



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Facultad de Medicina

Escuela Profesional de Tecnología Médica

**PCR en tiempo real y análisis de fusión de alta
resolución de amplicones obtenidos de cebadores
dirigidos al minicírculo del kinetoplasto para la
detección de Leishmania**

TESIS

Para optar el Título Profesional de Licenciado en Tecnología
Médica en el área de Laboratorio Clínico y Anatomía Patológica

AUTOR

Julio Jairzinho MONTOYA ALVARADO

ASESOR

Carlos Raúl SEVILLA ANDRADE

Lima, Perú

2023



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Montoya J. PCR en tiempo real y análisis de fusión de alta resolución de amplicones obtenidos de cebadores dirigidos al minicírculo del kinetoplasto para la detección de *Leishmania* [Tesis de pregrado]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Medicina, Escuela Profesional de Tecnología Médica; 2023.

Metadatos complementarios

Datos de autor	
Nombres y apellidos	Julio Jairzinho Montoya Alvarado.
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	70011052
URL de ORCID	https://orcid.org/0009-0008-7674-0247
Datos de asesor	
Nombres y apellidos	Carlos Raúl Sevilla Andrade
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	16009552
URL de ORCID	https://orcid.org/0000-0001-9938-9922
Datos del jurado	
Presidente del jurado	
Nombres y apellidos	Heli Jaime Barrón Pastor
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	09793154
Miembro del jurado 1	
Nombres y apellidos	Elizabeth Irene Pareja Cuadros
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	09210124
Miembro del jurado 2	
Nombres y apellidos	Alina Floralía Huiza Franco De Ortiz
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	08640104
Datos de investigación	
Línea de investigación	B.1.4.2. Enfermedades transmitidas por vectores.

Grupo de investigación	Zoonosis Parasitarias Olvidadas-ZOOPAROL del VRIP/UNMSM Resistencia a los antimicrobianos MICRESIS del VRIP/UNMSM
Agencia de financiamiento	Sin financiamiento
Ubicación geográfica de la investigación	Edificio: Laboratorio de Epidemiología Molecular y Genética-LEMYG del Instituto de Medicina Tropical “Daniel A. Carrión” de la facultad de Medicina de la UNMSM-CITBM. País: Perú Departamento: Lima Provincia: Lima Distrito: Lima Jirón: José Santo Chocanos Número: 199 Latitud: -12.054039538754477 Longitud: -77.08712464628017
Año o rango de años en que se realizó la investigación	Octubre 2020-Mayo 2022
URL de disciplinas OCDE	Medicina tropical https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#3.03.06 Parasitología https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#3.03.07 Tecnología para la identificación y funcionamiento del ADN https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#3.04.03



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú, Decana de América

Facultad de Medicina

Escuela Profesional de Tecnología Médica

“Año de la unidad, la paz y el desarrollo”



Firmado digitalmente por SANDOVAL VEGAS Miguel Hernan FAU 20148092282 soft Motivo: Soy el autor del documento Fecha: 20.11.2023 12:54:11 -05:00

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS EN MODALIDAD VIRTUAL PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE LICENCIADO(A) EN TECNOLOGÍA MÉDICA EN EL ÁREA DE LABORATORIO CLÍNICO Y ANATOMÍA PATOLÓGICA

Conforme a lo estipulado en el Art. 113 inciso C del Estatuto de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (R.R. No. 03013-R-16) y Art. 45.2 de la Ley Universitaria 30220. El Jurado de Sustentación de Tesis nombrado por la Dirección de la Escuela Profesional de Tecnología Médica, conformado por los siguientes docentes:

- Presidente: Dr. Heli Jaime Barrón Pastor
- Miembros: Dra. Alina Floralía Huiza Franco De Ortiz
Lic. Elizabeth Irene Pareja Cuadros
- Asesor(a): Lic. Carlos Raúl Sevilla Andrade

Se reunieron en la ciudad de Lima, el día 17 de noviembre del 2023, siendo las 08:00 horas, procediendo a evaluar la Sustentación de Tesis, titulado **“PCR en tiempo real y análisis de fusión de alta resolución de amplicones obtenidos de cebadores dirigidos al minicírculo del kinetoplasto para la detección de Leishmania”**, para optar el Título Profesional de Licenciado en Tecnología Médica en el Área de Laboratorio Clínico y Anatomía Patológica del Señor:

Julio Jairzinho Montoya Alvarado

Habiendo obtenido el calificativo de:

.....19.....
(En números)

.....DIECINUEVE.....
(En letras)

Que corresponde a la mención de: ...SOBRESALIENTE.....

