénero *Viannia* ha sido cuestionada repetidamente con el advenimiento de mejores tecnologías de tipificación y que las variantes genéticas de *L. (V.) panamensis* han sido descritas en regiones geográficas cercanas a Panamá (Herrera et al. 2017). Por otro lado, estudios recientes confirman que al menos una variante de *L. (V.) panamensis* es frecuente en las lesiones de LC. De igual manera se ha validado la circulación de otras especies como *L. (V.) brasiliensis*, *L. (V.) guyanensis* y *L. (V.) naiffi*, todas con relativa baja frecuencia (Miranda et al., 2021).

La presencia y abundancia de estas especies y/o variantes de especies puede estar vinculada a condiciones eco-biológicas no claramente definidas (Ministerio de Sanidad de España, 2013). Sin embargo, al igual que otros patógenos, la diversidad

genética podría estar asociada a patrones eco-epidemiológicos, virulencia, patogenicidad y respuestas farmacológicas particulares (Herrera et al. 2017; Oliveira et al. 2017; Van der Auwera et al. 2015).

La detección y caracterización molecular de parásitos del género *Leishmania* en lesiones cutáneas con frotis y cultivo negativo tiene gran interés científico y práctico. Con la información generada, las autoridades de salud responsables del diagnóstico de la LC en Panamá, podrían mejorar los criterios a utilizarse para la selección e implementación de los métodos de diagnóstico más adecuados en una determinada condición clínica de LC. Además, la identificación de las especies y variantes genéticas presentes puede también guiar en la elección de mejores técnicas de detección parasitológicas/moleculares, así como en el pronóstico de evolución de la enfermedad y la toma de decisiones con respecto al tratamiento.

# **Capítulo I: Fundamento Teórico**

## Fundamento Teórico

### 1.1 Epidemiología

La leishmaniasis tegumentaria es una enfermedad transmitida por vectores causada por protozoos flagelados del género *Leishmania*. La infección está muy extendida en las áreas tropicales y subtropicales a nivel mundial encontrándose en 98 países de Europa, África, Asia y América (Steverding, 2017).

Esta zoonosis es un importante problema de salud pública en las Américas, donde se diagnostican cada año un promedio de 60.000 casos de leishmaniasis cutánea y de mucosa. En Panamá se presenta una creciente incidencia de los casos de LC, aproximadamente 1,000 a 3,000 casos son reportados cada año. Sin embargo, esta cifra no refleja la verdadera dimensión de esta parasitosis debido un sub-registro superior al 50% (OPS/OMS, 2016).

La enfermedad es transmitida por dípteros infectados (Díptera: Psychodidae) del género *Lutzomyia*. En Panamá a estos pequeños mosquitos se les conoce como “chitras” y están generalmente vinculados con zonas boscosas o áreas cercanas a estas (Valderrama et al., 2008). Existen cerca de 76 especies de chitras en Panamá, cerca de seis son consideradas vectores de LC (Rigg, 2016; Saldaña et al. 2013).

La transmisión de la leishmaniasis cutánea (LC) al igual que otras enfermedades infecciosas pueden verse influenciadas por el cambio climático como los cambios estacionales, por ejemplo con el fenómeno del niño aumenta la cantidad de casos de LC (Chaves et al. 2014).

También la interrupción de ecosistemas y servicios ecosistémicos importantes, la deforestación a gran escala y la urbanización intensifican la transmisión de esta enfermedad (Nava et al. 2017).

## **1.2 Agente etiológico**

El parásito es un protozoo perteneciente a la familia *Trypanosomatidae*. El género *Leishmania* comprende alrededor de 22 especies patógenas al hombre, las cuales se agrupan en los subgéneros *Leishmania* y *Viannia*. En el Nuevo Mundo han sido identificadas 15 especies de *Leishmania* con diferente tropismo: visceral, cutáneo y mucoso. El parásito es digenético, es decir, durante su ciclo de vida se encuentra en dos formas o estadíos: una forma promastigote que mide entre 20 y 30  $\mu\text{m}$ , es extracelular y alargada, y posee un flagelo que le permite la movilidad en el intestino de los insectos vectores; y otra forma la amastigote, la cual mide entre 2 y 5  $\mu\text{m}$ , es redondeada e intracelular, carece de flagelo, y se multiplica en células del sistema mononuclear fagocítico, principalmente macrófagos. Ambas formas del parásito se dividen por fisión binaria.

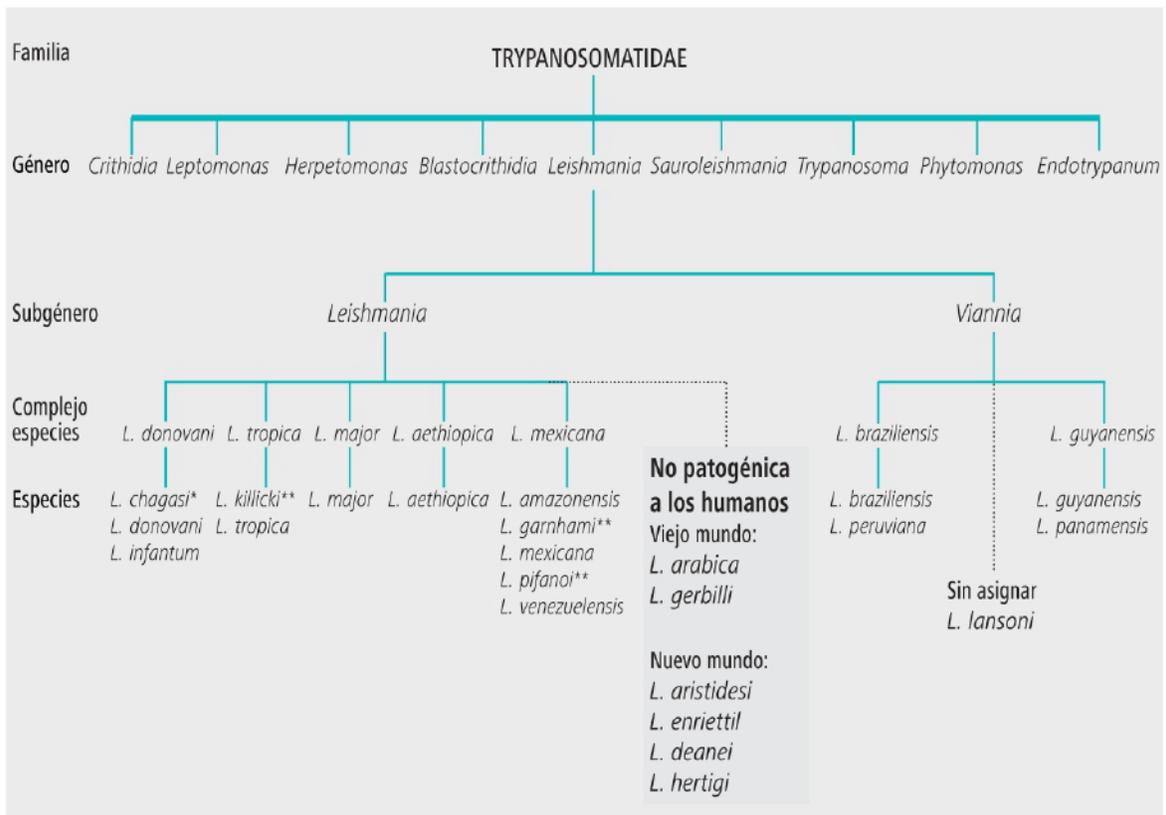


Figura 1. Taxonomía del género *Leishmania*. Fuente: Manual de procedimientos para la vigilancia y control de las leishmaniasis en las Américas 2019.

### 1.3 Ciclo de Vida

Dependiendo de la especie de *Leishmania* involucrada, los humanos y una amplia gama de mamíferos pueden actuar como reservorios (Mohammadpour et al. 2016).

En Panamá existen estudios que señalan que los perezosos son los principales reservorios de parásitos del género *Leishmania* (Lainson et al. 1972), sin embargo, otras especies de mamíferos también se han encontrado infectadas (Ashford, 1997; Lainson et al. 1974; Rigg, 2016).

El parásito presenta dos formas morfológicas: amastigote (forma redondeada que parasita el sistema mononuclear fagocítico de los mamíferos) y promastigote (forma

flagelada que aparece en el vector y medios de cultivo ) (Del Rosal Rabesa et al., 2010).

Cuando la chitra pica a un huésped infectado, ingiere células parasitadas por amastigotes. En el intestino del vector, los amastigotes pasan a promastigotes, se multiplican y migran a la zona bucal del insecto. Si el mosquito pica a un ser humano, le inyecta promastigotes que entran en las células del sistema mononuclear fagocítico y se convierten en amastigotes. Estos son parásitos intracelulares obligados, son los que producen las manifestaciones clínicas de la enfermedad en humanos (Del Rosal Rabesa et al., 2010).

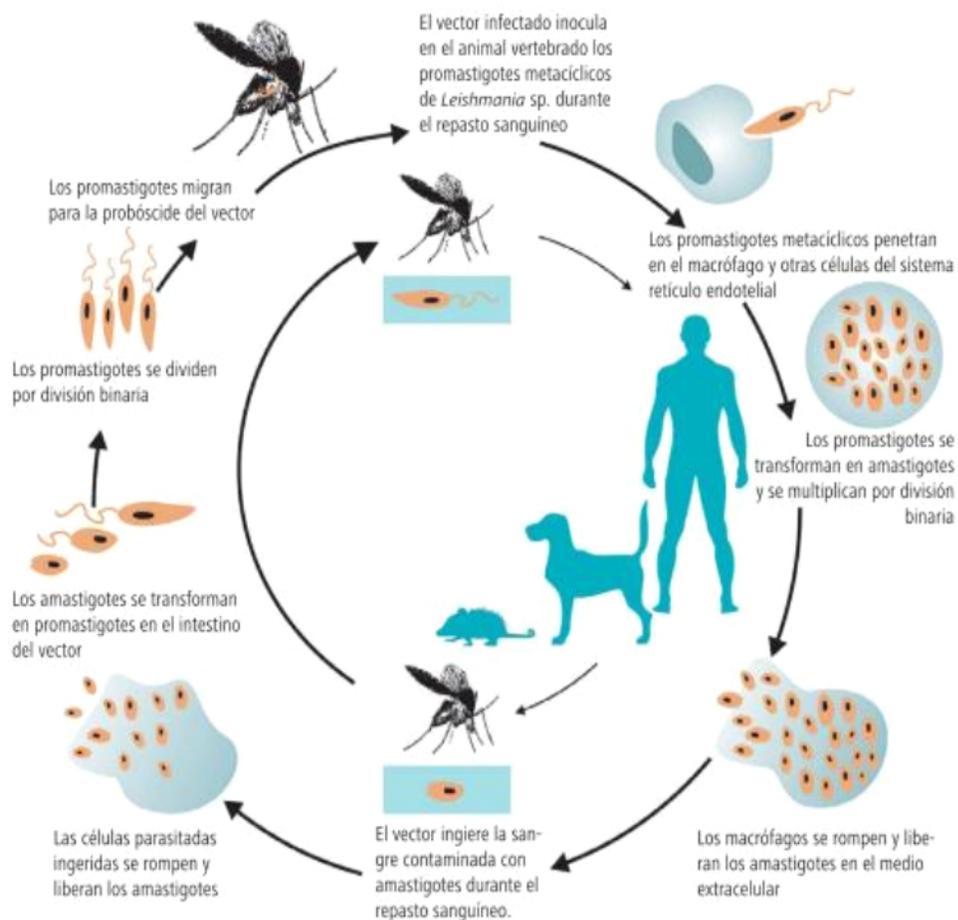


Figura 2. Ciclo de vida de la *Leishmania* sp. en las Américas. Fuente: Manual de procedimientos para la vigilancia y control de las leishmaniasis en las Américas 2019.

### 1.3 Características Clínicas

Desde la perspectiva clínica, la LC se caracteriza por la progresión de lesiones localizadas únicas o múltiples en áreas expuestas de la piel que se ulceran específicamente después de un período de incubación de 3 a 8 semanas. Las extremidades inferiores, las extremidades superiores y la cara son más comúnmente afectadas (Mohammadpour et al., 2016). En la mayoría de los casos de LC reportadas en Panamá las lesiones ulceradas son localizadas y de evolución crónica (OPS/OMS, 2016).

Las manifestaciones clínicas de las lesiones por sí solas son insuficientes para identificar categóricamente un caso de LC (Azmi et al., 2011), ya que otras patologías dérmicas son muy similares. A pesar de este hecho, la morfología de las lesiones orientan inicialmente el diagnóstico de un caso de LC (Azmi et al., 2011). La LC puede presentarse en tres formas con características clínicas que difieren entre ellas, la Leishmaniasis cutánea localizada (LCL) que se caracteriza por una o varias lesiones generalmente nodulares o ulceradas, la Leishmaniasis Mucocutánea (LCM) que se interpreta por lesiones inflamatorias destructivas de la mucosa nasal y Leishmaniasis Cutánea Difusa (LCD), la cual es una forma anérgica de curso crónico caracterizada por nódulos, placas y pápulas no ulceradas, diseminadas por toda la superficie corporal (Eugenia et al. 2013). También se ha descrito otra variante poco común de la LC llamada Leishmaniasis diseminada (LD) una forma emergente caracterizada por múltiples lesiones cutáneas localizadas en diferentes zonas de la superficie corporal que puede llegar a comprometer la mucosa nasal (Machado et al. 2011). Se han informado lesiones inusuales que no se ajusta a cualquiera de las formas clínicas bien caracterizadas de la enfermedad. Estos casos se conocen como LC atípica, y se ha encontrado un espectro de cambios histológicos que producen diferentes manifestaciones clínicas, como pápulas, lesiones verrugosas y queloides, y placas con costras y ulceradas (Rêgo et al. 2018).



*Figura 3. Leishmaniasis cutánea múltiples: úlceras del mismo estado evolutivo, distantes unas de las otras. Fuente: Manual de procedimientos para la vigilancia y control de las leishmaniasis en las Américas 2019*



*Figura 4. Leishmaniasis cutánea diseminada: pápulas inflamatorias y lesiones acneiformes en gran cantidad, en el tronco. Fuente: Manual de procedimientos para la vigilancia y control de las leishmaniasis en las Américas 2019.*



*Figura 5. Leishmaniasis cutánea difusa: lesiones nódulo-tumoral localizadas en piernas. Manual de procedimientos para la vigilancia y control de las leishmaniasis en las Américas 2019.*



*Figura 6. Leishmaniasis cutánea atípica: lesión única no ulcerada. Manual de procedimientos para la vigilancia y control de las leishmaniasis*

#### **1.4 Diagnóstico**

El diagnóstico definitivo de la LC puede ser desafiante, especialmente en áreas endémicas donde ocurren otras enfermedades cutáneas con síntomas clínicos similares.

En los países en desarrollo, el diagnóstico de rutina de todas las formas de la leishmaniasis a menudo combina síntomas clínicos con examen microscópico directo, serología y cultivo. Sin embargo, las manifestaciones clínicas a menudo varían y los síntomas pueden ser subclínicos, mientras que los métodos de cultivo requieren mucho tiempo y, a menudo, no producen un buen rendimiento. Todos estos factores contribuyen a la baja sensibilidad asociada con estos métodos (Lamm et al., 2018).

Aunque la visualización directa del parásito es la técnica más utilizada y a menudo se considera el estándar de oro de diagnóstico tanto para la leishmaniasis visceral (LV) como para la LC, actualmente no hay consenso sobre qué método debe usarse regularmente (Da Graça et al., 2012; Lamm et al., 2018).

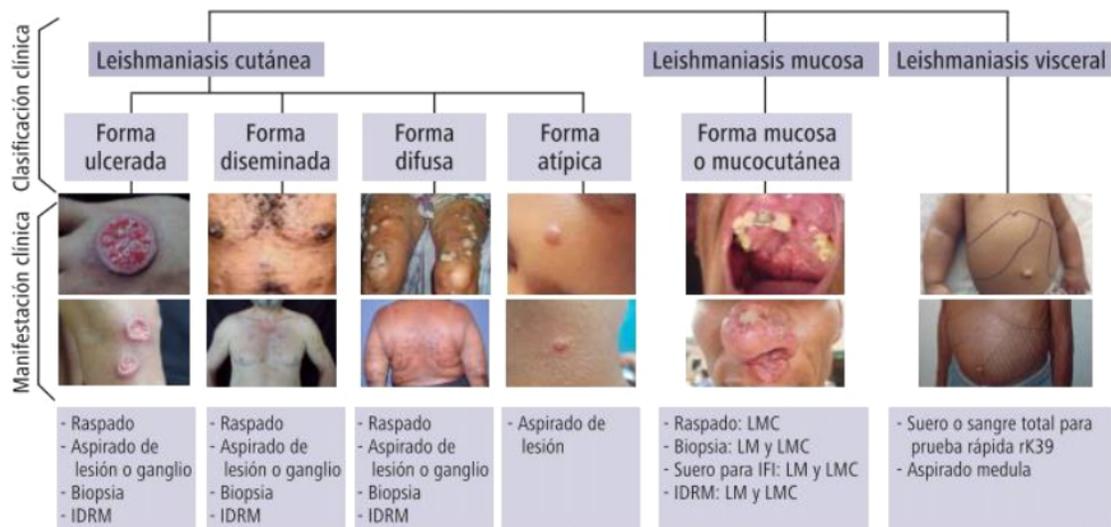


Figura 7. Clasificación clínica y toma de muestras para el diagnóstico de las leishmaniasis en las Américas OPS/OMS, 2018

La especificidad del frotis/cultivo es alta; sin embargo, su sensibilidad como prueba parasitológica es baja, dependiendo grandemente en la cantidad de parásitos en la muestra, la duración de la enfermedad y la habilidad de los técnicos de laboratorio (Rasti et al.2016).

El examen microscópico requiere experiencia y una tinción óptima de los frotis, ya que las partículas de tinción y los restos de tejido teñido pueden interpretarse erróneamente como amastigotes, lo que da resultados falsos positivos a LC y distorsiona los resultados negativos en el análisis estadístico. Cuando los amastigotes son pocos o muy escasos, muchos campos deben ser examinados

antes de que un frotis se declare negativo. La exploración insuficiente también puede conducir a resultados falsos negativos (Al-Jawabreh et al. 2018).

En los laboratorios clínicos rurales, la microscopía se utiliza para el diagnóstico de rutina, creando una oportunidad para diagnósticos inexactos, que pueden afectar al paciente y al sistema de atención médica (Kevric et al. 2015)

Los falsos positivos pueden conducir a terapias innecesarias con medicamentos potencialmente tóxicos, mientras que los falsos negativos, en cursos de enfermedad prolongados, pueden llevar una mayor utilización de recursos para repetir las pruebas y un mayor sufrimiento para el paciente (Mashayekhi-Ghoyonlo et al. 2015), si el tratamiento para la LC no es apropiado podría generar una reinfección y una resistencia a los medicamentos.

Se ha demostrado que los métodos tradicionales como las manifestaciones clínicas de la enfermedad no son confiables para la detección de especies de *Leishmania*, por lo que se debe recurrir a métodos alternativos que tengan mayor sensibilidad y precisión, sumando la falsa discrepancia negativa son razones para usar más de un método de diagnóstico, uno convencional y uno de base molecular (Al-Jawabreh et al., 2018; Mohammadiha et al., 2017).

Por otro lado, Los métodos moleculares, como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), se utilizan principalmente en la investigación y se acercan al 99–100% tanto en sensibilidad como en especificidad (Lamm et al., 2018).

En los últimos años se han descrito un buen número de análisis moleculares para la identificación/caracterización de parásitos del género *Leishmania* (Abd El-Salam et al., 2014; Córdova et al., 2011). Estas técnicas incluyen el análisis de secuencia de genes multicopia, polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción,

regiones espaciadoras intergénicas, huellas dactilares de ADN, reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y ADN polimórfico amplificado al azar (Abd El-Salam et al., 2014).

La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) es una herramienta molecular de diagnóstico que presenta buena especificidad y sensibilidad (Kheirandish et al., 2013) y permite identificar el género y caracterizar los complejos de *Leishmania* directamente en muestras biológicas. Diferentes blancos de amplificación han sido utilizados, sin embargo, los que presentan mayor sensibilidad son los que se encuentran en secuencias multicopias, como el gen de la subunidad pequeña ribosomal (SSU rRNA), secuencias repetitivas del ADN genómico, secuencias de los minicírculos de ADN del kinetoplasto (kDNA), el gen del locus gp63, que han sido utilizados no solo para la detección sino para la identificación de los parásitos (Chena et al., 2013). El kDNA es considerado como uno de los principales blancos, debido a la presencia de 10.000 a 20.000 copias por célula, lo cual incrementa la sensibilidad del ensayo (Chena et al., 2013).

Esta detección e identificación de parásitos por métodos moleculares constituye un apoyo a las técnicas convencionales de diagnóstico permitiendo además realizar estudios epidemiológicos de mayor amplitud y exactitud (Chena et al., 2013).