Quedando conforme con lo antes expuesto, se disponen a firmar la presente Acta.

.....
Presidente
Dr. Heli Jaime Barrón Pastor
D.N.I: 09793154

.....
Miembro
Dra. Alina Floralía Huiza Franco De Ortiz
D.N.I: 08640104

.....
Miembro
Lic. Elizabeth Irene Pareja Cuadros
D.N.I: 09210124

.....
Asesor(a) de Tesis
Lic. Carlos Raúl Sevilla Andrade
D.N.I: 16009552

Datos de plataforma virtual institucional del acto de sustentación:

https: <https://us02web.zoom.us/j/84899103453?pwd=WkEzR3drNEZlQlpnUkVvYS9RVzZUdz09>

ID:

Grabación archivada en:



Firmado digitalmente por IZAGUIRRE SOTOMAYOR Manuel Hernan FAU 20148092282 soft Motivo: Soy el autor del documento Fecha: 21.11.2023 12:02:34 -05:00



CERTIFICADO DE SIMILITUD

Yo **Carlos Raúl Sevilla Andrade** en mi condición de asesor acreditado con la **Resolución Decanal N° 001433-2020-D-FM/UNMSM** de la tesis de investigación, cuyo título es **“PCR en tiempo real y análisis de fusión de alta resolución de amplicones obtenidos de cebadores dirigidos al minicírculo del kinetoplasto para la detección de *Leishmania*”** presentado por el **bachiller Montoya Alvarado Juli** para optar el título de Lic. de Tecnología Médica en el área de Laboratorio Clínico y Anatomía Patológica CERTIFICO que se ha cumplido con lo establecido en la Directiva de Originalidad y de Similitud de Trabajos Académicos, de Investigación y Producción Intelectual. Según la revisión, análisis y evaluación mediante el software de similitud textual, el documento evaluado cuenta con el porcentaje de **4 %** de similitud, nivel **PERMITIDO** para continuar con los trámites correspondientes y para su **publicación en el repositorio institucional.**

Se emite el presente certificado en cumplimiento de lo establecido en las normas vigentes, como uno de los requisitos para la obtención del grado/ título/ especialidad correspondiente.

Firma del Asesor: _____

DNI: 16009552

Nombres y apellidos del asesor:

Carlos Raúl Sevilla Andrade

17/11/23



DEDICATORIA

“No esperes el momento ideal jamás llegará. Empieza con lo que tienes y ve consiguiendo más herramientas en el camino”, Napoleón Hill

A mis padres, Julio Cesar Montoya Tello y Lucia Alvarado Palomino, a mi hermano, Christian Cesar Montoya Alvarado, por el gran apoyo, gracias por sus ejemplos, confianza y esfuerzo incondicional para lograr ser un gran profesional.

Mis logros se los dedico a ustedes.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mis padres por los grandes esfuerzos y sacrificios para poder llevar una carrera universitaria. A mi hermano, Christian Montoya, por darme el soporte necesario en el transcurso de mi época universitaria.

Agradezco a mi hermanita, Jimena Montoya Alvarado quien es parte también de mi motivación de concluir esta etapa profesional, ser de ejemplo para ella e inspirarla a seguir una carrera universitaria.

Al Lic. TM. Carlos Raúl Sevilla, mi asesor, por su incondicional apoyo en el transcurso de mi tesis, a pesar de las circunstancias encontradas en el camino, por su tiempo y consejos para conseguir el anhelado título. Gracias licenciado por su ejemplo como persona que en el ámbito profesional me ha dado muchas herramientas para seguir adelante.

Al Mg. Juan Alejandro Almerco Franco por sus enseñanzas, consejos y sus conocimientos brindados en el desarrollo de mi tesis.

A la Lic. Cyntia Mariela Mayta Fernandez, por su compañía y motivación durante el proceso de mi tesis.

A la Dra. Alina Huiza, por permitirme ser parte de su proyecto y colaborar en el desarrollo de mi tesis.

Al Dr. Jorge Alarcón Villaverde, Director del Centro de Investigaciones Tecnológicas, Biomédicas y Medioambientales (CITBM), por el apoyo y facilidades en el LEMYG - CITBM para la ejecución de mi trabajo de tesis.

A la Bachiller en Lingüística Renatta Rebeca Raffaella Ortiz Huiza por el apoyo con la redacción de la presente tesis.