### **1.5 Identificación y Caracterización de *Leishmania* sp.**

La identificación de *Leishmania* por la técnica de PCR y la factibilidad de su aplicación a distintas muestras biológicas constituye una importante ventaja y un apoyo al diagnóstico de rutina de la enfermedad (Chena et al. 2013). En el mismo

sentido, la identificación de las especies responsables de esta enfermedad permite caracterizar los brotes epidemiológicos, la distribución en regiones geográficas y predecir los futuros cambios en la transmisión de la enfermedad en un área determinada (Cárdenas Alegría et al., 2012).

La caracterización de los minicírculos del kinetoplasto puede ser una alternativa eficiente para combinar la detección sensible y la identificación confiable de *Leishmania* sp. Este método se utiliza para evaluar la diversidad de especies de *Leishmania* en poblaciones endémicas (Kocher et al., 2018). Sin embargo, la posibilidad de una mayor diversidad genética de los parásitos de *Leishmania Viannia* en Panamá siempre ha permanecido abierta. Esta posibilidad se refuerza si consideramos que la clasificación taxonómica de *Leishmania* subgénero *Viannia* ha sido varias veces cuestionadas con el advenimiento de mejores tecnologías de tipificación, y que las variantes genéticas de *L. panamensis* han sido descritas en regiones geográficas cercanas a Panamá (Herrera et al. 2017).

La diversidad genética en las distintas áreas geográficas refleja la plasticidad de estos parásitos al adaptarse a diferentes especies de vectores (o poblaciones de estos) (Herrera et al. 2017). La incorporación de marcadores moleculares podría permitir mejorar la determinación de la diversidad genética de varias especies de *Leishmania* que circulan en una región determinada.

Con frecuencia, durante el análisis microscópico de tejidos procedentes de lesiones causadas por LC, no resulta posible detectar amastigotas. Sin embargo, en muchos de estos casos las pruebas de PCR confirman la infección permitiendo de esta manera iniciar el tratamiento correspondiente (Córdova et al. 2011). ¿Qué características de la interacción parásito/huésped se vinculan con la presencia de

una carga parasitaria baja en las lesiones causadas por la LC? Al respecto existe poca información en los casos de LC diagnosticados en Panamá. Por regla general se acepta que las lesiones de corta evolución tienen cargas parasitarias más altas (Al-Jawabreh et al. 2018), y que los parásitos son más difíciles de encontrar en las lesiones crónicas (Jaramillo-Antillón et al. 2018; Gamboa et al. 2009). También se admite que pacientes inmunocomprometidos pueden presentar cargas parasitarias más elevadas (Pérez et al, 2006). Las especies de los parásitos involucrados pueden también influir en la carga parasitaria. Por ejemplo, las lesiones causadas por *L. mexicana* presentan cargas parasitarias más elevadas que las encontradas con *L. brasiliensis* (Augusto, 2000). De igual manera variantes genéticas de una determinada especie puede inducir una mayor o menor carga parasitaria (Pereira et al. 2017). En Panamá predomina *L. (V.) panamensis* como agente etiológico de la LC, sin embargo, trabajos recientes confirman la presencia de variantes genéticas de esta especie y otras especies que circulan en nuestro medio (Davila et al., 2021; Miranda et al., 2021).

El estudio de estas infecciones con carga parasitaria baja podría generar información relevante no sólo para mejorar el diagnóstico de esta infección, sino también en el manejo clínico y pronóstico de estos pacientes.

## **1.6 Vigilancia Epidemiológica**

La LC está vinculada a la pobreza, viviendas en mal estado y a otros factores sociales, además de los ambientales y climáticos, que influyen mucho en su epidemiología (OPS, 2019). Los hombres y las mujeres difieren en la susceptibilidad

a algunas enfermedades infecciosas de una manera dependiente de la edad (Guerra-Silveira & Abad-Franch, 2013). Sin embargo, para LC pueden verse igualmente afectados si ambos sexos participan en actividades con alta exposición a los vectores. La presencia de infección puede depender de factores como el sistema inmune que puede estar limitado por la edad, alterado por la desnutrición o coinfección con VIH (Collis et al. 2019).

Conocer la población afectada por LC es importante para establecer estrategias efectivas para la prevención y control de control de la enfermedad. Las diferencias en la morbilidad, la respuesta al tratamiento y el pronóstico, relacionadas con las especies de *Leishmania*, evidencian la necesidad de caracterizar las especies más prevalentes en nuestra región que tienen diferentes características epidemiológicas. (Gosch et al. 2017).

## Objetivos

### Objetivo General

- ✓ Detectar y caracterizar molecularmente los parásitos del género *Leishmania* presentes en lesiones cutáneas con frotis y cultivo negativo.

### Objetivos Específicos

- ✓ Determinar la asociación entre la presencia de lesiones de LC con frotis/cultivos negativos y las características clínicas y eco-epidemiológicas de estos pacientes.
- ✓ Evaluar la presencia de parásitos del género *Leishmania* en lesiones cutánea con frotis y cultivo negativo, mediante cuatro análisis de PCR (1) KDNA-Viannia específico, (2) KDA-Género específico, (3) Hsp70-Género específico y (4) qPCR-18S ribosomal.
- ✓ Identificar mediante la técnica PCR-Hsp70 RFLP y secuenciación de este marcador, la(s) especie(s) y/o variantes genéticas de *Leishmania* asociadas a lesiones con diagnóstico parasitológico negativo.

# Capítulo II: Metodología

## **Metodología**

### **2.1. Consideraciones éticas**

Para este trabajo de tesis se obtuvo la aprobación por parte del Comité de Bioética de la Investigación del Instituto Conmemorativo Gorgas de Estudios de la Salud (Anexo 8, 9).

### **2.2 Tipo de estudio**

Se realizó un estudio analítico, correlacional, retrospectivo donde se evaluaron muestras de ADN de pacientes con LC que hayan asistido a la Unidad de Diagnóstico, Investigación Clínica y Medicina Tropical del ICGES.

### **2.3 Ámbito del estudio**

Pacientes que hayan asistido a la Unidad de Diagnóstico, Investigación Clínica y Medicina Tropical del ICGES durante los años 2015-2019 debido a una LC localizada, confirmada por alguna metodología molecular y que presenten frotis de lesión y cultivo negativos.

#### **2.3.1 Universo**

Todos los pacientes que hayan asistido a la Unidad de Diagnóstico, Investigación Clínica y Medicina Tropical del ICGES durante un período de 5 años (2015-2019) debido a una LC localizada, confirmada por alguna metodología molecular y que presenten frotis de lesión y cultivo negativos.

### **2.3.2 Población de Estudio**

Pacientes (2015-2019) con un diagnóstico de LC por alguna metodología confirmada y que presentaron frotis de lesión y cultivo negativo.

### **2.3.3 Muestra**

Se analizaron 123 muestras de ADN de pacientes procedentes del banco de ADN del Departamento de Investigaciones en Parasitología del ICGES.

### **2.3.4 Criterios de Inclusión**

Toda muestra de paciente que haya asistido a la Unidad de Diagnóstico, Investigación Clínica y Medicina Tropical del ICGES por LC entre enero 2015-a diciembre 2019, y que haya presentado diagnósticos por frotis de lesión y cultivo negativos, además de una prueba molecular positiva a LC.

### **2.3.5 Criterios de Exclusión**

Toda muestra de paciente que no cumpla con el criterio de inclusión.

## **2.4 Materiales y Métodos**

- ✓ Materiales, equipos y reactivos
- ✓ Muestras de ADN
- ✓ Batas
- ✓ Guantes
- ✓ Tubos de 1.5 mL
- ✓ Tubos de 0.2 mL con tapa tipo domo
- ✓ Gradillas
- ✓ Envase de desecho de puntas

- ✓ Gabinete de bioseguridad
- ✓ Puntas aerosol resistentes con filtro de 1-20  $\mu\text{L}$  y 200-1000  $\mu\text{L}$  estériles
- ✓ Micropipetas de 0-10  $\mu\text{L}$ , 5-200  $\mu\text{L}$  y 200-1000  $\mu\text{L}$
- ✓ Minivortex
- ✓ Termociclador
- ✓ PCR mix
- ✓  $\text{MgCl}_2$
- ✓ Cebador B1 (5'-GGGGTTGGTGTAAATATAGTGG-3') y LV (5'-ATTTTTGAACGGGGTTTCTG-3')
- ✓ cebadores F25 (5' GGACGCCGGCACGATTKCT 3') y R1310 (5' CCTGGTTGTTGTTTCAGCCACTC-3')
- ✓ Cebadores L-150 (5' GGGKAGGGGCGTTCTSCCAA-3' y L-151 (5' SSSMCTATWTTACACCAACCC-3')
- ✓ Cebadores 6F GTGCACGACGTGGTGCTGGTG y R617 CGAAGAAGTCCGATACGAGGGA
- ✓ Enzimas de restricción (Hae III, Rsa I, Bcc I) marca new England Biolabs
- ✓ 100X BSA
- ✓ Buffer de digestión (suministrado por la casa comercial junto con las enzimas)
- ✓ Agua calidad biología molecular
- ✓ Marcador molecular de 100 pb
- ✓ Loading buffer
- ✓ Gota Green master mix
- ✓ Bromuro de etidio
- ✓ Agarosa

- ✓ Buffer TE
- ✓ Cámaras de electroforesis
- ✓ Transiluminador de ultravioleta
- ✓ Kit de purificación de ADN
- ✓ Kit de secuenciación (BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing y BigDye XTerminator Purification Kit)
- ✓ Platos 96 pocillos para secuenciación
- ✓ Strips

#### Base de datos de pacientes

- ✓ Los datos clínicos fueron extraídos de la base de datos que lleva la unidad clínica de investigación del ICGES donde se evaluarán la localización, tamaño y aspecto de la lesión, además del sexo y edad del paciente como también el lugar donde reside y los que visitó en meses recientes, esto para estimar dónde adquirió la infección.
- ✓ También se comparó los de datos de número y localización de lesiones de nuestra base de datos de frotis negativos con una base de datos de 128 pacientes con diagnóstico parasitológico positivo del Departamento de Investigación en Parasitología.

## **2.5 Análisis estadísticos**

- ✓ Los datos fueron depurados, consolidados, analizados y presentados a fin de obtener datos válidos sobre la infección de la LC en los pacientes que tienen frotis y cultivos negativos. Se utilizó los programas estadísticos Excel y SPSS

para la confección de gráficos, tablas y estadística básica que facilite la presentación y análisis de resultados.

- ✓ S utilizó chi cuadrado y la prueba z para realizar la comparación de de número y localización de lesiones de la base de datos de frotis negativos y positivos.

## **2.6. Procedimiento de las PCR**

Tres metodologías de PCR fueron utilizadas inicialmente para el análisis de las 123 muestras seleccionadas.

Procedimiento

PCR 1 KDNA-Viannia específico con los cebadores específicos de la especie B1 (5'-GGGGTTGGTGTAAATATAGTGG-3') y LV (5'-ATTTTTGAACGGGGTTTCTG-3') (Vergel et al., 2005).

- Se encendió el gabinete de Bioseguridad, el cual es de uso exclusivo para preparar las mezclas de reacciones para PCR
- Los reactivos se colocaron dentro de una cubeta de hielo
- Se utilizó guantes sin talco en todos los procesos y se cambiaron con frecuencia.
- Se rotuló apropiadamente los tubos para PCR de 0.2 mL con el código asignado.

- Se calculó la cantidad de todos los reactivos necesarios para el número de reacciones deseadas según la tabla 1. El volumen final de cada reacción fue de 50  $\mu$ L.

Tabla 1. Mezcla de reactivos para el PCR1

Reactivo	Volumen	Concentración Final
PCR mix	25 $\mu$ L	1X
MgCl <sub>2</sub>	2 $\mu$ L	1mM
Primer B1	3 $\mu$ L	0.6 $\mu$ M
Primer LV	3 $\mu$ L	0.6 $\mu$ M
Agua estéril	12	
Volumen Final	45 $\mu$ L + 5 $\mu$ L de la muestra	50 $\mu$ L

- Se preparó una solución “Master Mix” que contenía todos los reactivos excepto el ADN extraído. Para preparar esta solución se consideró el número de reacciones que deseaba realizar, tomando en cuenta que para cada 10 reacciones es recomendable añadir una reacción adicional para compensar por las pérdidas que ocurren durante el pipeteo.
- Para cada corrida de PCR se incluyó un control positivo correspondiente al ADN de una cepa de referencia de *L. (V.) panamensis* (MHOM/PA/71/LS-94) y un control negativo de PCR, el cual es el tubo de mezcla de reacción al que no se le agrega ADN.
- Previamente la muestra de ADN se sacó del congelador -20 °C y se dejó a temperatura ambiente hasta que se descongeló.

- Luego se agregó 5  $\mu$ L ADN a cada reacción.
- Se colocaron los tubos de PCR en el termociclador donde se seleccionó el programa de denominado “*Viannia*”.
- Las condiciones del programa fueron las siguientes:

Tabla 2. Condiciones del programa PCR1

Paso	Temperatura	Tiempo	Ciclos
<b>Desnaturalización inicial</b>	95 °C	6 min	5 ciclos
<b>Desnaturalización</b>	95 °C	30 seg	
<b>Alineamiento</b>	64.5 °C	2 min	
<b>Extensión</b>	72 °C	1min	
<b>Desnaturalización</b>	95 °C	30 seg	35 ciclos
<b>Alineamiento</b>	64 °C	1 min	
<b>Extensión</b>	72 °C	1 min	
<b>Extensión Final</b>	72 °C	10 min	
<b>Final</b>	4 °C	Indefinido	

Finalizada la amplificación se analizó 10  $\mu$ L del producto de PCR mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5 %

Se visualizó el producto de PCR en un transiluminador de ultravioleta. El tamaño amplificado esperado era de 750 pb.

PCR 2 KDNA-Género específico con los cebadores Cebadores L-150 (5' GGGKAGGGGCGTTCTSCCAA-3' y L-151 (5' SSSMCTATWTTACACCAACCC-3') (Passos et al., 1999)

- Se siguieron los 4 primeros puntos iguales al PCR1.
- Se calculó la cantidad de todos los reactivos necesarios para el número de reacciones deseadas según la siguiente tabla. El volumen final de cada reacción fue de 30  $\mu$ L.

Tabla 3. Mezcla de reactivos para PCR2

Reactivo	Volumen	Concentración Final
PCR mix	12.5 $\mu$ L	1X
Mgcl <sub>2</sub>	1 $\mu$ L	1mM
Primer 150	2.5 $\mu$ L	1 $\mu$ M
Primer 151	2.5 $\mu$ L	1 $\mu$ M
Agua estéril	6.5 $\mu$ L	
Volumen Final	25 $\mu$ L + 5 $\mu$ L de la muestra	30 $\mu$ L

- Luego se agregó los 5  $\mu$ L de ADN y se llevó al termociclador donde se eligió el programa denominado *Leishmania* 150-151 el cual tiene las siguientes condiciones:

Tabla 4. Condiciones del programa PCR2

Paso	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	94 °C	4 min	1 ciclo
Desnaturalización	94 °C	30 seg	29 ciclos
Alineamiento	50 °C	30 seg	
Extensión	72 °C	30 seg	
Extensión Final	72 °C	10 min	
Final	4 °C	Indefinido	

- Finalizada la amplificación se analizaron 10  $\mu\text{L}$  del producto de PCR mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5 %.
- Se visualizó el producto de PCR en un transiluminador de ultravioleta. El tamaño amplificado esperado era de 120 pb.

PCR 3 Hsp70-Género específico con los cebadores F25 (5' GGACGCCGGCACGATTCT 3') y R1310 (5' CCTGGTTGTTGTTTCAGCCACTC-3') y caracterización a nivel de especie Mediante PCR-RFLP (especie del Subgénero *Viannia*) (Vergel et al., 2005)

- Se siguieron los 4 puntos iguales al PCR1.
- Se calculó la cantidad de todos los reactivos necesarios para el número de reacciones deseadas según la siguiente tabla. El volumen final de cada reacción es de 50  $\mu\text{L}$ .

Tabla 5. Mezcla de reactivos para el PCR3

Reactivo	Volumen	Concentración Final
Go taq Green master Mix	25 $\mu\text{L}$	1X
Primer F25	2 $\mu\text{L}$	0.6 $\mu\text{M}$
Primer R1310	2 $\mu\text{L}$	0.6 $\mu\text{M}$
Agua estéril	16 $\mu\text{L}$	
<b>Volumen Final</b>	45 $\mu\text{L}$ + 5 $\mu\text{L}$ de la muestra	50 $\mu\text{L}$

Para cada corrida de PCR se agregaron 3 controles positivos correspondientes al ADN de cepas de referencia (códigos) *L. (V.) panamensis* (MHOM/PA/71/LS-94),

*L. (V.) guyanensis* (MHOM/BR/75/M4147) y *L. (V.) brasiliensis* (MHOM/BR/75/M2903). También se agregó un control negativo el cual consiste en la solución master mix sin la muestra de ADN.

- Luego se agregó los 5 µL de ADN y se llevó al termociclador donde se eligió el programa denominado “*hsp-70*” el cual tiene las siguientes condiciones:

- 

Tabla 6. Condiciones del programa PCR3

Paso	Temperatura	Tiempo	Ciclos
<b>Desnaturalización inicial</b>	94 °C	4 min	1 ciclo
<b>Desnaturalización</b>	94 °C	30 seg	33 ciclos
<b>Alineamiento</b>	61 °C	1 min	
<b>Extensión</b>	72 °C	3 min	
<b>Extensión Final</b>	72 °C	10 min	
<b>Final</b>	4 °C	Indefinido	

- Finalizada la amplificación se analizó 10 µL del producto de PCR mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5 %
- Se visualizó el producto de PCR en un transiluminador de ultravioleta. El tamaño amplificado esperado era de 1286 pb.
- Guardar los 40 µL restantes en -20 °C.

#### Caracterización mediante PCR-RFLP

- ✓ Se utilizó guantes sin talco

- ✓ Se rotuló apropiadamente los tubos para PCR de 0.2 mL con el código correspondiente. Se incluyó un control de digestión para las distintas especies de *Leishmania* para comparar el patrón de digestión de las mismas con la digestión de las muestras.
- ✓ Se calculó la cantidad de todos reactivos necesarios para el número de reacciones de deseadas según la tabla de cada enzima.
- ✓ Se colocó la mezcla de reacción en tubos de PCR de 0.2 mL.
- ✓ Se descongeló el amplicón del PCR, la cantidad de producto para dirigir dependió de la intensidad de la banda observada en el producto amplificado durante el PCR 3.
- ✓ El volumen final fue de 20 uL.
- ✓ Las cantidades empleadas de cada reactivo se describen en las siguientes tablas dependiendo de la enzima a utilizar.

Tabla 7. Condiciones de la Enzima Hae III

Reactivo	T° almacenamiento	Concentración Inicial	Concentración Final	Volumen a usar
Enzima Hae III	-20 °C	10 U/ uL	2 U	0.2 uL
Buffer (NE Buffer 2)	-20 °C	10X	1X	2 uL
ADN amplificado	-20 °C			2-15 uL
Agua calidad biología molecular	4 °C			Varía según ADN amplificado agregado

Tabla 8. Condiciones de la Enzima BccI

Reactivo	T° almacenamiento	Concentración Inicial	Concentración Final	Volumen a usar
Enzima Bcc I	-20 °C	10 U/ uL	2 U	0.2 uL
Cut Smart Buffer	-20 °C	10X	1X	2 uL
BSA	-20 °C	100X	1 X	0.2 uL
ADN amplificado	-20 °C			10-14 uL
Agua calidad biología molecular	4 °C			Varía según ADN amplificado agregado

Esta enzima se usó si el patrón obtenido con *Hae III* coincide con el grupo de *L. panamensis* y *L. guyanensis*. La enzima Bcc I distingue *L. panamensis* de *L. guyanensis*.

Tabla 9. Condiciones de la Enzima Rsa I

Reactivo	T° almacenamiento	Concentración Inicial	Concentración Final	Volumen a usar
Enzima Rsa I	-20 °C	10 U/ uL	5 U	1 uL
Buffer de enzima Rsa I	-20 °C	10X	1X	2 uL
BSA	-20 °C	100X	1 X	0.2 uL
ADN amplificado	-20 °C			10-14 uL
Agua calidad biología molecular	4 °C			Varía según ADN amplificado agregado

Esta enzima se usó si el patrón con Hae III coincide con el grupo de *L. brasiliensis* y *L. peruviana*. Esta enzima distingue *L. brasiliensis*/*L. naiffi* de *L. peruviana*.

Se incubó en el tubo de 0.2 mL a 37 °C, durante toda la noche.

Finalizada la incubación se colocó el contenido total de la mezcla en los pocillos de un gel de agarosa al 2% en 0.5 X TBE y se corrió una electroforesis.

Se visualizó los patrones de digestión en un transiluminador de ultravioleta y se verificó con los controles de la digestión.