Agradezco a mi “Universidad Nacional Mayor de San Marcos,” Decana de América, por la educación de calidad brindada en todos mis años de estudio.

Agradezco al Centro de Investigaciones Tecnológicas, Biomédicas y Medioambientales - CITBM, por abrirme sus puertas de sus instalaciones para el desarrollo de mi tesis.

A los grupos de investigación: Zoonosis Parasitarias Olvidadas “ZOOPAROL” y “MICRESIS-resistencia a los antimicrobianos” del VRIP-UNMSM, por el respaldo brindado.

ÍNDICE

	Páginas
DEDICATORIA	III
AGRADECIMIENTOS	IV
ÍNDICE	VI
LISTA DE TABLAS.....	VIII
LISTA DE FIGURAS	IX
LISTA DE FOTOGRAFÍA.....	X
CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN	1
1.1. DESCRIPCIÓN DE LOS ANTECEDENTES.....	2
1.2. IMPORTANCIA DE LA INVESTIGACIÓN	6
1.3. OBJETIVOS	8
1.3.1. OBJETIVO GENERAL	8
1.3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	8
1.4. BASES TEÓRICAS.....	9
1.4.1. BASE TEÓRICA.....	9
1.4.2. DEFINICIÓN DE TÉRMINOS.....	26
1.4.3. FORMULACIÓN DE LA HIPÓTESIS	27
CAPÍTULO II: MÉTODOS	28
2.1. DISEÑO METODOLÓGICO	29
2.1.1. TIPO DE INVESTIGACIÓN	29
2.1.2. DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN	29
2.1.3. POBLACIÓN	29
2.1.4. MUESTRA Y MUESTREO.....	29
2.1.5. VARIABLES.....	29
2.1.6. TÉCNICAS E INSTRUMENTOS DE RECOLECCIÓN DE DATOS.....	30
2.1.7. PROCEDIMIENTOS Y ANÁLISIS DE DATOS:.....	31
2.1.8. CONSIDERACIONES ÉTICAS	33
CAPÍTULO III: RESULTADOS	34
3. RESULTADOS.....	35

CAPÍTULO IV: DISCUSIÓN	70
4. DISCUSIÓN	71
CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	76
5.1. CONCLUSIONES	77
5.2. RECOMENDACIONES	79
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	80
ANEXOS.....	91

LISTA DE TABLAS

- Tabla 1.** Comparación de los tiempos de latencia de los cultivos de *Leishmania*
- Tabla 2.** Comparación de los tiempos de generación de los cultivos de *Leishmania*.
- Tabla 3.** Secuencias de ADN de minicírculos de kinetoplasto *GenBank*.
- Tabla 4.** Revisión de cebadores hallados en la bibliografía.
- Tabla 5.** Homología entre las secuencias de los cebadores y de los minicírculos de *Leishmania* obtenidas del *GenBank* y confirmación de producto mediante PCR tiempo real o convencional.
- Tabla 6.** Cebadores restantes luego de la selección de las Tablas 4 y 5.
- Tabla 7.** Temperaturas de fusión de los cebadores evaluados.
- Tabla 8.** CT de todos los cultivos de *Leishmania* con cada cebador usado con una concentración de 100 ng de ADN.
- Tabla 9.** Límite de detección de los CT hallados
- Tabla 10.** Límite de detección de los cebadores usados a diferentes concentraciones y temperaturas de fusión con picos de fusión detectables
- Tabla 11.** Comparación de las temperaturas de fusión usando los cebadores PASSOS F-PASSOS R
- Tabla 12.** Comparación de las temperaturas de fusión halladas usando los cebadores PASSOS F-MP3H
- Tabla 13.** Temperaturas de fusión de los cebadores PASSOS F-PASSOS R frente al comportamiento parasitario (recuento y tiempo de generación)
- Tabla 14.** Temperaturas de fusión de los cebadores MP1L-MP3H frente al comportamiento parasitario (recuento y tiempo de generación)
- Tabla 15.** Temperaturas de fusión de los cebadores PASSOS F-MP3H frente al comportamiento parasitario (recuento y tiempo de generación)
- Tabla 16.** Condiciones de PCR- HRM para la amplificación de los cebadores empleados.

LISTA DE FIGURAS

Figura N° 1. Temperatura fusión (molécula de ADN dividida en 50% bicatenario y monocatenario)

Figura N° 2. Curva parasitaria de promastigotes de los cultivos almacenados en el IMT/DAC y el CITBM.

Figura N° 3. Esquema de los cebadores usados para la PCR HRM.

Figura N° 4. Curvas de fusión de los amplicones de 120 pb obtenidos de los 9 cultivos de *Leishmania* usando los cebadores PASSO F-PASSOS R.

Figura N° 5. Curvas de fusión de los amplicones de 70 pb obtenidos de los cultivos del C6 al C9 de *Leishmania* usando los cebadores MP3H-MP1L.

Figura N° 6. Curvas de fusión de los amplicones de 54 pb obtenidos de los cultivos C6 al C9 de *Leishmania* usando los cebadores PASSOS F-MP3H.

Figura N° 7. Curvas de fusión de los cebadores PASSOS F-PASSO R usando diferentes concentraciones de ADN del cultivo C5.

Figura N° 8. Curvas de fusión de los cebadores PASSOS F-PASSO R usando diferentes concentraciones de ADN del cultivo C6.

Figura N° 9. Curvas de fusión de los cebadores MP1L-MP3H usando diferentes concentraciones de ADN del cultivo C6.

Figura N° 10. Curvas de fusión de los cebadores PASSOS F-MP3H usando diferentes concentraciones de ADN del cultivo C6.

Figura N° 11. Temperaturas de fusión de los cebadores PASSOS F-PASSOS R de los cultivos de *Leishmania* C1 al C9.

Figura N° 12. Temperaturas de fusión de los cebadores MP1L-MP3H de los cultivos de *Leishmania* C6 al C9.

Figura N° 13. Temperaturas de fusión de los cebadores PASSOS F-MP3H de los cultivos de *Leishmania* C6 al C9.

LISTA DE FOTOGRAFÍA

Fotografía N° 1. Búsqueda de secuencias de minicírculo de kinetoplasto de *Leishmania* en el *GenBank*.

Fotografía N° 2. Región conservada y bloques de región conservada de *Leishmania*.

Fotografía N° 3. Electroforesis de los productos amplificados por los cebadores PASSOS F-PASSOS R.

Fotografía N° 4. Electroforesis de los productos amplificados por los cebadores MP1L-MP3H.

Fotografía N° 5. Electroforesis de los productos amplificados por los cebadores PASSOS F-MP3H.

Fotografía N° 6. Preparación del medio bifásico NNN modificado para la reactivación de los cultivos almacenados en el IMT/DAC y el CITBM.

Fotografía N° 7. Cámara de Neubauer con promastigotes de *Leishmania* viables para el recuento parasitario.

Fotografía N° 8. Cámara de Neubauer con promastigotes de *Leishmania* no viables para el recuento parasitario.

Fotografía N° 9. Cámara de Neubauer con presencia de rosetas de *Leishmania*.

Fotografía N° 10. Promastigotes de *Leishmania* (izquierda) y roseta (derecha) coloreados con Giemsa.

Fotografía N° 11. Batería para la extracción de ADN genómico de *Leishmania* (Presto™ Mini gDNA Bacteria Kit).

Fotografía N° 12. Proceso de pre PCR; preparación del MASTER MIX para la PCR HRM.

Fotografía N° 13. Colocación de los criotubos en el termociclador MiniOpticon Real Time PCR *System* para la PCR HRM.