#### PCR Tiempo Real (QPCR)

La qPCR se configuró de la siguiente manera: Las reacciones se llevaron a cabo en volumen total de 12 µL, que contiene 2 µL de la muestra, 6.0 µL de taqman, 1.0 µL de los primers 18 S ADN ribosomal (5'-AAG TGC TTT CCC ATC GCA ACT- 3', 5'-GAC GCA CTA AAC CCC TCC AA- 3') y 0.25 µL de la sonda FAM (5'-6FAM CGG TTC GGT GTG TGG CGC C – NFQ) y 1.75 µL de agua calidad molecular.

Se utilizó un termociclador QuantStudio 5 (Applied Biosystems) con las siguientes condiciones: desnaturalización 95 °C durante 10 minutos, seguido de 44 ciclos de desnaturalización de 95 °C durante 15 segundos y finalmente 60 °C durante 50 segundos para la detección de FAM.

#### Hsp-70 análisis de secuenciación y análisis filogenético

- Los productos amplificados con hsp70 se sometieron a una electroforesis en geles de agarosa al 1.5% en 1X TBE (89 mM de trisborato, 2 mM de EDTA [pH 8.3]).

- La banda del producto se cortó el gel de agarosa y se purificó utilizando el kit de extracción de gel de Qiaquick (Qiagen, CA, EE. UU.) siguiendo las instrucciones del fabricante.
- Se cuantificó el ADN purificado
- Se prepararon los primers F25, 6F, R1310, R617 a una concentración de 3,2  $\mu\text{L}$  para la reacción de trabajo.

$$V1C1=V2C2$$

$$100(5) = V2(3.2)$$

$$500/3.2= V2$$

$$V2=156.25$$

Se realizaron 3 alícuotas de 50  $\mu\text{L}$ . Agregando 151.25  $\mu\text{L}$  de agua grado molecular y 5  $\mu\text{L}$  de cada primer

- Se trabajó la concentración de ADN template de 20 a 40 ng
- Se trabajó con la siguiente tabla de reacción

Tabla 10. Reacción utilizada para la secuenciación

Reactivo	RX (1/8X) 20 $\mu\text{L}$
<b>BDT</b>	1
<b>5X Seq buffer</b>	3.5
<b>Primer (3.2 <math>\mu\text{M}</math>)</b>	1
<b>Template</b>	*
<b>Water</b>	a 20

\*El volumen del template depende su concentración

Una vez listo los reactivos, se procedió con el siguiente orden:

- Los reactivos se colocaron en frío y tapados de la luz.
- Se limpió las cabinas de trabajo con clorox al 5% y alcohol al 70%.
- Se rotularon los tubos para las alícuotas del Big Dye Terminator y las diluciones de las muestras concentradas.
- Se preparó la mezcla según la tabla 10 para el mix.
- Se sirvió el mix en los pocillos de la placa.
- Luego se prepara las diluciones de las muestras, solo las que están muy concentradas.
- Se sirvió las muestras en la placa.
- Se coloca en el termociclador (MiniAmp Thermal Cycler applied biosystems) con las siguientes condiciones:

Tabla 11. Condiciones para el ciclado de secuenciación

Temperatura	Tiempo	Ciclos
95 °C	5 min	1 ciclo
95 °C	30 seg	40 ciclos
** 53 °C	10 seg	
60 °C	4 min	
4 °C	∞	

\*\* La temperatura de alineamiento depende directamente de la longitud y composición de los primers, de la siguiente manera:

$$\sum 2 (A+T) + \sum 3 (C+G)$$

$$F25 = 2 (A+T) + 3 (C+G) = 2(3+4) + 3(6+7) = 53$$

$$R1310 = 2 (A+T) + 3 (C+G) = 2(2+8) + 3(6+5) = 53$$

$$6F = 2 (A+T) + 3 (C+G) = 2(2+5) + 3(4+10) = 56$$

$$R617 = 2 (A+T) + 3 (C+G) = 2(8+2) + 3(4+8) = 56$$

La temperatura de alineamiento elegida fue de 53 °C.

- ✓ Luego se purificó con BigDye XTerminator Purification Kit, siguiendo las instrucciones del fabricante.
- ✓ Se llevó al servicio de secuenciación del DIDETEC-ICGES para realizar un análisis por electroforesis capilar.
- ✓ Luego cada cromatograma fue editado con el programa Sequencher 4.1.4 (v. 4.1.4; Gene Codes Corporation, Ann Arbor, MI, EE. UU.).
- ✓ Las secuencias se alinearon con MEGA X.
- ✓ Las distancias de las secuencias de nucleótidos se estimaron con el modelo de parámetro Kimura-3 y 500 réplicas de bootstrap para construir el árbol filogenético mediante el método Maximum Likelihood utilizando el paquete de software MEGA X.
- ✓ Para construir el árbol se utilizaron secuencias obtenidas de GenBank (Tabla 12)

Tabla 12. Secuencias obtenidas del Genbank utilizadas como referencia

ID	ESPECIE	NÚMERO DE ACCESO
PAN212	<i>Leishmania sp.1</i>	MT469990
PAN216	<i>Leishmania sp.1</i>	MT469991
PAN218	<i>Leishmania sp.1</i>	MT501513
MHOM-ET-89-GERE	<i>L. aethiopica</i>	FN395018
MHOM-ET-72-L100	<i>L. aethiopica</i>	FN395021
MHOM-GF-2004-GAE1	<i>L. (V.) guyanensis</i>	HF586406
MHOM-BR-75-M4177	<i>L. (V.) guyanensis</i>	EU599093
MHOM-BR-07-029-ZAV	<i>L. (V.) guyanensis</i>	FN395053
MHOM-FR-78-LEM75	<i>L. infantum</i>	MN728742
MHOM-PT-94-IMT202	<i>L. infantum</i>	HF586408

<b>MCOE-BR-1983-IM1367</b>	<i>L. lainsoni</i>	GU071182
<b>MHOM-BR-2002-RBO027-P</b>	<i>L. lainsoni</i>	GU071179
<b>MHOM-SD-2003-LCB33</b>	<i>L. major</i>	HF586346
<b>MHOM-AF--AMC153</b>	<i>L. major</i>	HF586391
<b>MHOM-GF-2002-LAV003</b>	<i>L. amazonensis</i>	LN907831
<b>MHOM-CO-82-CELIS</b>	<i>L. amazonensis</i>	HF586353
<b>MHOM-BZ-82-BEL21</b>	<i>L. mexicana</i>	LN907841
<b>MHOM-EC-87-EC103-CL8</b>	<i>L. mexicana</i>	LN907842
<b>ISQU-BR-1994-IM3936</b>	<i>L. naiffi</i>	GU071185
<b>IAYR-B5-86-EO337</b>	<i>L. naiffi</i>	MG029126
<b>MCHO-PA-00-M4039</b>	<i>L. (V.) panamensis</i>	FN395055
<b>MHOM-PA-71-LS94</b>	<i>L. (V.) panamensis</i>	EU599094
<b>MHOM-PA-P20</b>	<i>L. (V.) panamensis</i>	HF586364
<b>Lsp_H2</b>	<i>Leishmania sp.</i>	KX061896
<b>MHOM-CN-85-GS4</b>	<i>Leishmania sp.</i>	KJ667088
<b>MHOM-CN-89-GS5</b>	<i>Leishmania sp.</i>	KJ667090
<b>MHOM-CN-83-GS2</b>	<i>Leishmania sp.</i>	KJ667093
<b>AY423868</b>	<i>L. tarentolae</i>	AY423868
<b>MHOM-KE-81-NLB_030B</b>	<i>L. tropica</i>	FN395026
<b>MHOM-IN-79-DD7</b>	<i>L. tropica</i>	FN395025
<b>IAND-CN-90-KXG-R</b>	<i>L. turanica</i>	JX021438
<b>MRHO-SU-95-T-9551R</b>	<i>L. turanica</i>	HF586356
<b>MRHO-CN-90-KXG-57</b>	<i>L. turanica</i>	JX021441
<b>MHOM-BO--CUM68</b>	<i>L. braziliensis</i>	FR872758
<b>MHOM-PE-02-LH2182</b>	<i>L. braziliensis</i>	FN395040
<b>MHOM-PE-05-WR_2771</b>	<i>L. peruviana</i>	KX573935
<b>MHOM-PE-03-LH2439</b>	<i>L. peruviana</i>	FN395045
<b>MHOM-BR-1975-M2903</b>	<i>L. braziliensis</i>	MH745185
<b>MHOM-BO--CUM663</b>	<i>L. braziliensis outlier</i>	FR872761
<b>MHOM-PE--LH3851</b>	<i>L. braziliensis outlier</i>	FR872763
<b>MCEB-BR-1984-M8408</b>	<i>L. shawi</i>	GU071177
<b>IWHI-BR-1985-IM2326</b>	<i>L. shawi</i>	GU071175

# **Capítulo III: Resultados**

## Resultados

### Características Clínicas

En esta investigación se evaluaron también los datos clínico-epidemiológicos de cada paciente obtenidos por la Unidad de Diagnóstico, Investigación Clínica y Medicina Tropical del ICGES, penosamente en algunos casos la información suministrada en la respectiva hoja epidemiológica no estaba completa.

Se obtuvieron 122 datos referente a la edad del grupo estudiado, el grupo de 0- 10 años fue el más frecuente con un 23.77 % (29/122), seguido por el rango de 21-30 años con 22.95% (28/122) (Tabla 13).

Tabla 13. Edades de pacientes con frotis negativos . N= 122 datos

Rango de Edades	Cantidad	Porcentaje
<b>0-10</b>	29	23.77%
<b>11-20</b>	18	14.75%
<b>21-30</b>	28	22.95%
<b>31-40</b>	17	13.93%
<b>41-50</b>	8	6.56%
<b>51-60</b>	9	7.38%
<b>61-70</b>	11	9.02%
<b>71-80</b>	2	1.64%

En cuanto a la variable sexo se analizaron 123 resultados, 65% (80/123) correspondieron al sexo masculinos y 35 % (43/123) al sexo Femenino.

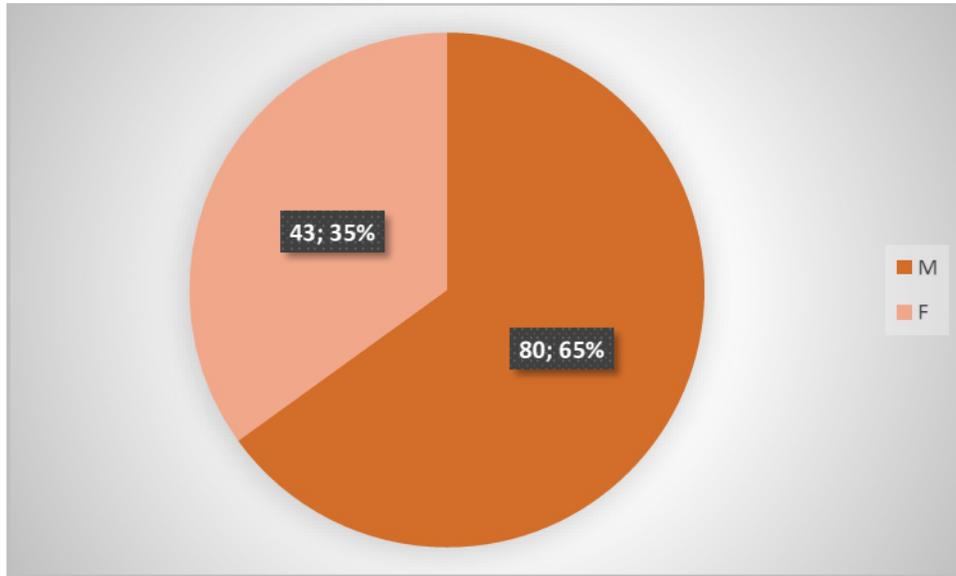


Gráfico 1. Sexo del grupo estudiado. N= 123 datos

En el grupo estudiado se analizó la cantidad de lesiones y su localización, 72.92% (70/96) contaban con sola 1 lesión, 11.46% (11/96) con dos lesiones y 15.63% (15/96) con más de tres lesiones (Tabla 14).

Tabla 14. Número de lesiones en el grupo de frotis Negativos. N=96

Número de Lesiones N=96		
# de lesiones	Cantidad	Porcentaje
1 lesión	70	72.92%
2 lesiones	11	11.46%
3 a 5 lesiones	13	13.54%
más de 5 lesiones	2	2.08%
<b>Total</b>	96	100.00%

El sitio anatómico donde se localizaban las lesiones fueron las piernas con un 52.08% (50/96), seguido de los brazos con 44.79% (43/96) (Tabla 15).

Tabla 15. Localización de lesiones de pacientes con frotis positivos. N=96

Localización de lesiones		
Sitio Anatómico	Cantidad	Porcentaje
Cara /Cuello	14	14.58%
Brazos	42	43.75%
Abdomen	2	2.08%
Espalda	6	6.25%
Piernas	50	52.08%
<b>Total</b>	<b>96</b>	<b>100.00%</b>

En las piernas del grupo estudiado predominaba solo una lesión 84% (42/50), al igual que en los brazos 79.07% (34/43), pero también se mostró 16.25% (7/43) con más de tres lesiones en el brazo (Tabla 16).

Tabla 16. Número de lesiones en pierna y brazos.

PIERNAS N=50			BRAZOS N=43		
# De lesiones	Cantidad	Porcentaje	# De lesiones	Cantidad	Porcentaje
<b>1 lesión</b>	42	84.00%	<b>1 lesión</b>	34	79.07%
<b>2 lesiones</b>	4	8.00%	<b>2 lesiones</b>	2	4.65%
<b>3 a 5 lesiones</b>	4	8.00%	<b>3 a 5 lesiones</b>	5	11.63%
<b>total</b>	50		<b>más de 5 lesiones</b>	2	4.65%
			<b>total</b>	43	

En cuanto a la ubicación geográfica de los casos, 46.34% (57/123) de los pacientes estudiados residían en la provincia de Panamá, 27.64% (34/123) en Panamá Oeste, seguido de Colón 27.64% (20/123) (Gráfico 2). En la provincia de Panamá sobresale el distrito de Panamá 57.41% (31/54) y San Miguelito con 14.81% (8/54). En cuanto a la Provincia de Panamá Oeste destaca Capira y la Chorrera con 40.63% (13/32) y 21.88 % (7/32) respectivamente (Tabla 17).

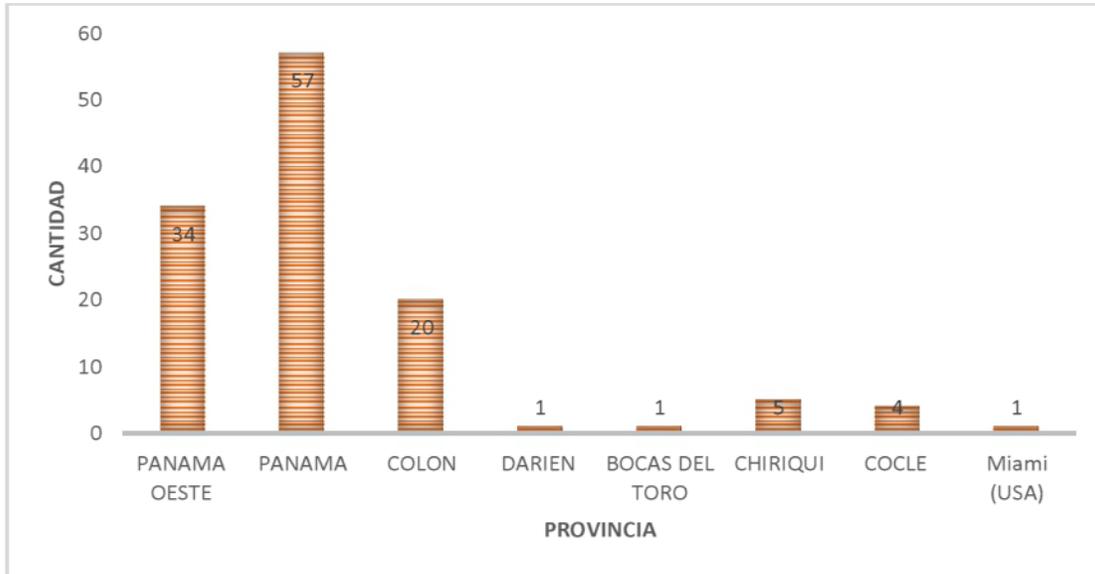


Gráfico 2. Provincia de residencia del grupo estudiado. N= 123

Tabla 17. Distritos de las provincias con mayores casos.

PANAMA			PANAMA OESTE		
Distrito	Cantidad	Porcentaje	Distrito	Cantidad	Porcentaje
<b>Panamá</b>	31	57.41%	<b>Capira</b>	13	40.63%
<b>San Miguelito</b>	8	14.81%	<b>La Chorrera</b>	7	21.88%
<b>Chepo</b>	5	9.26%	<b>Arraiján</b>	6	18.75%
<b>24 de diciembre</b>	6	11.11%	<b>Chame</b>	5	15.63%
<b>Torrijos Carter</b>	1	1.85%	<b>San Carlos</b>	1	3.13%
<b>Mañanitas</b>	1	1.85%	<b>Total</b>	32	
<b>Tocumen</b>	1	1.85%			
<b>Bethania</b>	1	1.85%			
<b>Total</b>	54				

En cuanto a la provincia que declararon que habían visitado tres meses antes a su consulta con la Unidad Clínica de Investigación fue Panamá Oeste con 29.27 % (36/123), Panamá 22.76% (28/123) y Colón con 17.89% (22/123) (Tabla 18).

Tabla 18. Provincia visitada en los tres últimos meses antes de su consulta con la Unidad Clínica de Investigación. N=123.

Provincia	Cantidad	Porcentaje
LOS SANTOS	2	1.63%
COLON	22	17.89%
COCLE	11	8.94%
PANAMA OESTE	36	29.27%
PANAMA	28	22.76%
BOCAS DEL TORO	2	1.63%
DARIEN	9	7.32%
VERAGUAS	2	1.63%
CHIRIQUI	1	0.81%
COMARCA GUNA YALA	2	1.63%
NINGUNO	8	6.50%
<b>TOTAL</b>	<b>123</b>	

En el grupo estudiado con frotis positivos se analizó la cantidad de lesiones y su localización, 50.78 (65/128) contaban con sola 1 lesión, 19.53% (25/128) con dos lesiones y 29.68% (38/128) con más de tres lesiones (Tabla 19).

Tabla 19. Número de lesiones de pacientes con frotis positivo.

Número de Lesiones N=128		
# De lesiones	Cantidad	Porcentaje
1 lesión	65	50.78%
2 lesiones	25	19.53%
3 a 5 lesiones	30	23.44%
más de 5 lesiones	8	6.25%
<b>total</b>	<b>128</b>	<b>100.00%</b>

El sitio anatómico donde se localizaban las lesiones con frotis positivos fueron las piernas con un 50.00 % (64/128), seguido de los brazos con 39.06% (50/128) (Tabla 20).

Tabla 20. Localización de lesiones de pacientes con frotis positivos

Localización de lesiones		
Sitio Anatómico	Cantidad	Porcentaje
Cara /Cuello	35	27.34%
Brazos	50	39.06%
Abdomen	6	4.69%
Espalda	8	6.25%
Piernas	64	50.00%
<b>Total</b>	<b>128</b>	<b>100.00%</b>

En las piernas del grupo de pacientes con frotis positivos predominaba solo una lesión 51.56% (33/64), al igual que en los brazos 62.00% (31/50), pero también se mostró más de dos lesiones alrededor del 20% en brazos y en piernas (Tabla 21).

Tabla 21. Número de lesiones en pierna y brazos en pacientes con frotis positivos

PIERNAS N=64			BRAZOS N=50		
# De lesiones	Cantidad	Porcentaje	# De lesiones	Cantidad	Porcentaje
1 lesión	33	51.56%	1 lesión	31	62.00%
2 lesiones	17	26.56%	2 lesiones	10	20.00%
3 a 5 lesiones	13	20.31%	3 a 5 lesiones	8	16.00%
más de 5 lesiones	1	1.56%	más de 5 lesiones	1	2.00%
<b>total</b>	<b>64</b>	<b>100.00%</b>	<b>total</b>	<b>50</b>	<b>100.00%</b>

Se realizó la comparación de números y localización de lesiones en pacientes con frotis negativos y negativos (Tabla 22 y 23).

Tabla 22. Comparación de número de lesiones entre pacientes con frotis negativos y positivos

Número de Lesiones	F-	F+		
# de lesiones	Cantidad	Cantidad	Z score	p-value
1 lesión	70	65	3.3504	0.0004
2 lesiones	11	25	-1.628	0.05155
3 a 5 lesiones	13	30	-1.861	0.03144
más de 5 lesiones	2	8	-1.4943	0.06811
<b>Total</b>	96	128		

Se aplicó X2 para comparación por número de lesiones (X2, df: 11.62, 3, p=0.0088). Se aplicó la prueba Z para comparar las proporciones por cada categoría de número de lesiones.

Tabla 23. Comparación de localización de lesiones entre pacientes con frotis negativos y positivos

Localización de lesiones	F-	F+		
Sitio Anatómico	Cantidad	Cantidad	Z score	p-value
Cara /Cuello	14	35	-2.2862	0.01101
Brazos	43	50	0.8612	0.19489
Abdomen	2	6	-1.0393	0.14917
Espalda	6	8	0	0.5
Piernas	50	64	0.3087	0.37828
<b>Total</b>	96	128		

Se aplicó X2 para comparación por número de lesiones (X2, df: 5.405, 4, p=0.1482)

Se aplicó la prueba Z para comparar las proporciones por cada categoría de número de lesiones.

Inicialmente se evaluó la sensibilidad de las tres metodologías de PCR utilizadas en el diagnóstico de la LC: KDNA-*Vianna* específico, KDNA-Género específico y Hsp-70 Género específico, cuyos resultados se muestran en la figura 8. De las 123 muestras analizadas, todas resultaron positivas por el PCR 1, **93 (76%)** por el PCR 2 y **82 (67%)** por el PCR 3 (Figura 9).

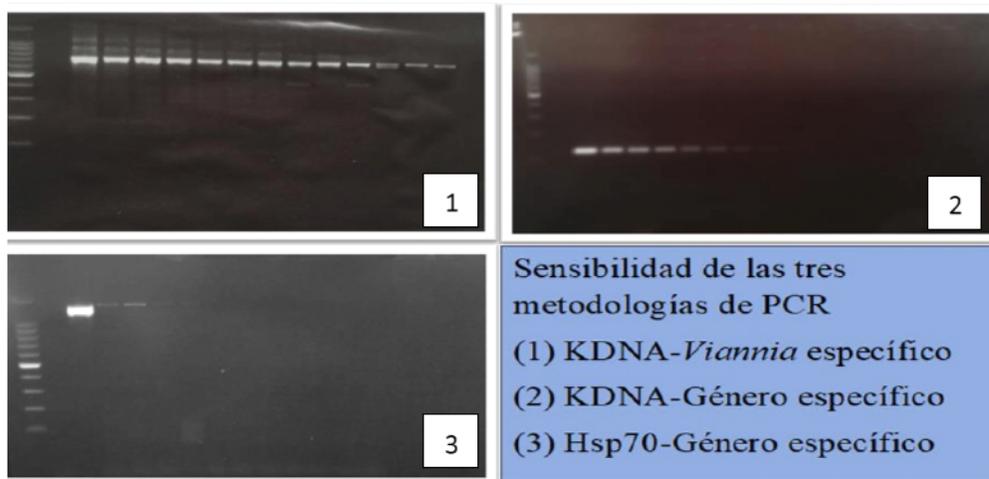


Figura 3. Sensibilidad de las tres pruebas de PCR evaluadas. PCR (1) puede detectar 0.0098 pg de ADN de *L. V. panamensis*, PCR (2) 0.015 pg y PCR (3) 0.25 pg.

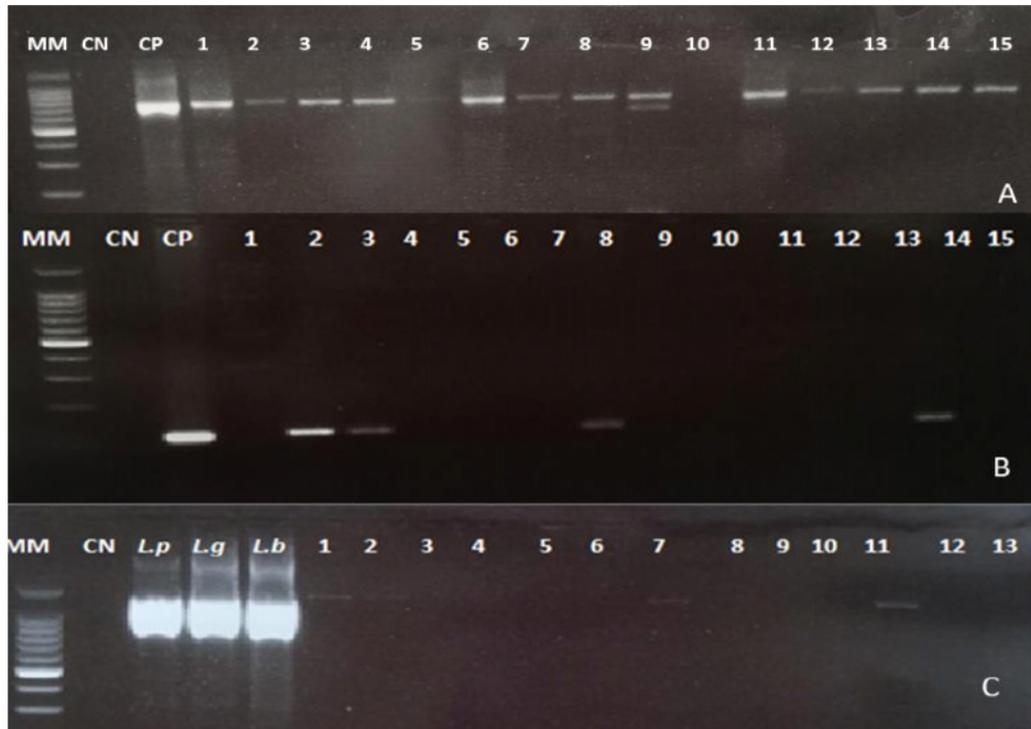


Figura 4. Resultados obtenidos con los tres análisis de PCR. (A) KDNA-Viannia específico (B) KDNA-Género específico y (C) Hsp70-Género específico.

De las 82 muestras analizadas se pudieron caracterizar mediante RFLP Hsp70 a nivel de especie 69 muestras (84%), 41 correspondieron a *L. (V.) panamensis* y 28 *L. (V.) guyanensis*.



Figura 5. PCR-RFLP Hsp-70 usando las enzimas de restricción Hae III (A) y Bcl I (B) en muestras de lesiones de LC con frotis negativos. Pan- Leishmania panamensis, guy- Leishmania guyanensis, bra- Leishmania brasiliensis.

Sólo se pudieron analizar por qPCR 121 muestras ya que la cantidad de ADN fue insuficiente en algunas muestras. Los análisis con qPCR 18S ribosomal mostraron una positividad de 94/121 (77.6%).

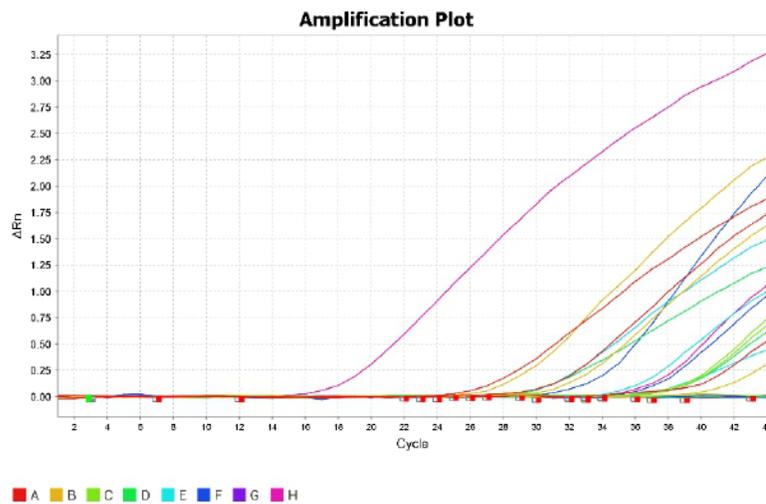


Figura 6. Gráfica amplificación lineal de las muestras con frotis (-), microscopía

Tabla 24. Resultados de los PCR y de la secuenciación a todas las muestras que fueron empleadas.

Muestra	PCR1	PCR2	PCR3	Caracterización RFLP	PCR4 (qPCR)	ct	Secuenciación
<b>C-15-169</b>	+	+	+	<i>L. (V.) panamensis</i>	+	30	<i>L. (V.) panamensis</i>
<b>C-16-01</b>	+	+	+	<i>L. (V.) panamensis</i>	+	26	<i>L. (V.) panamensis</i>
<b>C-16-14</b>	+	+	+	<i>L. (V.) guyanensis</i>	+	29	<i>Leishmania</i> sp.1
<b>C-16-16</b>	+	+	+	<i>L. (V.) guyanensis</i>	+	25	<i>Leishmania</i> sp.1
<b>C-16-54</b>	+	+	+	<i>L. (V.) guyanensis</i>	+	20	<i>Leishmania</i> sp.1
<b>C-16-70</b>	+	+	+	<i>L. (V.) guyanensis</i>	+	27	<i>Leishmania</i> sp.1
<b>C-16-73</b>	+	+	+	<i>L. (V.) guyanensis</i>	+	26	<i>Leishmania</i> sp.1/ <i>L. (V.) guyanensis</i> *
<b>C-16-93</b>	+	+	+	<i>L. (V.) panamensis</i>	+	32	<i>Leishmania</i> sp.1/ <i>L. (V.) guyanensis</i> *
<b>C-16-108</b>	+	+	+	<i>L. (V.) guyanensis</i>	+	29	<i>Leishmania</i> sp.1/ <i>L. (V.) guyanensis</i> *
<b>C-16-109</b>	+	+	+	<i>L. (V.) guyanensis</i>	+	32	<i>Leishmania</i> sp.1/ <i>L. (V.) guyanensis</i> *
<b>C-16-122</b>	+	+	+	<i>L. (V.) panamensis</i>	+	30	<i>L. (V.) panamensis</i>
<b>C-17-24</b>	+	+	+	<i>L. (V.) panamensis</i>	+	21	<i>L. (V.) panamensis</i>
<b>C-17-39</b>	+	+	+	<i>L. (V.) guyanensis</i>	+	28	<i>Leishmania</i> sp.1
<b>C-17-40</b>	+	+	+	<i>L. (V.) panamensis</i>	+	23	<i>L. (V.) panamensis</i>
<b>C-17-49</b>	+	+	+	<i>L. (V.) guyanensis</i>	+	31	<i>Leishmania</i> sp.1
<b>C-17-53</b>	+	+	+	<i>L. (V.) panamensis</i>	+	27	<i>L. (V.) panamensis</i>

<b>C-17-91</b>	+	+	+	<i>L. (V.) panamensis</i>	+	28	<i>L. (V.) panamensis</i>
<b>C-17-97</b>	+	+	+	<i>L. (V.) panamensis</i>	+	26	<i>L. (V.) panamensis</i>
<b>C-17-101</b>	+	+	+	<i>L. (V.) guyanensis</i>	no ADN		<i>Leishmania</i> sp.1
<b>C-17-103</b>	+	+	+	<i>L. (V.) panamensis</i>	+	29	<i>L. (V.) panamensis</i>
<b>C-17-115</b>	+	+	+	<i>L. (V.) panamensis</i>	+	27	<i>L. (V.) panamensis</i>
<b>C-17-116</b>	+	+	+	<i>L. (V.) panamensis</i>	+	26	<i>L. (V.) panamensis</i>
<b>C-17-120</b>	+	+	+	<i>L. (V.) panamensis</i>	+	27	<i>L. (V.) panamensis</i>
<b>C-18-29</b>	+	+	+	<i>L. (V.) guyanensis</i>	+	27	<i>Leishmania</i> sp.1
<b>C-18-33</b>	+	+	+	<i>L. (V.) panamensis</i>	+	26	<i>L. (V.) panamensis</i>
<b>C-18-49</b>	+	+	+	<i>L. (V.) guyanensis</i>	+	23	<i>Leishmania</i> sp.1
<b>C-18-56</b>	+	+	+	<i>L. (V.) guyanensis</i>	+	25	<i>Leishmania</i> sp.1/ <i>L. (V.) guyanensis</i> *
<b>C-18-58</b>	+	+	+	<i>L. (V.) panamensis</i>	+	24	<i>L. (V.) panamensis</i>
<b>C-18-61</b>	+	+	+	<i>L. (V.) panamensis</i>	+	33	<i>L. (V.) panamensis</i>
<b>C-18-278</b>	+	+	+	<i>L. (V.) guyanensis</i>	+	29	<i>Leishmania</i> sp.1
<b>C-18-287</b>	+	+	+	<i>L. (V.) panamensis</i>	+	27	<i>L. (V.) panamensis</i>

<b>C-18-289</b>	+	+	+	<i>L. (V.) guyanensis</i>	+	30	<i>Leishmania</i> sp.1/ <i>L. (V.) guyanensis</i> *
<b>C-18-311</b>	+	+	+	<i>L. (V.) panamensis</i>	+	31	<i>L. (V.) panamensis</i>
<b>C-18-343</b>	+	+	+	<i>L. (V.) panamensis</i>	+	30	<i>L. (V.) panamensis</i>
<b>C-18-345</b>	+	+	+	<i>L. (V.) panamensis</i>	+	30	<i>L. (V.) panamensis</i>
<b>C-18-350</b>	+	+	+	<i>L. (V.) panamensis</i>	+	32	<i>L. (V.) panamensis</i>
<b>C-18-391</b>	+	+	+	<i>L. (V.) guyanensis</i>	+	29	<i>Leishmania</i> sp.1
<b>C-19-02</b>	+	+	+	<i>L. (V.) panamensis</i>	+	36	<i>L. (V.) panamensis</i>

En cuanto a los resultados de la secuenciación, se pudieron obtener 38 secuencias, confirmando por análisis filogenético, que 21 de ellas correspondía con *L. (V.) panamensis*. Mientras que de 17 que fueron caracterizadas originalmente por RFLP como *L. (V.) guyanensis*, 11 fueron clasificadas filogenéticamente como del grupo *Leishmania* sp.1. Las restantes 6 muestras no pudieron ubicarse filogenéticamente, solo que pertenecían al subgénero *Viannia*.

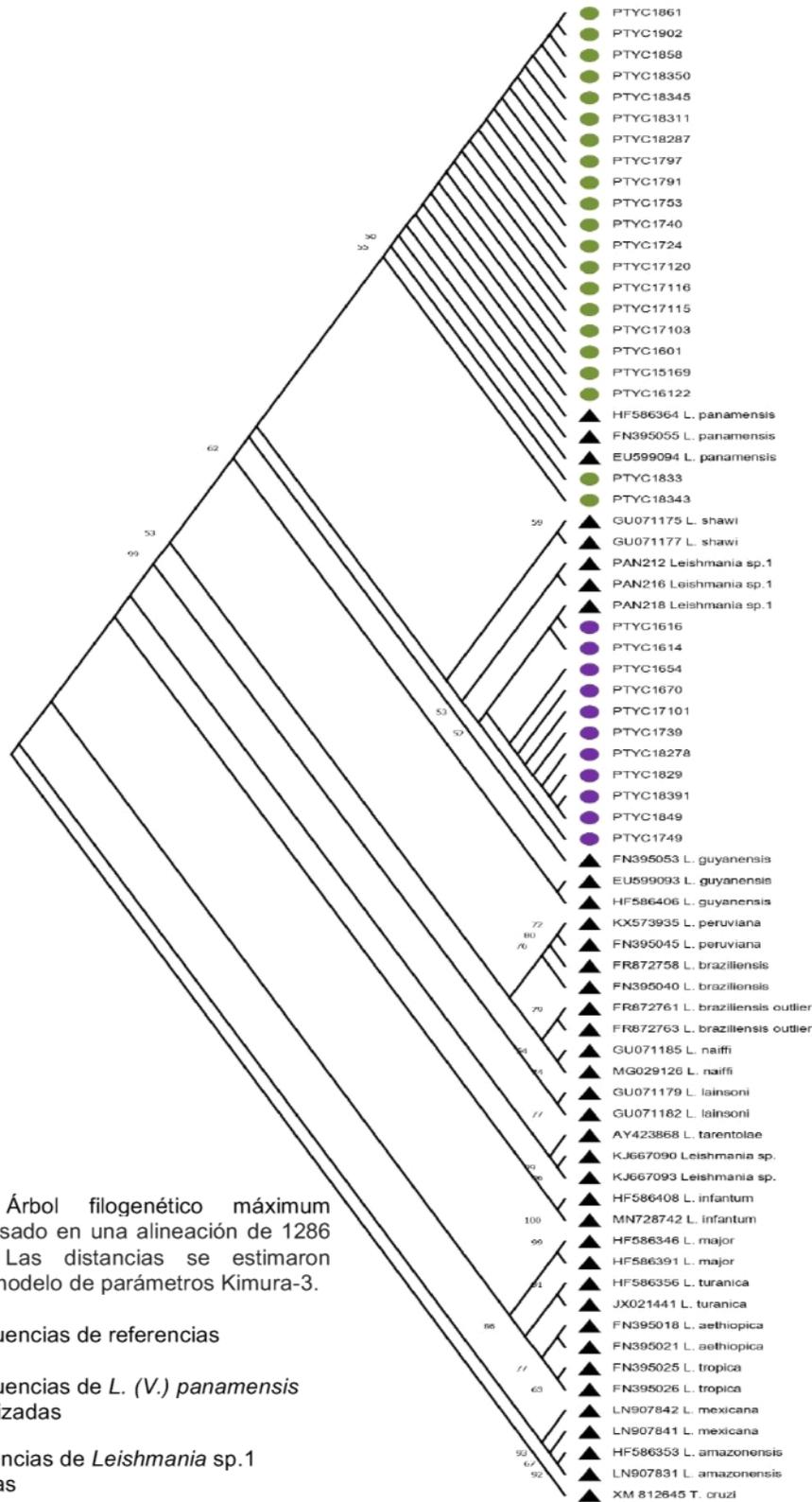


Figura 7. Árbol filogenético máximo Likelihood basado en una alineación de 1286 nucleótidos. Las distancias se estimaron utilizando el modelo de parámetros Kimura-3.

- ▲ Secuencias de referencias
- Secuencias de *L. (V.) panamensis* analizadas
- secuencias de *Leishmania* sp.1 analizadas

# **Capítulo IV:**

# **Discusión**

## Discusión

La LC es una enfermedad parasitaria que induce un espectro variable de síndromes clínicos que afectan la piel y las mucosas (OPS, 2019). El diagnóstico oportuno y la caracterización del agente causal de esta parasitosis es indispensable para la implementación del tratamiento y monitoreo de la evolución clínica del paciente (Barçante et al., 2019).

En nuestro estudio se encontró que la LC con baja carga parasitaria afecta a todos los grupos etarios, viéndose más afectados los grupos de 0 a 10 años (23.7%) y de 21 a 30 años (22.9%). Estos resultados concuerdan con otros reportes sobre la distribución etaria de la LC en Panamá (Salud, 2021; Sosa et al., 2019).

En cuanto al género de estos pacientes con lesiones de baja carga parasitaria, se encontró que el 65% fue masculino y el 35 % femenino, esto nuevamente concuerda con lo reportado de manera general para los casos de LC en Panamá (OPS/OMS 2019).

Panamá es un país endémico para LC (Salud, 2021), en nuestro panel de estudio, la mayoría de las muestras correspondían a pacientes procedentes de la provincia de Panamá (57%), seguido de Panamá Oeste (34 %) y Colón (30%) (Gráfico 2). No obstante, esta distribución representa probablemente un sesgo de muestreo ya que estas son las provincias más cercas a la Unidad de Diagnóstico, Investigación Clínica y Medicina Tropical del ICGES donde fueron tomadas las muestras.

El 72.9 % de estos pacientes con lesiones de baja carga parasitaria presentaban una sola lesión localizada (Tabla 15), representado la forma clínica más común de

LC: LCL (Grangeiro Júnior et al., 2018). Probablemente los pacientes que presentan más de dos lesiones tienen una mayor carga parasitaria lo que favorece la movilización del parásito a través de la sangre o de los vasos linfáticos (OPS, 2019).

Al comparar nuestros resultados con el número de lesiones encontradas en los pacientes con frotis positivos, se encontró que un 49.2% de estos últimos tenían más de dos lesiones, un porcentaje más alto comparado con las lesiones en pacientes con baja carga parasitaria (26%) (Tabla 22). En cuanto a la localización de las lesiones no hubo diferencia significativa entre las lesiones con diagnóstico parasitológico negativo y aquellas en donde fue posible la visualización del parásito. No obstante, ambas condiciones presentaron en las extremidades inferiores un mayor número de lesiones, seguido por las encontradas en las extremidades superiores. (Tabla 23). Sin embargo, se encontró que el 27.4% de los pacientes con frotis positivos presentaban lesiones en la cara/cuello, una condición aparentemente poco frecuente para lesiones con baja carga parasitaria según nuestros resultados.

Las pruebas de diagnóstico parasitológico no siempre son concluyentes con el diagnóstico clínico de la LC (Faber et al., 2003). En realidad, los métodos utilizados para realizar el diagnóstico en áreas endémicas muestran una baja sensibilidad, en parte debido a que en muchas ocasiones los laboratorios clínicos disponibles no cuentan con una infraestructura adecuada, a la utilización de una sola metodología diagnóstica y a la frecuente inexperiencia del personal encargado (Çulha et al., 2019; Espir et al., 2016). Si bien el examen directo para la detección de parásitos en frotis teñidos tiene una sensibilidad no mayor al 65%, esta metodología ha

demostrado ser una prueba útil, relativamente rápida y económica para el diagnóstico de la mayoría de los casos de LC (Espir et al., 2016).