RESUMEN

Introducción: Las pruebas de referencias para el diagnóstico diferencial de leishmaniosis para la detección de *Leishmania* presentan baja sensibilidad (microscopía) o son muy complejas y costosas cuando se quiere caracterizarlas mediante la electroforesis enzimática multilocus (MLEE). Las pruebas moleculares a pesar de no estar incluidas dentro de las pruebas de referencia, se usan ampliamente para el diagnóstico de leishmaniosis por su gran sensibilidad y especificidad; estos métodos discriminan tanto el género como el subgénero y, para determinar la especie, se emplea otros más complejos y costosos. Por ello, es importante usar métodos moleculares alternativos, económicos, rápidos que simplifiquen pasos y dianas moleculares con una gran expresión dentro del parásito. **Diseño:** Estudio cuantitativo, descriptivo, transversal no experimental. **Objetivo:** Evaluar el desempeño de la Reacción en Cadena de la Polimerasa a tiempo real y análisis de fusión alta resolución de amplicones obtenidos de cebadores dirigidos al minicírculo del kinetoplasto para la detección de *Leishmania*. **Método:** Se usó 9 cultivos almacenados (C1 a C9) de *Leishmania*, cuyo comportamiento de crecimiento fue evaluado *in vitro*. Para la PCR en tiempo real y análisis de fusión de alta resolución (PCR HRM), se seleccionaron cebadores empleados en la bibliografía. Con el ADN obtenido de los cultivos, se realizó la PCR HRM y se analizó las temperaturas de fusión halladas, además, se determinó el límite de detección mediante diluciones seriadas. **Resultado:** Los recuentos parasitarios de los cultivos C1 al C5 obtuvieron de 30 a 100 millones de parásitos por mL al inicio de la fase estacionaria, y los cultivos C6 al C9 alcanzaron recuentos cercanos al inóculo inicial de 500 parásitos por mL. Los cebadores seleccionados para la PCR HRM fueron los siguientes: MP1L-MP3H, PASSOS F-PASSOS R y PASSOS F-MP3H. A partir de la PCR HRM con los cebadores PASSOS F- PASSOS R, se obtuvo una T_m de 79.07 ± 0.03 °C con los cultivos C1 al C5 que correspondieron al subgénero *L. Leishmania* y con los cultivos C6 al C9 obtuvo un T_m de 80.81 ± 0.03 °C que correspondieron al subgénero *L. Viannia*. Con los cebadores MP1L-MP3H y los cultivos C6 al C9, se obtuvo una T_m de 80.44 ± 0.14 °C que correspondieron al subgénero *L. Viannia* que fueron evaluados a su vez con los cebadores PASSOS F-MP3H de lo cual resultó lo siguiente: T_m C6 de 77.45 ± 0.06 °C, C7 de 77.65 ± 0.12 °C, C8 de 77.60 ± 0.08 °C y C9 de 77.53 ± 0.05 °C. El límite de detección para los cebadores PASSOS F-PASSOS R con el cultivo correspondiente al subgénero *L. Viannia* fue de 100 pg que

equivale a 338.2 parásitos y con el cultivo del subgénero *L. Leishmania* fue de 100 fg o 0.57 de parásito. Con los cebadores MP1L-MP3H el límite de detección con el cultivo del subgénero *L. Viannia* fue de 1pg que equivale a 5.66 parásitos y con los cebadores PASSOS F-MP3H para el mismo subgénero el límite de detección fue de 10 pg o 56.6 parásitos. **Conclusiones:** Los cebadores seleccionados determinaron el género y subgénero de los 9 cultivos de *Leishmania*; los cebadores PASSOS F-PASSOS R a través de la PCR HRM determinaron en los cultivos utilizados los dos subgéneros *L. Leishmania* y *L. Viannia* con Tm diferentes entre estos dos grupos. Los cebadores MP1L-MP3H determinaron el subgénero *L. Viannia* en los cultivos C6 al C9 sin diferencias en sus Tm; y los cebadores PASSOS F-MP3H que amplificaron los cultivos C6 al C9 no hallaron diferencias concluyentes en sus Tm.

Palabras clave: PCR HRM, Tm (temperaturas de fusión), *Leishmania*, cebadores, minicírculo, kinetoplasto.

ABSTRACT

Introduction: The reference tests for the differential diagnosis of leishmaniasis for the detection of *Leishmania* have low sensitivity (microscopy) or are very complex and expensive when they are to be characterized using multilocus enzyme electrophoresis (MLEE). Molecular tests, despite not being included in the reference tests, are widely used for the diagnosis of leishmaniasis due to their great sensitivity and specificity; These methods discriminate both genus and subgenus and, to determine the species, more complex and expensive methods are used. Therefore, it is important to use alternative, economical, rapid molecular methods that simplify steps and molecular targets with high expression within the parasite. **Design:** Quantitative, descriptive, non-experimental cross-sectional study. **Objective:** To evaluate the performance of real-time Polymerase Chain Reaction and high-resolution melting analysis of amplicons obtained from primers directed to the kinetoplast minicircle for the detection of *Leishmania*. **Method:** Nine stored cultures (C1 to C9) of *Leishmania* were used, whose growth behavior was evaluated in vitro. For real-time PCR and high-resolution melting analysis (HRM PCR), primers used in the literature were selected. With the DNA obtained from the cultures, the HRM PCR was performed and the melting temperatures found were analyzed; in addition, the detection limit was determined through serial dilutions. **Result:** The parasite counts of cultures C1 to C5 obtained 30 to 100 million parasites per mL at the beginning of the stationary phase, and cultures C6 to C9 reached counts close to the initial inoculum of 500 parasites per mL. The primers selected for HRM PCR were as follows: MP1L-MP3H, PASSOS F-PASSOS R, and PASSOS F-MP3H. From the HRM PCR with the PASSOS F-PASSOS R primers, a T_m was obtained of 79.07 ± 0.03 °C with cultures C1 to C5 that corresponded to the subgenus *L. Leishmania* and with cultures C6 to C9 a T_m of 80.81 ± 0.03 °C that corresponded to the subgenus *L. Viannia*. With the MP1L-MP3H primers and the C6 to C9 cultures, a T_m of 80.44 ± 0.14 °C was obtained, which corresponded to the *L. Viannia* subgenus, which were evaluated in turn with the PASSOS F-MP3H primers, resulting in the following: T_m C6 of 77.45 ± 0.06 °C, C7 of 77.65 ± 0.12 °C, C8 of 77.60 ± 0.08 °C and C9 of 77.53 ± 0.05 °C. The detection limit for the PASSOS F-PASSOS R primers with the culture corresponding to the *L. Viannia* subgenus was 100 pg, which is equivalent to 338.2 parasites, and with the culture of the *L. Leishmania* subgenus, it was 100 fg or 0.57 parasites. With the MP1L-MP3H primers, the