Hasta el día de hoy, no se llega a un consenso sobre un “Gold estándar” para el diagnóstico de la LC, esto a pesar que las metodologías moleculares han sido reportadas con una alta sensibilidad en la mayoría de los estudios (Apaza-Castillo et al., 2020; Espir et al., 2016; Faber et al., 2003). En general, los métodos moleculares son una alternativa para la detección temprana de pacientes infectados con parásitos del género *Leishmania*, lo que ayuda a una implementación rápida del tratamiento, así como también a la caracterización de las especies de parásitos involucradas (de Paiva-Cavalcanti et al., 2015). Sin embargo, los análisis moleculares tienen como principal desventaja sus elevados costos, lo que los hace difíciles de desarrollar en regiones endémicas donde por lo general los recursos económicos son limitados.

Con relación al diagnóstico de la LC, es necesario también considerar que conforme la infección progresa, la carga parasitaria de las lesiones tiende a disminuir, por lo que el diagnóstico parasitológico se complica en las lesiones crónicas (Pereira et al., 2017). Además, el examen directo se afecta por factores como la toma de muestra, tinción utilizada y experticia del técnico. En base a este panorama, numerosos estudios argumentan que los métodos moleculares representan una alternativa confiable, específica y sensible que deben formar parte del algoritmo diagnóstico de la LC en las regiones endémicas de América Latina (Apaza-Castillo et al., 2020; Çulha et al., 2019; Jaramillo-Antillón et al., 2018).

Al respecto, si bien las muestras utilizadas en el presente estudio originalmente presentaron un examen directo negativo, las mismas fueron posteriormente analizadas por diferentes métodos moleculares. Debemos destacar que, en la Unidad de Diagnóstico, Investigación Clínica y Medicina Tropical del ICGES, las muestras obtenidas para frotis, cultivo y PCR, no son tomadas del mismo lugar en una determinada lesión, o en la misma lesión, ya que existen casos donde el paciente puede presentar lesiones múltiples. Esto puede ser un factor, que sumado a la cronicidad de la lesiones, a la experiencia del técnico y al tipo de tinción utilizada, pueden llevar a un resultado parasitológico negativo (Asfaram et al., 2019; Augusto, 2000).

La metodología de KDNA-Viannia específico resultó ser la técnica más sensible en nuestro estudio, esto al ser comparado con las otras metodologías de PCR evaluadas. De acuerdo con nuestros resultados, la PCR de KDNA tiene una alta sensibilidad para detectar parásitos de *Leishmania* (bajo nuestras condiciones de laboratorio puede detectar hasta 0.0098 pg. de ADN). Los controles no mostraron contaminación por lo tanto se confirmó que todas estas muestras con examen directo negativo, correspondían a lesiones positivas con cargas parasitarias bajas (Bensoussan et al., 2006).

A pesar que la PCR2, es también una PCR que amplifica una región conservada del KDNA (120 pb), la misma tuvo una menor sensibilidad que el PCR1 que amplifica una región mayor del KDNA (750pb). Bajo nuestras condiciones de laboratorio, la PCR2 puede detectar hasta 0.015pg de ADN. La diferencia en la sensibilidad pudiera deberse a que existe cierta diferencia en la detección de diferentes

especies, una consecuencia de la calidad de ADN o a la presencia de elementos que afectan la amplificación (Montalvo et al., 2014). Este resultado, también puede estar relacionado a que la PCR1 (KDNA-*Viannia*) amplifica un minicírculo completo de *Leishmania Viannia* (Vergel et al., 2005)

La PCR3 tuvo una menor sensibilidad que los PCR de KDNA, debido a que el marcador hsp70 presenta un límite de detección bajo en PCR convencional (León Ramos, 2017) y esto se evidenció en nuestros resultados, bajo nuestras condiciones de laboratorio PCR-hsp70 logra detectar hasta 0.25 pg de ADN. Para este gen, hsp70, el número de copias en el genoma varía en las especies de *Leishmania*, fluctúa desde 1 a 15 copias mientras que los genes de KDNA pueden tener hasta 700 copias en el genoma (León et al., 2017; Volpini et al., 2004)

Por otro lado, existe actualmente un gran interés por el uso de metodologías de PCR en tiempo real ya que las mismas pueden ser utilizadas para el diagnóstico, cuantificación de carga parasitaria e identificación de especies de *Leishmania* (Gomes et al., 2017; Sandoval-Juárez et al., 2020; Thomaz et al., 2021; Van Der Meide et al., 2008). En el presente estudio se evaluó la qPCR 18S ribosomal como diagnóstico, mostrando una positividad de 77.6%, una sensibilidad relativamente baja comparada con las reportadas en otros estudios con plataformas de qPCR en donde la sensibilidad alcanzó hasta un 90% (Ceccarelli et al., 2020; Filgueira et al., 2020; Galluzzi et al., 2018). También debemos señalar que la diana utilizada en nuestro estudio ha sido reportada con una menor sensibilidad comparada con los qPCR de KDNA empleados en la determinación de carga parasitaria (de Paiva-Cavalcanti et al., 2015; Merdekios et al., 2021). Posiblemente la baja sensibilidad

de la qPCR utilizada pueda estar relacionada con el tipo de muestra evaluada, ya que originalmente las muestras fueron colectadas para otros análisis. En la actualidad algunos grupos de investigación trabajan en la estandarización del método de toma de muestras para qPCR (Ceccarelli et al., 2020; Filgueira et al., 2020). Al respecto, se sugiere que las muestras recolectadas raspando el borde interior de una la lesión LC ulcerada son las más apropiadas para el diagnóstico, tanto para el diagnóstico molecular como para el examen parasitológico directo (Thomaz et al., 2021).

Aun con la menor sensibilidad encontrada, la qPCR 18S ribosomal es una metodología que refuerza el diagnóstico de la LC en Panamá, sobre todo por su facilidad de uso, menor tiempo de ejecución y capacidad de cuantificar la carga parasitaria (Filgueira et al., 2020). Al respecto algunos reportes recientes han demostrado que la cuantificación de la carga parasitaria resulta útil para la evaluación del pronóstico clínico de los pacientes con LC (Perez, 2021).

Por otra parte, el monitoreo de la evaluación clínica y el tratamiento adecuado requieren una tipificación temprana y segura de las especies de *Leishmania* y de las potenciales variantes genéticas asociadas (Torres Avila et al., 2019). En este contexto, en nuestro estudio se utilizó una metodología de PCR-RPLP del gen de la proteína de choque térmico de 70 Kd. Los resultados demuestran que un 59.4% de las muestras analizadas correspondieron con *L. (V.) panamensis*, lo cual concuerda con el hecho de que esta especie es la más frecuente en los casos de LC reportados en Panamá (Davila et al., 2021; Miranda et al., 2021).

El otro 40.6%, correspondieron según el PCR hsp70-RFLP, a *L. (V.) guyanensis*, una especie con muy pocos reportes comprobados en Panamá, se ha encontrado en las provincias de Panamá y Coclé (Miranda et al., 2021). Los pacientes con LC por *L. (V.) guyanensis* presentan afectación primaria de la piel. Con relativa frecuencia, esta infección puede también afectar la mucosa oral y nasal con una alta incidencia de perforación en el tabique (Borges et al., 2018). Esta especie ha sido también asociada con fallos en el tratamiento de las lesiones inducidas de la LC (Adolfo et al., 2001; Francesconi et al., 2018).

Una de las limitantes de nuestro estudio fue que las muestras evaluadas representaban remanentes utilizados para el diagnóstico rutinario de casos sospechosos de LC. Por esta razón algunas muestras presentaron muy poco material genético, lo que no permitió secuenciar el total de las muestras caracterizadas inicialmente por hsp70-RFLP. Luego de los análisis filogenéticos, se obtuvieron 38 secuencias de las cuales 21 correspondieron con *L. (V.) panamensis*, confirmando el resultado obtenido durante el análisis por RFLP.

En cuanto a las 11 muestras caracterizadas inicialmente por RFLP como *L. (V.) guyanensis*, el análisis filogenético mostró que las mismas en realidad se agruparon cerca de los aislados de referencia de *L. (V.) guyanensis* y *Leishmania (V.) shawi* (Figura 7) formando así parte del grupo *Leishmania* sp.1 mencionado anteriormente (Miranda et al., 2021).

Según nuestros resultados, *Leishmania* sp.1. tiene una prevalencia de 28.9 % en estas lesiones con baja carga parasitaria, un poco más alta que la reportada (23.2 %) para los casos de LC en general (Miranda et al., 2021). Hasta el momento, esta

variante genética solo ha sido descrita en Panamá, pero aún no se conocen con certeza las características clínicas que induce, su repercusión en el diagnóstico y las características epidemiológicas asociadas. Los datos obtenidos en nuestro estudio señalan además que aparentemente los casos de LC por *Leishmania* sp.1 tiene similitud con la clínica inducida por *L. (V.) panamensis*.

Tanto el tiempo evolución, el número y localización de las lesiones (Anexo 6) de *L. (V.) panamensis* son similares a los encontrados para *Leishmania* sp.1. Nuestros resultados mostraron que esta variante está presente en las provincias de Colón y Panamá Oeste, en las cuales no había sido reportada originalmente (Miranda et al., 2021). A pesar de estos hallazgos, es necesario seguir investigando la distribución geográfica de esta variante, las características clínicas y la respuesta a los tratamientos farmacológicos utilizados en Panamá para la LC.

Finalmente, nuestros resultados confirman que ante el diagnóstico parasitológico negativo de una lesión sospechosa por LC, es necesario confirmar este resultado con un método molecular. Al respecto es importante considerar que las dianas disponibles pueden variar en sensibilidad y especificidad. En nuestra evaluación, la PCR KDNA-viannia fue la que presentó mejores resultados en cuanto a sensibilidad/especificidad y es por lo tanto la prueba recomendada para ser utilizada en nuestro medio. Con respecto a la tipificación de las especies de *Leishmania* en las lesiones con baja carga parasitaria, se confirmó que *L. (V.) panamensis* es la especie predominante. Sin embargo, debe también considerarse que la variante genética conocida como *Leishmania* sp.1 es asimismo frecuente en este tipo de lesiones. Finalmente, nuestros resultados refuerzan la utilidad de los métodos

moleculares en el diagnóstico de la LC, especialmente en lesiones con baja carga parasitaria. Además, se señalan las especies/variantes genéticas de *Leishmania* involucradas, así como las características clínico/epidemiológicas vinculadas con este tipo de lesión.

# **Capítulo V: Conclusiones y Recomendaciones**

## Conclusiones

- En el Departamento de Investigaciones de Parasitología del ICGES, la frecuencia de lesiones por LC con diagnóstico parasitológico negativo, pero con PCR KDNA-Viannia positiva, es alta, durante el período 2015-2019.
- Las provincias de Panamá, Panamá Oeste y Colón fueron las áreas que registraron el mayor número casos de LC con frotis y cultivo negativo.
- La forma más frecuente de LC con diagnóstico parasitológico negativo fue la leishmaniasis cutánea localizada (LCL), el 72% de los pacientes evaluados reportaron tener sólo una lesión.
- Las regiones anatómicas más afectadas por estas lesiones con baja carga parasitaria fueron las piernas y brazos. No se encontró diferencia significativa con respecto a muestras de lesiones en pacientes que presentaron frotis o cultivos positivos.
- La mayoría de las muestras con resultado parasitológico negativo provenían de pacientes masculinos (65%), esto concuerda con la frecuencia general reportada para la LC en Panamá.
- Entre los pacientes evaluados, la frecuencia de lesiones con diagnóstico parasitológico negativo fue mayor en los grupos etarios de 0-10 y de 21-30 años.

- No se encontraron diferencias significativas en relación con el cuadro clínico reportado en pacientes de LC con lesiones de baja carga parasitaria y pacientes con diagnóstico parasitológico confirmado.
- Luego de evaluar cuatro metodologías de PCR, se confirmó la mayor sensibilidad de la PCR KDNA-*viannia* para el diagnóstico de lesiones de LC con baja carga parasitaria. Se corrobora así la utilidad de esta metodología para el diagnóstico de este tipo lesiones en pacientes con LC en Panamá.
- La qPCR 18S ribosomal presentó una sensibilidad de 77.6%. A pesar de una sensibilidad relativamente menor en lesiones de baja carga parasitaria, esta metodología debe ser considerada para el diagnóstico de la LC en Panamá, sobre todo por su facilidad de uso, menor tiempo de ejecución y capacidad de cuantificación.
- Con la PCR-hsp70 RFLP se logró caracterizar el agente etiológico correspondiente en 69 muestras, de las cuales 41 (59.4%) correspondieron a *L. (V.) panamensis* y 28 (40.6%) mostraron el perfil reportado para *L. (V.) guyanensis*.
- Los resultados de la secuenciación y análisis filogenético confirmaron el predominio de *L. (V.) panamensis* en las lesiones evaluadas con diagnóstico parasitológico negativo. Sin embargo, esta metodología rectifica la identificación de *L. (V.) guyanensis* por la variante genética *Leishmania* sp.1.
- Se confirma de esta manera la limitante de la PCR-hsp70 RFLP en la identificación de *L. (V.) guyanensis* y variantes genéticas relacionadas

presentes en Panamá, esto debe ser considerado durante la ejecución de esta metodología en nuestro medio.

- La alta frecuencia encontrada para *Leishmania* sp.1 en muestras de lesiones con baja carga parasitaria, reitera la necesidad de continuar los estudios de caracterización de esta variante genética.

## Recomendaciones

- Crear programas educativos estatales y particulares que incentiven en las comunidades afectadas una mejor educación sanitaria sobre la LC en Panamá
- Promover la inclusión de una prueba molecular durante el diagnóstico rutinarios de la LC, especialmente cuando haya un resultado negativo por frotis y cultivo, y/o cuando las características clínicas/ epidemiológicas sugieren una LC.
- Estandarizar en los laboratorios de referencia un PCR tiempo real más sensible, esto para lograr cuantificar de manera adecuada la carga parasitaria (amastigotes de *Leishmania*) en las lesiones por LC, esto para mejorar el tratamiento, seguimiento y manejo clínico de la infección.
- Realizar otros estudios en Panamá que complementen la caracterización genética de las especies y/o variantes genéticas asociadas con lesiones de LC con baja carga parasitaria

# **Capítulo VI: Bibliografía**

## Bibliografía

- Abd El-Salam, N. M., Ayaz, S., & Ullah, R. (2014). PCR and microscopic identification of isolated *Leishmania tropica* from clinical samples of cutaneous leishmaniasis in human population of kohat region in khyber Pakhtunkhwa. *BioMed Research International*, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/861831>
- Adolfo, G., Romero, S., De, M. V., Guerra, F., Paes, G., De, V., Maceˆdo, O., & Maceˆdo, M. (2001). Comparison of cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *L. (V.) guyanensis* in brazil: therapeutic response to meglumine antimoniate. *Am. J. Trop. Med. Hyg*, 65(5), 456–465.
- Al-Jawabreh, A., Dumaidi, K., Ereqat, S., Nasereddin, A., Azmi, K., Al-Jawabreh, H., Al-Laham, N., & Abdeen, Z. (2018). A comparison of the efficiency of three sampling methods for use in the molecular and conventional diagnosis of cutaneous leishmaniasis. *Acta Tropica*, 182(December 2017), 173–177. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2018.03.001>
- Apaza-Castillo, Y. G., Aguilar-Ancori, E. G., Quispe-Florez, M. M., Ramirez-Soto, M. C., & Pacheco-Venero, R. L. (2020). PCR performance for the diagnosis of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania viannia complex* using biopsy samples, compared with exudate samples from skin lesions on filter paper. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 114(10), 721–724. <https://doi.org/10.1093/trstmh/traa052>
- Asfaram, S., Fakhar, M., Mirani, N., Derakhshani-niya, M., Valadan, R., Ziaei

- Hezarjaribi, H., & Emadi, S. N. (2019). HRM–PCR is an accurate and sensitive technique for the diagnosis of cutaneous leishmaniasis as compared with conventional PCR. *Acta Parasitologica*, 0123456789. <https://doi.org/10.2478/s11686-019-00154-5>
- Ashford, R. W. (1997). What it takes to be a reservoir host. *Belgian Journal of Zoology*, 127 Suppl, 85–90.
- Augusto, C. (2000). Diagnostico Parasitologico De La Leishmaniasis Tegumentaria Americana. *Rev Med Exp*, 17, 1–4.
- Azmi, K., Nasereddin, A., Ereqat, S., Schnur, L., Schonian, G., & Abdeen, Z. (2011). Methods incorporating a polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism and their use as a “gold standard” in diagnosing old world cutaneous leishmaniasis. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 71(2), 151–155. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2011.06.004>
- Barçante, T. A., Souza, M. V. De, Fernandes, A. C. B., & Barçante, J. M. D. P. (2019). Use of the polymerase chain reaction for the diagnosis of American tegumentary leishmaniasis. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, 94(1), 113–114. <https://doi.org/10.1590/abd1806-4841.20197929>
- Bensoussan, E., Nasereddin, A., Jonas, F., Schnur, L. F., & Jaffe, C. L. (2006). Comparison of PCR assays for diagnosis of cutaneous leishmaniasis. *Journal of Clinical Microbiology*, 44(4), 1435–1439. <https://doi.org/10.1128/JCM.44.4.1435-1439.2006>
- Borges, A. F., Gomes, R. S., & Ribeiro-Dias, F. (2018). *Leishmania (Viannia)*

*guyanensis* in tegumentary leishmaniasis. *Pathogens and Disease*, 76(4), 1–10. <https://doi.org/10.1093/femspd/fty025>

Cárdenas Alegría, Ó. V, Romero Calle, D., Salamanca Capusiri, E., Santalla Vargas, J. A., Oporto Portugal, P., Arteaga Voigt, D., Alvarez Aliaga, M. T., Terrazas Siles, E., Flores, N., & Giménez Turba, A. (2012). Análisis de marcadores moleculares para la tipificación de *Leishmania* spp. circulantes en el departamento de La Paz, Bolivia. *Biofarbo*, 20(1), 8–21. [http://www.revistasbolivianas.org.bo/scielo.php?script=sci\\_abstract&pid=&lng=es&nrm=iso&tlng=%0Ahttp://files/787/scielo.html](http://www.revistasbolivianas.org.bo/scielo.php?script=sci_abstract&pid=&lng=es&nrm=iso&tlng=%0Ahttp://files/787/scielo.html)

Ceccarelli, M., Buffi, G., Diotallevi, A., Andreoni, F., Bencardino, D., Vitale, F., Castelli, G., Bruno, F., Magnani, M., & Galluzzi, L. (2020). Evaluation of a kDNA-Based qPCR Assay for the Detection and Quantification of Old World *Leishmania* Species. *Microorganisms*, 8(12), 2006. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8122006>

Chaves, L. F., Calzada, J. E., Valderrama, A., & Saldaña, A. (2014). Cutaneous Leishmaniasis and Sand Fly Fluctuations Are Associated with El Niño in Panamá. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 8(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003210>

Chena, L., Nara, E., Canese, A., Oddone, R., & Russomando, G. (2013). Aplicación de la PCR para la detección de género y complejos de *Leishmania* en diferentes tipos de muestras biológicas. *Mem. Inst. Investig. Cienc. Salud Junio*, 9(1), 45–51.

- Collis, S., El-Safi, S., Atia, A. A., Bhattacharyya, T., Hammad, A., Den Boer, M., Le, H., Whitworth, J. A., & Miles, M. A. (2019). Epidemiological and molecular investigation of resurgent cutaneous leishmaniasis in Sudan. *International Journal of Infectious Diseases*, 88, 14–20. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2019.08.018>
- Consuelo V., D., & Craft, N. (2009). Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Dermatologic Therapy*, 22(6), 491–502. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1111/j.1529-8019.2009.01272.x>
- Córdova, O., Vargas, F., Hashiguchi, Y., Kato, H., & Gómez, E. (2011). Identificación de especies de *Leishmania* en pacientes y flebotominos en áreas de transmisión en una región de Perú. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*, 28(3), 446–453. <https://doi.org/10.1590/S1726-46342011000300007>
- Çulha, G., Kaya, T., Gülbol Duran, G., Urhan Küçük, M., Doğramaci, A. Ç., & Tiyekli Çelik, D. (2019). Investigation of polymerase chain reaction method in patients with suspected chronic cutaneous *leishmania* of negative microscopy. *Mikrobiyoloji Bulteni*, 53(4), 408–418. <https://doi.org/10.5578/mb.68692>
- Da Graça, G. C., Volpini, A. C., Romero, G. A. S., Neto, M. P. de O., Hueb, M., Porrozzi, R., Boit, M. C., & Cupolillo, E. (2012). Development and validation of PCR-based assays for diagnosis of American cutaneous leishmaniasis and identification of the parasite species. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 107(5), 664–674. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762012000500014>
- Davila, M., Pineda, V., Calzada, J. E., Saldaña, A., & Samudio, F. (2021). Evaluation

of cytochrome b sequence to identify *leishmania* species and variants: The case of Panama. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 116(1).  
<https://doi.org/10.1590/0074-02760200572>

De Paiva-Cavalcanti, M., de Moraes, R. C. S., Pessoa-e-Silva, R., Trajano-Silva, L. A. M., Gonçalves-de-Albuquerque, S. da C., Tavares, D. de H. C., Brelaz-de-Castro, M. C. A., Silva, R. de F. e., & Pereira, V. R. A. (2015). Leishmaniasis diagnosis: An update on the use of immunological and molecular tools. In *Cell and Bioscience* (Vol. 5, Issue 1, pp. 1–10). BioMed Central Ltd.  
<https://doi.org/10.1186/s13578-015-0021-2>

Del Rosal Rabesa, T., Baquero-Artigao, F., & García Miguel, M. J. (2010). Leishmaniasis cutánea. *Revista Pediatría de Atención Primaria*, 12(46), 263–271. [https://doi.org/10.1016/S1134-2072\(12\)70319-5](https://doi.org/10.1016/S1134-2072(12)70319-5)

Espir, T. T., Guerreiro, T. S., Naiff, M. de F., Figueira, L. de P., Soares, F. V., da Silva, S. S., & Franco, A. M. R. (2016). Evaluation of different diagnostic methods of American Cutaneous Leishmaniasis in the Brazilian Amazon. *Experimental Parasitology*, 167, 1–6.  
<https://doi.org/10.1016/j.exppara.2016.04.010>

Eugenia, M., Moreno, O., Lugo, D. A., Carolina, D., Ochoa, B., Alexis, W., Martínez, G., Convit, J., & Zerpa, O. (2013). *Comparación clínica de la Leishmaniasis Cutánea Difusa y Leishmaniasis Diseminada en Venezuela Abstract*: 51, 29–35.

Faber, W. R., Oskam, L., van Gool, T., Kroon, N. C. M., Kneegt-Junk, K. J., Hofwegen,

- H., van der Wal, A. C., & Kager, P. A. (2003). Value of diagnostic techniques for cutaneous leishmaniasis. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 49(1), 70–74. <https://doi.org/10.1067/mjd.2003.492>
- Filgueira, C., Moreira, O. C., Cantanhêde, L. M., de Farias, H. M. T., Porrozzi, R., Britto, C., Boité, M. C., & Cupolillo, E. (2020). Comparison and clinical validation of QPCR assays targeting *leishmania* 18s rDNA and HSP70 genes in patients with american tegumentary leishmaniasis. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 14(10), 1–18. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008750>
- Francesconi, V. A., Francesconi, F., Ramasawmy, R., Adolfo, G., Romero, S., Das Graças, M., & Alecrim, C. (2018). *Failure of fluconazole in treating cutaneous leishmaniasis caused by Leishmania guyanensis in the Brazilian Amazon: An open, nonrandomized phase 2 trial*. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006225>
- Galluzzi, L., Ceccarelli, M., Diotallevi, A., Menotta, M., & Magnani, M. (2018). Real-time PCR applications for diagnosis of leishmaniasis. In *Parasites and Vectors* (Vol. 11, Issue 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s13071-018-2859-8>
- Gomes, C. M., Cesetti, M. V., De Paula, N. A., Vernal, S., Gupta, G., Sampaio, R. N. R., & Roselino, A. M. (2017). Field validation of SYBR Green- and TaqMan-based real-time PCR using biopsy and swab samples to Diagnose American Tegumentary Leishmaniasis in an Area Where *Leishmania (Viannia) braziliensis* is endemic. *Journal of Clinical Microbiology*, 55(2), 526–534.

<https://doi.org/10.1128/JCM.01954-16>

Gosch, C. S., Marques, C. P., Resende, B. S., Souza, J. dos S., Rocha, R. A. da S., Lopes, D. S. S., Gosch, M. S., Dias, F. R., & Dorta, M. L. (2017). American tegumentary leishmaniasis: Epidemiological and molecular characterization of prevalent *Leishmania* species in the state of Tocantins, Brazil, 2011-2015. *Revista Do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, 59. <https://doi.org/10.1590/S1678-9946201759091>

Grangeiro Júnior, C. R. P., Pimentel, J. V. C., Teixeira Júnior, A. G., de Jesus, A. F., Galvão, T. C. F., de Souza, L. A. A., Gadelha, M. D. S. V., Damasceno, K. S., Neto, M. L. R., de Lima, M. A. P., Do Nascimento, V. B., & da Silva, C. G. L. (2018). American cutaneous leishmaniasis in a northeast Brazilian city: Clinical and epidemiological features. *Revista Da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 51(6), 837–842. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0504-2017>

Guerra-Silveira, F., & Abad-Franch, F. (2013). Sex Bias in Infectious Disease Epidemiology: Patterns and Processes. *PLOS ONE*, 8(4), e62390. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0062390>

Herrera, G., Hernández, C., Ayala, M. S., Flórez, C., Teherán, A. A., & Ramírez, J. D. (2017). Evaluation of a Multilocus Sequence Typing (MLST) scheme for *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Viannia) panamensis* in Colombia. *Parasites & Vectors*, 10(1), 236. <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2175-8>

Jaramillo-Antillón, Espinoza-Aguirre, A., Calvo-Fonseca, N., Mata-Somarriba, C., &

- Wasserman, H. (2018). *La leishmaniosis cutánea en Costa Rica : prevención , diagnóstico y tratamiento*. 103–114.
- Kevric, I., Cappel, M. A., & Keeling, J. H. (2015). New World and Old World Leishmania Infections: A Practical Review. In *Dermatologic Clinics* (Vol. 33, Issue 3, pp. 579–593). W.B. Saunders. <https://doi.org/10.1016/j.det.2015.03.018>
- Kheirandish, F., Sharafi, A. C., Kazemi, B., Bandehpour, M., Tarahi, M. javad, & Khamesipour, A. (2013). First molecular identification of *Leishmania* species in a new endemic area of cutaneous leishmaniasis in Lorestan, Iran. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 6(9), 713–717. [https://doi.org/10.1016/S1995-7645\(13\)60124-8](https://doi.org/10.1016/S1995-7645(13)60124-8)
- Kocher, A., Valière, S., Bañuls, A. L., & Murienne, J. (2018). High-throughput sequencing of kDNA amplicons for the analysis of *Leishmania* minicircles and identification of Neotropical species. *Parasitology*, 145(5), 585–594. <https://doi.org/10.1017/S0031182017002013>
- Lainson, R., & Shaw, J. J. (1974). Las leishmanias y la leishmaniasis del nuevo mundo, con particular referencia al Brasil. *Boletín de La Oficina Sanitaria Panamericana*, 93–114.
- Lainson, R., Shaw, J. J., & Cunha, M. (1972). Leishmaniasis of the New World: Taxonomic Problems of the New World: Taxonomic Problems. *British Medical Bulletin*, 28(1), 44–48.
- Lamm, R., Alves, C., Perrotta, G., Murphy, M., Messina, C., Sanchez, J. F., Perez,

- E., Rosales, L. A., Lescano, A. G., Smith, E., Valdivia, H., Fuhrer, J., & Ballard, S.-B. (2018). Prevalence of and Factors Associated with Negative Microscopic Diagnosis of Cutaneous Leishmaniasis in Rural Peru. *Am. J. Trop. Med. Hyg*, 99(2), 331–337. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.17-0909>
- León, C. M., Muñoz, M., Hernández, C., Ayala, M. S., Flórez, C., Teherán, A., Cubides, J. R., & Ramírez, J. D. (2017). *Analytical Performance of Four Polymerase Chain Reaction ( PCR ) and Real Time PCR ( qPCR ) Assays for the Detection of Six Leishmania Species DNA in Colombia*. 8(October), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01907>
- León Ramos, C. M. (2017). *Evaluación del desempeño analítico del diagnóstico molecular de leishmaniasis cutánea*. 1–140.
- Machado, P., Rosa, M. E., Costa, D., Mignac, M., Silva, J., Schierfer, A., Teixeira, M., Bacellar, O., & Carvalho, E. M. (2011). *Reappraisal of the immunopathogenesis of disseminated leishmaniasis: in situ and systemic immune response*. 105(8), 438–444. <https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2011.05.002>.Reappraisal
- Mashayekhi-Ghoyonlo, V., Kiafar, B., Rohani, M., Esmaeili, H., & Erfanian-Taghvaei, M. R. (2015). Correlation between socioeconomic status and clinical course in patients with cutaneous leishmaniasis. *Journal of Cutaneous Medicine and Surgery*, 19(1), 40–44. <https://doi.org/10.2310/7750.2014.13216>
- Merdekios, B., Pareyn, M., Tadesse, D., Eligo, N., Kassa, M., Jacobs, B. K. M., Leirs, H., Van Geertruyden, J. P., van Griensven, J., Caljon, G., & Cnops, L. (2021).

Evaluation of conventional and four real-time PCR methods for the detection of *Leishmania* on field-collected samples in Ethiopia. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 15(1), 1–18. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PNTD.0008903>

Merino-Espinosa, G., Rodríguez-Granger, J., Morillas-Márquez, F., Tercedor, J., Corpas-López, V., Chiheb, S., Alcalde-Alonso, M., Azaña-Defez, J. M., Riyad, M., Díaz-Sáez, V., & Martín-Sánchez, J. (2018). Comparison of PCR-based methods for the diagnosis of cutaneous leishmaniasis in two different epidemiological scenarios: Spain and Morocco. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, 32(11), 1999–2003. <https://doi.org/10.1111/jdv.15034>

Miranda, A. del C., González, K. A., Samudio, F., Pineda, V. J., Calzada, J. E., Capitan-Barrios, Z., Jiménez, A., Castillo, J., Mendoza, Y., Suárez, J. A., Ortiz, B., Méndez, J., Pascale, J. M., Grögl, M., Sosa, N., & Saldaña, A. (2021). Molecular Identification of Parasites Causing Cutaneous Leishmaniasis in Panama. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 1(0), 1–9. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.20-1336>

Mohammadiha, A., Dalimi, A., Mahmoodi, M. R., Parian, M., Pirestani, M., & Mohebbali, M. (2017). The PCR-RFLP-Based Detection and Identification of the *Leishmania* Species Causing Human Cutaneous Leishmaniasis in the Khorasan-Razavi Province, Northeast of Iran. *Journal of Arthropod-Borne Diseases*, 11(3), 383–392. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29322055>

Mohammadpour, I., Motazedian, M. H., Handjani, F., & Hatam, G. R. (2016).

Cutaneous Leishmaniasis of the Eyelids: A Case Series with Molecular Identification and Literature Review. *Korean Journal Parasitology*, 54(1), 787–792. <https://doi.org/10.1186/s12879-016-2178-7>

Montalvo, a., Fraga, J., Monzote, L., García, M., & Fonseca, L. (2012). Diagnóstico de la leishmaniasis de la observación microscópica del parásito a la detección del ADN. *Revista Cubana de Medicina Tropical.*, 64(2), 108–131. <https://doi.org/10.1007/s10096-011-1463-z>

Montalvo, A., Fraga, J., Rodríguez, O., Blanco, O., Llanos-Cuentas, A., García, A. L., Valencia, B. M., Muskus, C., Van der Auwera, G., & Requena, J. M. (2014). Detección de *Leishmania* spp. en Base al Gen que Codifica la Proteína HSP20. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 31(4), 635–678. <https://doi.org/10.17843/rpmesp.2014.314.112>

Moreira, O. C., Yadon, Z. E., & Cupolillo, E. (2018). The applicability of real-time PCR in the diagnostic of cutaneous leishmaniasis and parasite quantification for clinical management: Current status and perspectives. In *Acta Tropica* (Vol. 184, pp. 29–37). <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.09.020>

Nava, A., Shimabukuro, J. S., Chmura, A. A., & Luz, S. L. B. (2017). The Impact of Global Environmental Changes on Infectious Disease Emergence with a Focus on Risks for Brazil. *ILAR Journal*, 58(3), 393–400. <https://doi.org/10.1093/ilar/ilx034>

Oddone, R., Arbo, C., Nara, E., Velázquez, G., Acosta, M., Poletti, D., Filippini, J., Roig, J., Russomando, G., & Mucosal. (2014). *Utilidad diagnóstica de los*

métodos laboratoriales en leishmaniasis mucosa , incluyendo la ‘ PCR .’  
January 2004.

OPS/OMS. (2016). *Guía para el abordaje integral de la leishmaniasis en Panamá, 2015*. 66.

OPS/OMS, & Oms. (2019). *Leishmaniasis - Informe Epidemiológico de las Américas*. 7, 8. [www.paho.org](http://www.paho.org)

OPS, O. P. de la S. (2019). *Manual de procedimientos para la vigilancia y control de las leishmaniasis en las Américas*. [www.paho.org](http://www.paho.org)

Passos, V. M. A., Fernandes, O., Lacerda, P. A. F., Volpini, A. C., Gontijo, C. M. F., Degraive, W., & Romanha, A. J. (1999). *Leishmania (Viannia) braziliensis* is the predominant species infecting patients with American cutaneous leishmaniasis in the State of Minas Gerais, Southeast Brazil. *Acta Tropica*, 72(3), 251–258. [https://doi.org/10.1016/S0001-706X\(98\)00100-4](https://doi.org/10.1016/S0001-706X(98)00100-4)

Pereira, L. de O. R., Moreira, R. B., de Oliveira, M. P., Reis, S. de O., de Oliveira Neto, M. P., & Pirmez, C. (2017). Is *Leishmania (Viannia) braziliensis* parasite load associated with disease pathogenesis? *International Journal of Infectious Diseases*, 57, 132–137. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2017.01.036>

Pérez, C., Solías, Y., & Rodríguez, G. (2014). Leishmaniasis cutánea difusa en un paciente con sida. *Biomédica*, 27(1), 149. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v27i1.241>

Perez, J. (2021). *Carga Parasitaria, Distribución Espacial y Diversidad Genética de Lesihmania spp en Personal de Militar del Ejercito Nacional de Colombia con*

*Lesiones Cutáneas*. 80. <http://hdl.handle.net/20.500.12495/7056>.

Rasti, S., Ghorbanzadeh, B., Kheirandish, F., Mousavi, S. G., Pirozmand, A., Hooshyar, H., & Abani, B. (2016). Comparison of Molecular, Microscopic, and Culture Methods for Diagnosis of Cutaneous Leishmaniasis. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 30(5), 610–615. <https://doi.org/10.1002/jcla.21910>

Rêgo, F. D., da Rocha Lima, A. C. V. M., Pereira, A. A. S., Quaresma, P. F., Pascoal-Xavier, M. A., Shaw, J. J., & Gontijo, C. M. F. (2018). Genetic variant strains of *Leishmania (Viannia) braziliensis* exhibit distinct biological behaviors. *Parasitology Research*, 117(10), 3157–3168. <https://doi.org/10.1007/s00436-018-6014-4>

Rigg, C. A. (2016). *Prevalencia de Infección por Leishmania spp. e Ingesta Sanguínea en especies de Lutzomyia Vectores de Leishmaniasis Tegumentaria en la Comunidad de Trinidad de Las Minas, Distrito de Capira, Panamá.*

Roberto Gamboa Arend. (2009). Leishmaniasis cutánea (Revisión Bibliográfica). *Revista Medica De Costa Rica Y Centroamerica*, LXVI(588), 169–172.

Saldaña, A., Chaves, L. F., Rigg, C. A., Wald, C., Smucker, J. E., & Calzada, J. E. (2013). Short Report: Clinical Cutaneous Leishmaniasis Rates Are Associated with Household *Lutzomyia gomezi*, *Lu. panamensis*, and *Lu. trapidoi* Abundance in Trinidad de Las Minas, Western Panama. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 88(3), 572–574. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.12-0579>

Salud, O. P. de la. (2021). Leishmaniasis: Informe Epidemiológico de las Américas,

No. 10 (Diciembre 2021). *Informe de Leishmaniasis*.  
<https://iris.paho.org/handle/10665.2/55344>

Sandoval-Juárez, A., Minaya-Gómez, G., Rojas-Palomino, N., & Cáceres, O. (2020). Identificación de especies de *Leishmania* en pacientes derivados al Instituto Nacional de Salud del Perú. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 37(1), 87–92. <https://doi.org/10.17843/RPMESP.2020.371.4514>

Sanidad, M. de. (2013). Impactos del Cambio Climático en la Salud. In *Informes, Estudios e Investigación*. <http://publicacionesoficiales.boe.es>

Sosa, N., Miguel, J., Pascale, J. M., Jiménez, A. I., Norwood, J. A., Kreishmandetrick, M., Weina, P. J., Lawrence, K., Mccarthy, W. F., Adams, C., Scott, C., Ransom, J., Tang, D., & Grogl, M. (2019). Topical paromomycin for New World cutaneous leishmaniasis. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 13(5), e0007253.

Steverding, D. (2017). The history of leishmaniasis. *Parasites and Vectors*, 10(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2028-5>

Thomaz, C., Mello, C. X. de, Espíndola, O. de M., Shubach, A. de O., Quintella, L. P., Oliveira, R. V. C. de, Duarte, A. C. G., Pimentel, M. I. F., Lyra, M. R., & Marzochi, M. C. de A. (2021). Comparison of parasite load by qPCR and histopathological changes of inner and outer edge of ulcerated cutaneous lesions of cutaneous leishmaniasis. *PLoS ONE*, 16(1 January). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0243978>

Torres Avila, L., Rodríguez, G., & Sosa Ochoa, W. (2019). *Implementación de un PCR-RFLP/Hsp70 para identificar y tipificar especies de Leishmania en una*

*zona endémica a Leishmaniasis Cutánea Atípica en Honduras.*

<http://portal.amelica.org/ameli/>

Tsokana, C. N., Athanasiou, L. V., Valiakos, G., Spyrou, V., Manolakou, K., & Billinis, C. (2018). Molecular Diagnosis of Leishmaniasis, Species Identification and Phylogenetic Analysis. *Intech Open*, 2, 64. <https://doi.org/10.5772/32009>

Valderrama, A., Herrera, M., & Salazar, A. (2008). Relación ente la composición de especies del género *Lutzomyia franca* (diptera: *psychodidae*, *phlebotominae*) y los diferentes tipos de bosques en Panamá. *Acta Zoológica Mexicana*, 24(2), 67–78.

Van der Auwera, G., & Dujardina, J. C. (2015). Species typing in dermal leishmaniasis. *Clinical Microbiology Reviews*, 28(2), 265–294. <https://doi.org/10.1128/CMR.00104-14>

Van Der Meide, W., Guerra, J., Schoone, G., Farenhorst, M., Coelho, L., Faber, W., Peekel, I., & Schallig, H. (2008). Comparison between quantitative nucleic acid sequence-based amplification, real-time reverse transcriptase PCR, and real-time PCR for quantification of *Leishmania* parasites. *Journal of Clinical Microbiology*, 46(1), 73–78. <https://doi.org/10.1128/JCM.01416-07>

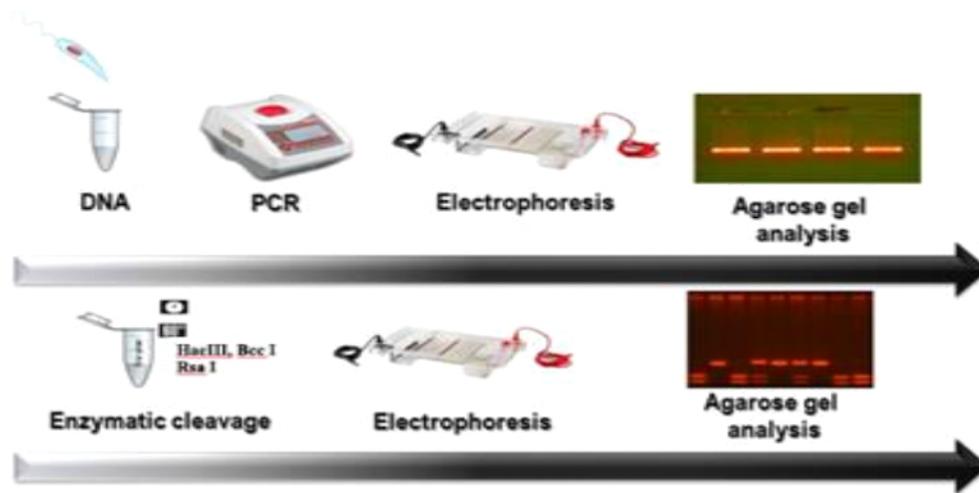
Vergel, C., Walker, J., & Saravia, N. G. (2005). Amplification of human DNA by primers targeted to *Leishmania* kinetoplast DNA and post-genome considerations in the detection of parasites by a polymerase chain reaction. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 72(4), 423–429. <https://doi.org/72/4/423> [pii]

- Volpini, Â. C., Passos, V. M. A., Oliveira, G. C., & Romanha, A. J. (2004). PCR-RFLP to identify *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *L. (Leishmania) amazonensis* causing American cutaneous leishmaniasis. *Acta Tropica*.  
<https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2003.10.008>
- Weigle, K. A., Labrada, L. A., Lozano, C., Santrich, C., & Barker, D. C. (2002). PCR-based diagnosis of acute and chronic cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (Viannia)*. *Journal of Clinical Microbiology*, 40(2), 601–606.  
<https://doi.org/10.1128/JCM.40.2.601-606.2002>
- Zerpa, O., Borges, R., Loyo, N., Galindo, W., Belisario, D., Rodriguez, N., Sosa, A., & Convit, J. (2002). Comparación de cinco métodos para el diagnóstico de la leishmaniasis cutánea. *Dermatologic Therapy*, 40(4), 106–110.

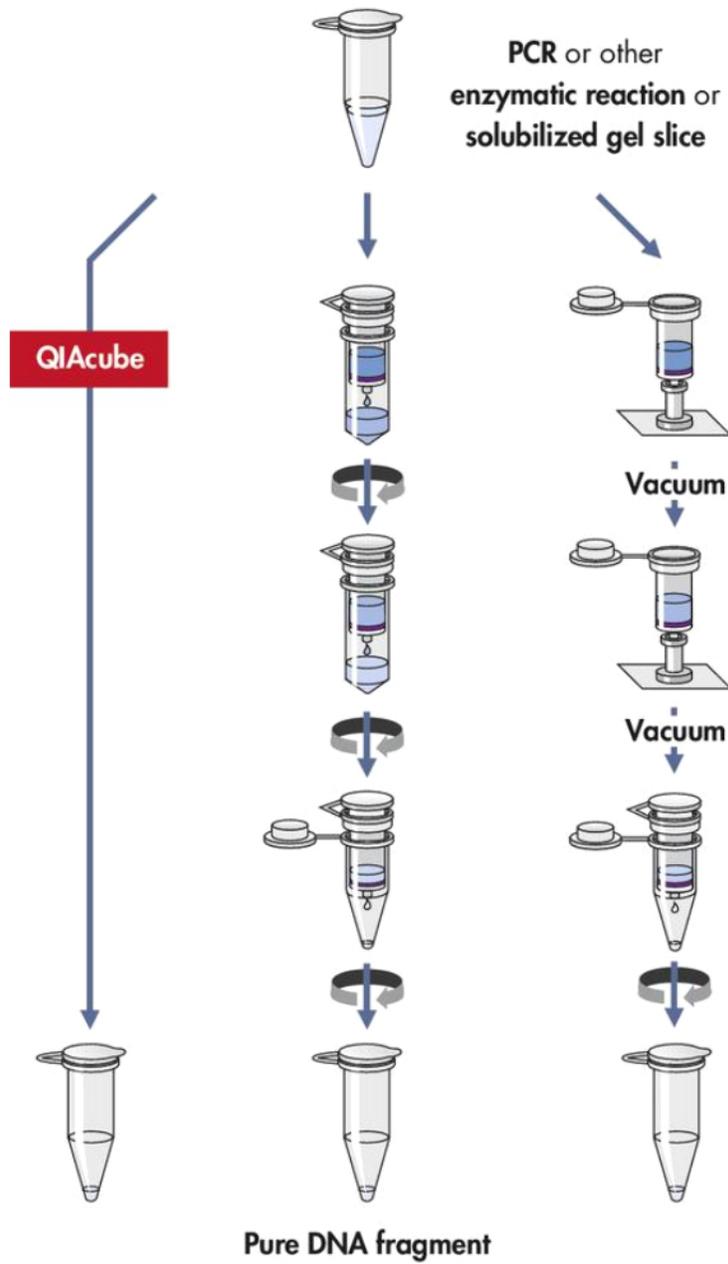


# Capítulo VII: Anexos

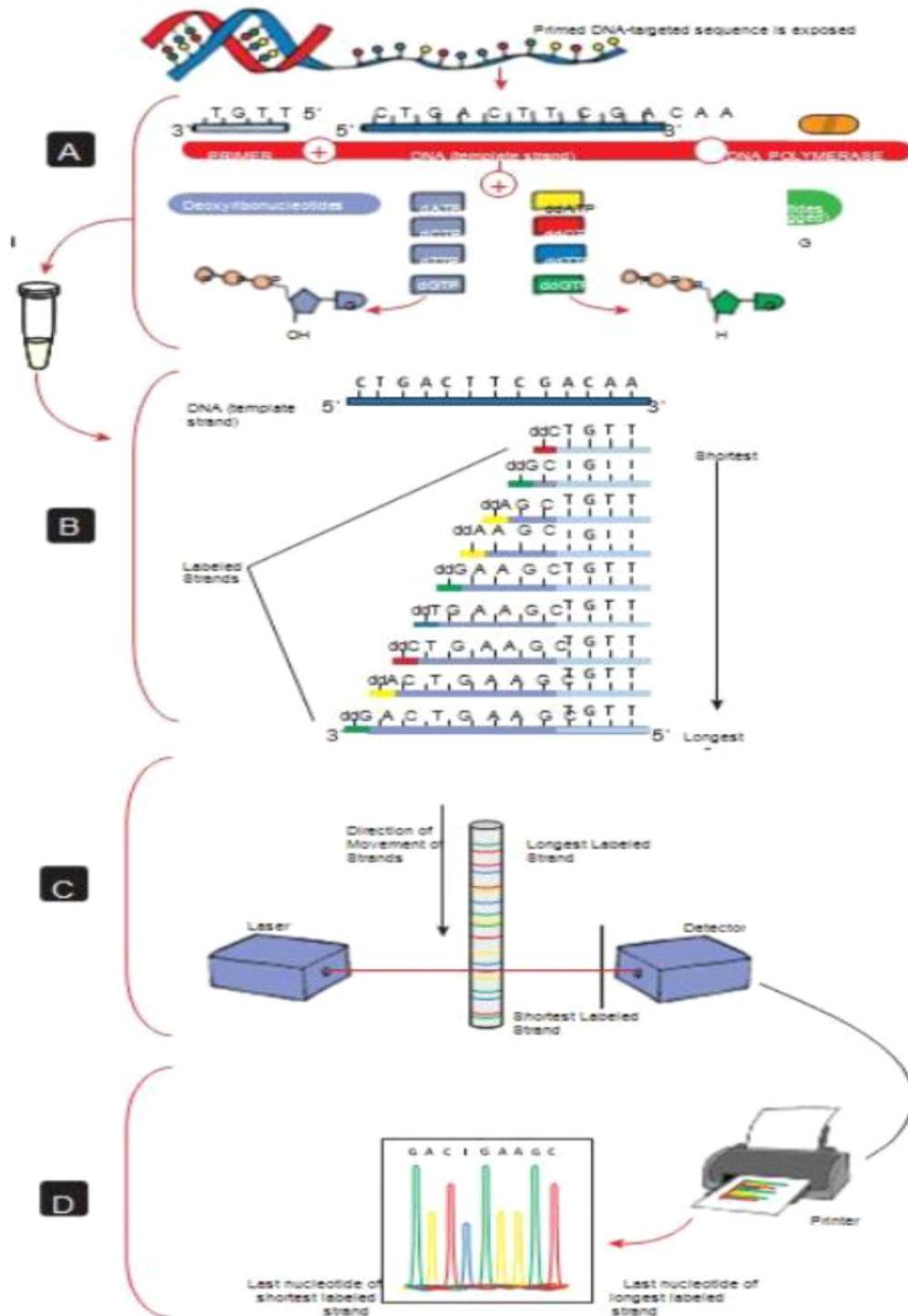
Anexo 1. Protocolo de PCR-Hsp-70 -RLFP



## QIAquick and MinElute Procedure



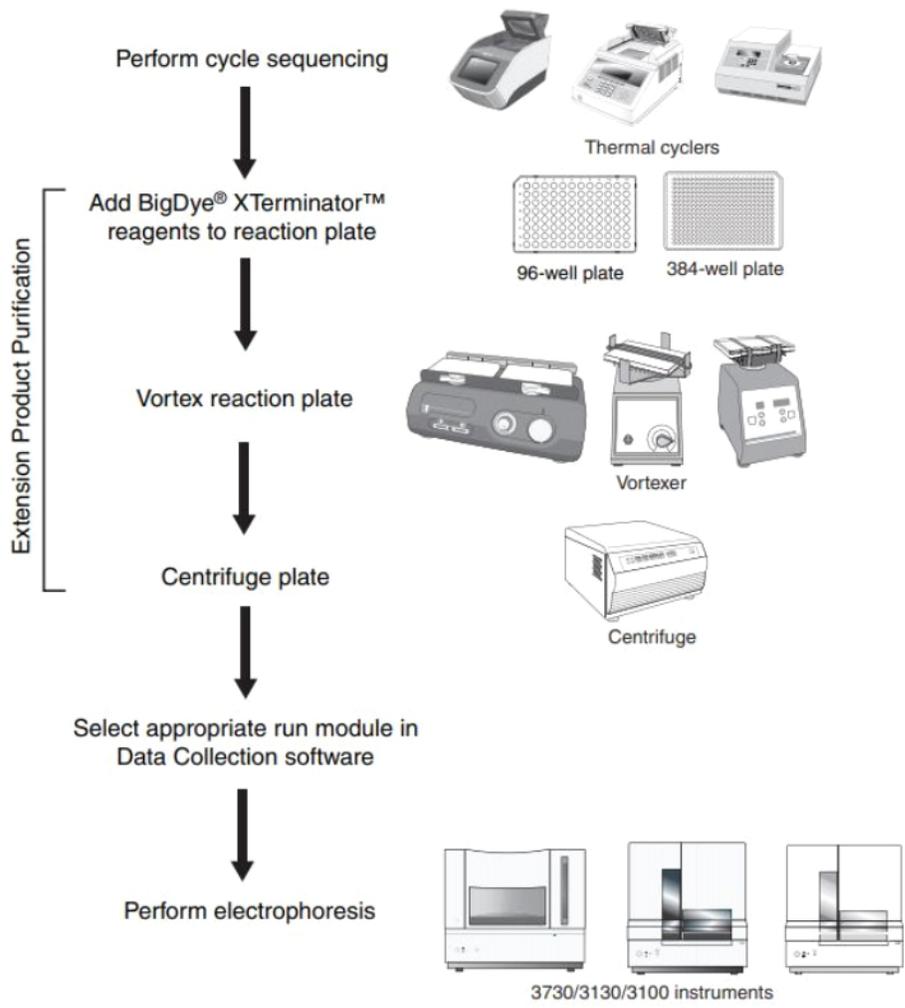
From solutions	5min
From gels	15min



Anexo 3. Secuenciación de Sanger:

- (A) Creación de la reacción de secuenciación.
- (B) Incorporación de los ddNTPs creando fragmentos de ADN de diferentes tamaños.
- (C) La mezcla marcada se secuencia utilizando electroforesis en gel capilar. Un láser detecta la marca fluorescente de cada uno de los ddNTPs.
- (D) La información se analizó utilizando un ordenador.

Anexo 4. Purificación con Bigdye X terminator kit



Anexo 5. Tabla de datos de las muestras

<b>Código</b>	<b>Sexo</b>	<b>Edad</b>	<b>Residencia1</b>	<b>Lugar Visitado en Los Últimos Tres Meses</b>	<b>Provincia visitada los últimos 3 meses</b>	<b>Tiempo de evolución de la Lesión (días)</b>	<b>Número de lesiones</b>	<b>Cara/Cuello</b>	<b>Piernas</b>	<b>Abdomen</b>	<b>Espalda</b>	<b>Brazos</b>	<b>Descripción de la lesión</b>
C-15-03	M	16	COLON	COLON	COLON	30	1		1				
C-15-11	F	6	SAN MIGUELITO	AGUADULCE	COCLE	30	1					1	
C-15-47	M	18	SALAMANCA, COLON	COLON	COLON	365	4					4	lesiones ulcerativas de fondo eritematoso, costroso, bordes elevados.
C-15-51	M	13	RIO INDIOS ARRIBA, CAPIRA		PANAMA OESTE	210	1					1	
C-15-111	M	41	MIAMI, FLORIDA	EL VALLE DE ANTON	COCLE	75	1		1				
C-15-145	M	3	CIRI DE LOS SOTOS, CAPIRA		PANAMA OESTE	180	1					1	
C-15-146	M	8	CIRI GRANDE, CAPIRA		PANAMA OESTE	90	2		1			1	
C-15-168	M	23	CHANGUINOLA, BOCAS DEL TORO		BOCAS DEL TORO	365	1					1	
C-15-169	M	37	CERRO AZUL, PANAMA	CERRO AZUL	PANAMA	30	1		1				
C-15-181	F	38	PEDREGAL, PANAMA	PEDREGAL	PANAMA	30	1		1				
C-15-182	F	61	CATIVA, COLON	COLON	COLON	30	1		1				
C-15-184	M	53	CHAME	CHAME	PANAMA OESTE	120	1		1				
C-15-188	F	22	PEDREGAL	PEDREGAL	PANAMA	14	1		1				
C-16-01	M	30	BELISARIO PORRAS, SAN MIGUELITO	CAPIRA	PANAMA OESTE	60	6					6	lesiones ulcerativas, de fondo eritematoso, costroso y bordes

elevados e indurados.

C-16-05	F	17	CHEPO, PANAMA	PIRIATI, TORTI	PANAMA	120	2	1	1	lesión ulcerativa de fondo eritematoso, costroso y bordes elevados.
C-16-14	M	4	CHAGRES	CHAGRES	PANAMA	30				
C-16-16	M	41	TOCUMEN	SIERRA LLORONA	COLON	45	1		1	lesiones ulcerativas, limpias, asociadas a nódulos dolorosos a la palpación
C-16-17	M	48	PANAMA	CERRO AZUL	PANAMA	180	5		5	lesiones ulcerativas, de fondo costroso, con datos de sobreinfección bacteriana, algunas en vías de cicatrización en extremidad inferior derecha.
C-16-19	M	38	CHIRIQUI	DARIEN	DARIEN	360	4	4		
C-16-50	M	2	COCLE	PENONOME	COCLE	30	2	2		lesiones ulcerativas, sin secreción purulenta, no dolorosas, parcialmente cicatrizadas
C-16-51	F	60	COLON	COLON	COLON	360	1	1		Lesión ulcerativa, de bordes mal definidos, con secreción serosa

C-16-54	M	14	CERRO AZUL	CERRO AZUL	PANAMA	30	2	2		lesiones ulcerativas, costrosas, la mayor de 2.0 x 2.0 cm, de bordes elevados, asociadas a adenopatías cervicales
C-16-56	F	48	PANAMA OESTE	ARRAIJAN	PANAMA OESTE	30	5	4	1	Lesión ulcerativa, no dolorosa Múltiples lesiones papulares eritematosas.
C-16-59	M	38	PANAMA	CAPIRA	PANAMA OESTE	60	1	1		úlceras asociadas a edema.
C-16-65	M	32	CHIRIQUI	DARIEN	DARIEN	28	1	1		
C-16-70	M	18	CAPIRA	CAPIRA	PANAMA OESTE	21	1		1	Lesión ulcerativa con eritema perilesional
C-16-73	M	19	PANAMA	PENONOME	COCLE	60	1	1		lesión ulcerada, de fondo costroso y bordes elevados.
C-16-79	M	17	PANAMA OESTE	CAPIRA	PANAMA OESTE	60	1	1		lesión ulcerativa de bordes elevados, fondo eritematoso-costroso
C-16-93	M	13	PANAMA, TOCUMEN, PACORA			20				lesión ulcerada, de fondo costroso, asociada a edema y asociada a adenopatía cervical
C-16-96	M	9	PANAMA, SAN MIGUELITO			30				lesión ulcerativa
C-16-100	F	4	CAPIRA, CAMPANA							
C-16-108	M	12	COLON, BUENA VISTA			20				lesión ulcerativa, de bordes elevados, eritematosos.

C-16-109	F	8	COLON, BUENA VISTA	CHILIBRE		20	4		3		1	lesiones ulcerativas de bordes elevados y eritematosos.
C-16-116	F	36	PANAMA OESTE, CHORRERA, BARRIO COLON	PANAMA OESTE, CAPIRA	PANAMA OESTE	60	2		2			lesiones con úlcera central y bordes elevados
C-16-122	M	1	PANAMA, BETHANIA	BOCAS DEL TORO	BOCAS DEL TORO	60	2	1	1			lesiones ulcerativas escara necrótica y lesiones satelitales. La lesión facial es ulcerativa de bordes eritematosos, elevados.
C-17-15	M	31	PANAMA, PANAMA, CHILIBRE			30	1				1	lesión ulcerativa de bordes elevados
C-17-20	F	8	PANAMA OESTE, LA CHORRERA,	EL CACAO, CAPIRA	PANAMA OESTE	90	1		1			Lesiones cicatriciales, hiperpigmentadas (previamente ulceradas) en ambas piernas con lesiones satelitales múltiples nodulares, de centro costroso.
C-17-24	M	29	COCLE, AGUADULCE	PENONOME ADENTRO	COCLE	30						lesiones ulcerativas asociada a dermatitis por contacto probablemente secundaria a vendaje y rash en región superior a la lesión
C-17-25	F	54	COLON, SALAMANCA	COLON	COLON	15	1				1	placa eritematosa, no ulcerativa.

C-17-27	M	33	PANAMA, CERRO AZUL, ALTOS DE PACORA			30	2	1		1	lesiones ulcerativas, de bordes elevados, eritematosos, con datos de sobreinfección bacteriana, asociado a adenopatías en zona pre-auricular y axilar
C-17-30	M	65	PANAMA OESTE, ARRAIJAN	CERRO AZUL	PANAMA	120	1		1		Úlceras bordes elevados asociada a aumento de temperatura, eritema, dolor y edema, también asociado a adenopatías regionales.
C-17-32	M	33	PANAMA, CERRO AZUL	CERRO AZUL	PANAMA	30	1	1		1	lesiones ulcerativas, de bordes elevados, eritematosos, con datos de sobreinfección bacteriana, asociado a adenopatías en zona preauricular y axilar
C-17-35	M	46	PANAMA, PANAMA, 24 DE DICIEMBRE	ALTOS DE PACORA	PANAMA	60	1			1	lesión ulcerativa asociado a dolor en extremidad superior derecha y linfadenopatía.
C-17-39	F	22	PANAMA, 24 DE DICIEMBRE	QUEBRADA FEA	DARIEN	90					lesiones ulcerativas costrosas en mano izquierda y codo derecho, con eritema, secreción purulenta y calor (signos de sobreinfección bacteriana).

C-17-40	F	63	COCLE, EL VALLE DE ANTON	EL VALLE	COCLE	30				1	lesiones ulcerativas, de base costrosa, de bordes elevados y signos de sobreinfección.
C-17-49	M	18	COLON, COLON, SAN JUAN, NUEVO VIGIA	SAN JUAN	COLON	30				1	
C-17-53	M	11	PANAMA OESTE, LA CHORRERA, LA CHORRERA	LA CHORRERA	PANAMA OESTE	90					
C-17-80	F	11	PANAMA OESTE, CAPIRA, CACAO	CACAO	PANAMA OESTE	60				1	
C-17-84	M	56	DARIEN, PINOGANA, METETI	METETI	DARIEN	45				1	
C-17-89	F	30	PANAMA, CHEPO, CHEPO	CHEPO	PANAMA	16				1	
C-17-91	M	69	PANAMA, PANAMA, PACORA	DARIEN, AGUAS FRIAS	DARIEN	30	2				2
C-17-97	F	17	PANAMA OESTE, CHAME, BUENOS AIRES	CHAME	PANAMA OESTE						
C-17-100	M	31	PANAMA, MAÑANITAS, SAN JOSE			60	3			1	2
C-17-101	M	2	PANAMA OESTE, CAPIRA, CACAO	CACAO	PANAMA OESTE	30	1	1			
C-17-103	M	4	PANAMA, PANAMA, LAS MAÑANITAS	PENONOME	COCLE	60	1				1
C-17-115	M	5	PANAMA, CHEPO, EL LLANO	EL LLANO	PANAMA	45	1				1
C-17-116	M	1	PANAMA, CHEPO, EL LLANO	EL LLANO	PANAMA	30	1				1
C-17-118	F	66	PANAMA OESTE, CHAME, CHICA	CHICA	PANAMA OESTE	30	1				
C-17-120	M	33	CHIRIQUI, CHIRQUI, DAVID	JAQUE, PIRRA	DARIEN	26	1			1	
C-17-127	F	3	PANAMA OESTE, CAPIRA	CAPIRA	PANAMA OESTE	25	1			1	
C-17-128	F	22	PANAMA, TORRIJOS CARTER, BELISARIO	COLON	COLON	30					
C-17-130	M	32	PANAMA, PANAMA, CHILIBRE	CHILIBRE	PANAMA	60					
C-17-133	M	54	PANAMA, PANAMA, TOCUMEN	BAYANO	PANAMA	16	2	2			

C-17-135	M	32	PANAMA, PANAMA, PACORA	BOQUETE, CHIRIQUI, LA CHORRERA	CHIRIQUI	16	3		2	1
C-17-150	M	62	PANAMA, SAN MIGUELITO, BELISARIO FRIA	BOLDESA	PANAMA OESTE	60	3	2		1
C-18-20	M	21	PANAMA OESTE, CHAME, CHICA	CHICA	PANAMA OESTE	30	1		1	
C-18-24	M	30	PANAMA OESTE, LA CHORRERA, HERREA	COLON	COLON	45	1		1	
C-18-29	M	2	PANAMA, PANAMA, 24 DE DICIEMBRE	NATÁ DE LOS CABALLEROS	COCLE	30	1		1	
C-18-33	F	22	PANAMA OESTE, LA CHORRERA	PENONOME	COCLE	30				
C-18-42	M	25	PANAMA, LA CHORRERA	KUNA YALA	KUNA YALA	30	1		1	
C-18-49	M	7	PANAMA, PANAMA, PACORA	CAPIRA	PANAMA OESTE	30	1		1	
C-18-56	M	67	COLON, COLON, NUEVO SAN JUAN	SAN JUAN	COLON	15	1			1
C-18-58	F	28	COLON, COLON, CRISTOBAL	COSTA DE COLON	COLON	8	1		1	
C-18-61	M	14	PANAMA, PANAMA, ALCALDE DIAZ	COLON, QUEBRADA BONITA	COLON	60	1			1
C-18-66	M	35	PANAMA OESTE, CAPIRA, LIDICE	LA CHORRERA	PANAMA OESTE	365				
C-18-81	M	79	PANAMA, PANAMA, TOCUMEN	TOCUMEN	PANAMA	270	1		1	
C-18-86	M	31	PANAMA, PANAMA, 24 DE DICIEMBRE	COLOMBIA, CANADA, TURQUIA	PANAMA	45	1		1	
C-18-94	F	21	PANAMA, PANAMA 24 DE DICIEMBRE	CERRO AZUL	PANAMA	30	1		1	
C-18-99	F	65	COLON, COLON, NUEVO SAN JUAN	LOS SANTOS	LOS SANTOS	30	1		1	
C-18-114	F	25	PANAMA OESTE, ARRAIJAN, NUEVO EMPERADOR	CAPIRA	PANAMA OESTE	60	1		1	
C-18-118	F	27	PANAMA, SAN MIGUELITO, BELISARIO FRIAS	PANAMA OESTE, CHAME NUEVA GORGONA	PANAMA OESTE	60	1	1		

C-18-120	M	28	PANAMA OESTE, LA CHORRERA, GUADALUPE	PANAMA OESTE, CAPIRA, CIRI GRANDE; GASPARILLAL	PANAMA OESTE	30	1				1
C-18-133	M	29	PANAMA OESTE, ARRAIJAN, BURUNGA	SANTA FE VERAGUAS	DARIEN	30	1		1		
C-18-139	M	14	PANAMA OESTE, CAPIRA, EL CACAO	CACAO	PANAMA OESTE	30	1		1		
C-18-245	F	6	CHIRIQUI, GUALACA, GUALACA	METETI	DARIEN	30	1				1
C-18-247	M	8	PANAMA, PANAMA, ANCON	ANCON	PANAMA	90	1	1			
C-18-278	F	4	COLON, COLON, LIMON	EL LIMON	COLON	90	1				1
C-18-282	M	9	PANAMA, PANAMA, ALCADIA DIAZ	CHIMAN	PANAMA	45	5	1	2	1	1
C-18-287	F	63	PANAMA, PANAMA, LAS MAÑANITAS	RIO INDIIO	PANAMA OESTE	60	1				1
C-18-289	F	57	PANAMA, SAN MIGUELITO, BELISARIO PORRRAS	SALAMANCA	COLON	75	2		2		
C-18-308	F	2	PANAMA, PNAMA, BELLA VISTA	SANTA FE	VERAGUAS	30	1				1
C-18-311	M	28	PANAMA OESTE, ARRAIJUAN, SANTA CLARA	SANTA CLARA	PANAMA OESTE	30	2		2		
C-18-343	F	1	PANAMA OESTE, ARRAIJAN, SANTA CLARA	SANTA CLARA	PANAMA OESTE	27	1				1
C-18-345	F	52	PANAMA OESTE, CAPIRA, SANTA ROSA	CAPIRA	PANAMA OESTE	30					
C-18-347	F	68	PANAMA OESTE, CAPIRA, CACAO	CACAO	PANAMA OESTE	45	1				1
C-18-350	F	34	COLON, CHAGRES, GUASIMO	CHAGRES	COLON	45	4		1		3
C-18-356	F	0	PANAMA, PANAMA, TOCUMEN	24 DE DICIEMBRE	PANAMA	90	1				1
C-18-381	M	29	PANAMA OESTE, ARRAIJAN, SANTA CLARA	SANTA CLARA	PANAMA OESTE	30					
C-18-391	M	24	PANAMA, PANAMA, CHILIBRE	LAGO ALAJUELA	PANAMA	45	1	1			
C-18-393	F	21	COLON, COLON, BUENA VISTA	BUENA VISTA	COLON	1095	1				1

C-19-02	F	8	PANAMA, PANAMA, 24 DE DICIEMBRE	CERRO AZUL	PANAMA	365	3		3
C-19-08	M	23	COLON, COLON, RIO GATUN	RIO GATUN	COLON	45	4	1	3
C-19-13	M	43	PANAMA OESTE, CAPIRA, CIRI GRANDE	CAPIRA	PANAMA OESTE	180			
C-19-19	M	27	CHIRIQUI, DAVID, BOQUERON	METETI	DARIEN	90	1	1	
C-19-49	M	4	PANAMA OESTE, CAPIRA, CACAO	CACAO	PANAMA OESTE	60			
C-19-77	M	4	PANAMA, PANAMA, MAÑANITAS	SANTA FE	VERAGUAS	45	1		1
C-19-86	M	29	PANAMA, CHEPO, CHEPO	EL VALLE	COCLE	30			
C-19-113	M	68	PANAMA OESTE, SAN CARLOS, EL ESPINO	SAN CARLOS	PANAMA OESTE	120			
C-19-118	M	29	PANAMA, PANAMA, ANCON	ANCON	PANAMA	30	1		1
C-19-125	F	7	COLON, COLON, COLON	COSTA ARRIBA	COLON	30			
C-19-129	M	50	PANAMA, PANAMA, CHILIBRE	CHILIBRE	PANAMA	120	1		1
C-19-131	M	71	PANAMA, PANAMA, ANCON	CHEPO	PANAMA	45			
C-19-151	M	40	PANAMA, PANAMA, ERNESTO CORDOBA	CIRICITO	PANAMA OESTE	90	4		4
C-19-155	M	26	COCLE, PENONOME, TULU	PENONOME	COCLE	365	1	1	
C-19-156	M	28	PANAMA, SAN MIGUELITO, CORREDOR DE LOS POBRES	SAN MIGUELITO	PANAMA	60	1		1
C-19-167	F	10	PANAMA, PANAMA, SAN FRANCISCO	SIERRA LLORONA	COLON	60	1		1
C-19-183	F	56	PANAMA, PANAMA, JUAN DIAZ	KUNA YALA	KUNA YALA	75			
C-19-229	M		COLON, COLON, SAN JUAN	SALAMANCA	COLON	60	1		1
C-19-276	M	57	PANAMA, CHAME, SORA	SORA	PANAMA OESTE	300	14		14
C-19-301	F	19	COLON, COLON, SALAMANCA	SALAMANCA	COLON	90	1		1

C-19-304	M	43	PANAMA, PANAMA, PACORA	CHEPO	PANAMA	60	1	1	úlceras de fondo eritematoso, bordes definidos, regulares, aplanados, hiperpigmentados, con edema y calor perilesional, de 5 x 2.8 cm, y se palpa tracto de flebitis, indurado, doloroso, ascendente hacia región inguinal derecha.
C-19-315	F	15	PANAMA, SAN MIGUELITO, JOSE DOMINGO ESPINAR	LOS SANTOS	LOS SANTOS	30	1	1	Ulceración en cara lateral de pierna izquierda con bordes fijos, levemente elevados, con base con fibrina, y bordes friables, con eritema leve perilesional. Sin secreciones.

C-19-316	M	26	PANAMA, SAN MIGUELITO, TORRIJOS CARTER	BUENA VISTA	COLON	60	1	1	Se observa úlcera circunscrita, de fondo eritematoso, costroso, algo sucio, con bordes eritematosos, elevados, de aprox. 3 x 3 cm en región lateral distal de pierna izquierda, justo por encima del tobillo, caliente a la palpación, con leve dolor a la manipulación, sin secreción purulenta o sangrado. También se palpan #4 adenopatías en línea tibial anterior.
----------	---	----	--	-------------	-------	----	---	---	---

Anexo 6. Tabla de datos de muestras secuenciadas

NUMERO	MUESTRA	RFLP	FILOGENIA	AÑO	UBICACIÓN GEOGRÁFICA	# DE LESIONES	TIEMPO DE EVOLUCION	Cara/Cuello	Piernas	Abdomen	Espalda	Brazos
1	C-15-169	<i>L. panamensis</i>	<i>L. panamensis</i>	2015	PANAMA	1	30		1			
2	C-16-01	<i>L. panamensis</i>	<i>L. panamensis</i>	2016	PANAMA	6	60					6
3	C-16-14	<i>L. guyanensis</i>	<i>Leishmania sp. 1</i>	2016	PANAMA		30					
4	C-16-16	<i>L. guyanensis</i>	<i>Leishmania sp. 1</i>	2016	PANAMA	1	45					1
5	C-16-54	<i>L. guyanensis</i>	<i>Leishmania sp. 1</i>	2016	PANAMA	2	30	2				
6	C-16-70	<i>L. guyanensis</i>	<i>Leishmania sp. 1</i>	2016	PANAMA OESTE	1	21					1
7	C-16-73	<i>L. guyanensis</i>		2016	PANAMA	1	60		1			
8	C-16-93	<i>L. guyanensis</i>		2016	PANAMA		20					
9	C-16-108	<i>L. guyanensis</i>		2016	COLON		20					
10	C-16-109	<i>L. guyanensis</i>		2016	COLON	4	20		3			1
11	C-16-122	<i>L. panamensis</i>	<i>L. panamensis</i>	2016	PANAMA	2	60	1	1			
12	C-17-24	<i>L. panamensis</i>	<i>L. panamensis</i>	2017	COCLE		30					
13	C-17-39	<i>L. guyanensis</i>	<i>Leishmania sp. 1</i>	2017	PANAMA		90					
14	C-17-40	<i>L. panamensis</i>	<i>L. panamensis</i>	2017	COCLE		30					1
15	C-17-49	<i>L. guyanensis</i>	<i>Leishmania sp. 1</i>	2017	COLON		30		1			
16	C-17-53	<i>L. panamensis</i>	<i>L. panamensis</i>	2017	PANAMA OESTE		90					
17	C-17-91	<i>L. panamensis</i>	<i>L. panamensis</i>	2017	PANAMA	2	30					2
18	C-17-97	<i>L. panamensis</i>	<i>L. panamensis</i>	2017	PANAMA OESTE							
19	C-17-101	<i>L. guyanensis</i>	<i>Leishmania sp. 1</i>	2017	PANAMA OESTE	1	30	1				

20	C-17-103	<i>L. panamensis</i>	<i>L. panamensis</i>	2017	PANAMA	1	60					1
21	C-17-115	<i>L. panamensis</i>	<i>L. panamensis</i>	2017	PANAMA	1	45					1
22	C-17-116	<i>L. panamensis</i>	<i>L. panamensis</i>	2017	PANAMA	1	30					1
23	C-17-120	<i>L. panamensis</i>	<i>L. panamensis</i>	2017	CHIRIQUI	1	26		1			
24	C-18-29	<i>L. guyanensis</i>	<i>Leishmania sp. 1</i>	2018	PANAMA	1	30		1			
25	C-18-33	<i>L. panamensis</i>	<i>L. panamensis</i>	2018	PANAMA OESTE		30					
26	C-18-49	<i>L. guyanensis</i>	<i>Leishmania sp. 1</i>	2018	PANAMA	1	30		1			
27	C-18-56	<i>L. guyanensis</i>		2018	COLON	1	15					1
28	C-18-58	<i>L. panamensis</i>	<i>L. panamensis</i>	2018	COLON	1	8		1			
29	C-18-61	<i>L. panamensis</i>	<i>L. panamensis</i>	2018	PANAMA	1	60					1
31	C-18-278	<i>L. guyanensis</i>	<i>Leishmania sp. 1</i>	2018	COLON	1	90					1
32	C-18-287	<i>L. panamensis</i>	<i>L. panamensis</i>	2018	PANAMA	1	60					1
33	C-18-289	<i>L. guyanensis</i>		2018	COLON	2	75			2		
34	C-18-311	<i>L. panamensis</i>	<i>L. panamensis</i>	2018	PANAMA OESTE	2	30		2			
35	C-18-343	<i>L. panamensis</i>	<i>L. panamensis</i>	2018	PANAMA OESTE	1	27					1
36	C-18-345	<i>L. panamensis</i>	<i>L. panamensis</i>	2018	PANAMA OESTE		30					
37	C-18-350	<i>L. panamensis</i>	<i>L. panamensis</i>	2018	COLON	4	45		1			3
38	C-18-391	<i>L. guyanensis</i>	<i>Leishmania sp. 1</i>	2018	PANAMA	1	45	1				
39	C-19-02	<i>L. panamensis</i>	<i>L. panamensis</i>	2019	PANAMA	3	365					3

Anexo 7. Gráfico Boxplot del umbral de ciclos (ct) de frotis con diferentes concentraciones de amastigotes

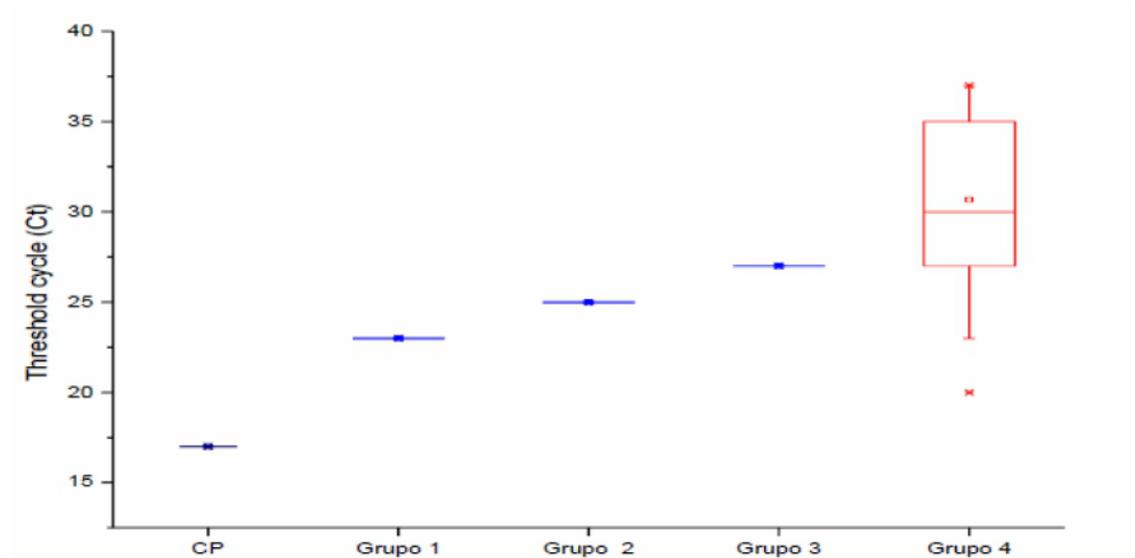


Gráfico Boxplot del umbral de ciclos (ct) de frotis con diferentes concentraciones de amastigotes (cruces) CP=control positivo, Grupo1=frotis3+, Grupo2=frotis2+, Grupo3=frotis1+ yGrupo4=Frotis negativos (DE= $\pm 4$ )

## COMITÉ DE BIOÉTICA DE LA INVESTIGACIÓN

N° 472/CBI/ICGES/20  
25 de noviembre de 2020

Licenciada  
**ADELYS REINA**  
Investigadora Principal

P/C:

  
**DR. JUAN M. PASCALE**  
Director General del ICGES



Estimada Licda. Reina:

El Comité de Bioética de la Investigación del ICGES, en su sesión del 25 de noviembre de 2020, aprobó la renovación por 1 año de vigencia a partir del 19 de noviembre de 2020 del Protocolo "Caracterización Molecular de Parásitos del género *Leishmania* en lesiones cutáneas con Frotis y cultivos negativos". Esta renovación está basada en el reporte de progreso del estudio presentado a este Comité el 17 de noviembre de 2020.

Se considera extensión de la vigencia de los siguientes documentos:

- **Protocolo Caracterización Molecular de Parásitos del género *Leishmania* en lesiones cutáneas con Frotis y cultivos negativos. Versión 2. Fecha noviembre 19, 2019.**

Le recordamos que esta aprobación estará vigente de 19 de noviembre de 2020 al 19 de noviembre de 2021.

Igualmente les informamos que una vez expire la vigencia de esta aprobación sin que se haya cumplido con los requisitos de la renovación anual, los investigadores deberán detener cualquier actividad de investigación relacionada con este protocolo.

Le recordamos que la fecha de Renovación Anual es la fecha de emisión de la nota de aprobación inicial del estudio de investigación y que para solicitar la renovación anual debe ser entregada entre 60 a 30 días antes de la fecha de vencimiento, que es la fecha de emisión de la primera aprobación del protocolo por el CBI-ICGES.

**NOTA:** En el informe anual indican que se evaluarán 130 muestras de ADN procedentes de lesiones de LC de pacientes que hayan asistido a la Clínica de Medicina Tropical del ICGES en los últimos 4 años y que no se han realizado cambios mayores en el protocolo, solo en la cantidad de muestras ya que fue un requisito solicitado por el financiador. Sin embargo, en el protocolo aprobado inicialmente indican que serán 100 muestras.

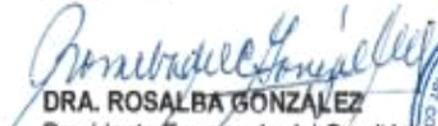
El Comité de Bioética le recuerda que todo cambio realizado al protocolo requiere una enmienda al protocolo y someterlo a aprobación por parte del CBI-ICGES. Por lo tanto, quedamos a la espera de la enmienda al protocolo indicando el aumento de las muestras usadas para el estudio.

**COMITÉ DE BIOÉTICA DE LA INVESTIGACIÓN**

N° 472/CBI/ICGES/20  
25 de noviembre de 2020

Agradeciendo la atención prestada a la presente me despido con la seguridad de mi mayor consideración y respeto

Atentamente,

  
**DRA. ROSALBA GONZÁLEZ**  
Presidenta Encargada del Comité de Bioética de la  
Investigación del Instituto Conmemorativo  
Gorgas de Estudios de la Salud

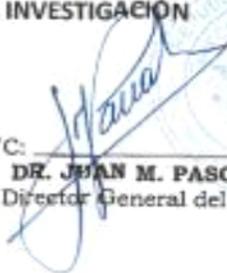


**IGORGAS** | INSTITUTO CONMEMORATIVO GORGAS  
DE ESTUDIOS DE LA SALUD (1928)

**COMITÉ DE BIOÉTICA DE LA INVESTIGACIÓN**

N° 733/CBI/ICGES/19  
19 de noviembre de 2019

Licenciada  
**ADELYS REINA**  
Investigadora Principal

P/C:   
**DR. JUAN M. PASCALE**  
Director General del ICGES



Estimada Licda. Reina:

Reciba un cordial saludo. El Comité de Bioética de la Investigación del Instituto Conmemorativo Gorgas de Estudios de la Salud (CBI-ICGES) en Revisión expedita, evaluó el protocolo "Caracterización molecular de parásitos del género *Leishmania* en lesiones cutáneas con frotis y cultivo negativo" y decidió la aprobación del siguiente documento:

- **Protocolo** Caracterización molecular de parásitos del género *Leishmania* en lesiones cutáneas con frotis y cultivo negativo. Versión 2, con fecha 19 de noviembre de 2019.

La aprobación emitida tiene una vigencia de 1 año a partir de la presente nota, hasta: 19 de noviembre de 2020, por lo que deberá oportunamente consultar sobre los requisitos para obtener la Renovación Anual antes del término del año establecido en esta nota.

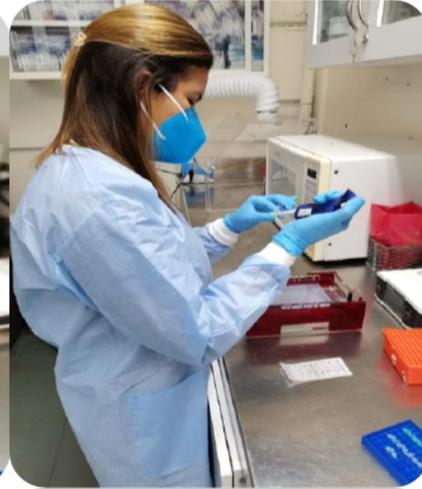
Igualmente le informamos que una vez expire la vigencia de esta aprobación sin que se haya cumplido con los requisitos de la renovación anual, los investigadores deberán detener cualquier actividad de investigación relacionada con este protocolo.

Agradeciendo la atención prestada a la presente me despido con la seguridad de mi mayor consideración y respeto.

Atentamente,

  
**DRA. MARÍA EUGENIA B. DE ANTINORI**  
Presidenta del Comité de Bioética de la  
Investigación del Instituto Conmemorativo  
Gorgas de Estudios de la Salud





*Anexo 10. Cargando gel de agarosa para el RFLP.*



*Anexo 11. Cortando bandas en el gel para la purificación del fragmento.*