detection limit with the culture of the *L. Viannia* subgenus was 1 pg, which is equivalent to 5.66 parasites, and with the PASSOS F-MP3H primers for the same subgenus, the detection limit was 10 pg or 56.6 parasites. **Conclusions:** The selected primers determined the genus and subgenus of the 9 *Leishmania* cultures; The PASSOS F-PASSOS R primers through HRM PCR determined in the cultures used the two subgenera *L. Leishmania* and *L. Viannia* with different T_m between these two groups. The MP1L-MP3H primers determined the *L. Viannia* subgenus in cultures C6 to C9 without differences in their T_m; and the PASSOS F-MP3H primers that amplified cultures C6 to C9 did not find conclusive differences in their T_m.

Keywords: PCR HRM, T_m (melting temperatures), *Leishmania*, primers, minicircle, kinetoplast.

CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN

1.1.DESCRIPCIÓN DE LOS ANTECEDENTES

La leishmaniosis está catalogada como una Enfermedad Tropical Desatendida (EDT)⁽¹⁻³⁾. Actualmente se estima entre 700 000 a 1 000 000 de nuevos casos al año; y el Perú es uno de los países donde se da entre 95% y el 90% de los casos que producen la manifestación cutánea y mucocutánea respectivamente⁽⁴⁾.

La leishmaniosis es una enfermedad parasitaria que en sus manifestaciones cutáneas y mucocutáneas, causan lesiones similares a las causadas por otros microorganismos. Las pruebas de referencia son la observación microscópica del parásito, al tomar una muestra de la lesión (observación directa); la observación del parásito, al extraer un pedazo de tejido (biopsia) seguido de una coloración con Hematoxilina y Eosina o la confirmación microscópica del crecimiento del parásito en un medio de cultivo donde se coloca un poco de la muestra de la lesión⁽⁵⁾. Estas pruebas tienen una baja sensibilidad condicionadas a una correcta toma de muestra (localización de la zona para la toma dentro de la lesión, material con la que se toma la muestra y previo aseo de la zona para evitar contaminación con otros microorganismos), a la carga parasitaria de la lesión y a la exigencia de estos parásitos para crecer en los medios de cultivos⁽⁶⁾.

Las pruebas moleculares, superan en cuanto a sensibilidad, a las pruebas de referencia e, incluso, su especificidad es muy buena. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) no solo ofrece la detección del parásito *Leishmania*, sino también identificar el subgénero y la especie, pues con una PCR convencional bastaría para saber el género o inclusive con 2 ensayos de PCR, el subgénero; llegar a conocer la especie involucra pasos más complejos y costosos⁽⁷⁾.

La PCR a tiempo real (*qPCR*) y análisis de alta resolución de las temperaturas de fusión (PCR HRM) es un método usado para identificar y discriminar entre los subgéneros y especies de *Leishmania*. A diferencia de los demás métodos basados en la PCR, la evaluación de las temperaturas de fusión no involucra procesos pos-PCR ni uso de sondas marcadas o electroforesis; todo se da en un solo ensayo a tapa cerrada⁽⁸⁾.

Diotallevi *et al.* en el 2020 evaluaron la utilidad de los cebadores MLF-MLR basados en las temperaturas de fusión; emplearon muestras humanas y caninas para la discriminación entre los subgéneros *Viannia* y *Leishmania*. Trabajaron a ciego con muestras caninas de leishmaniosis visceral y obtuvieron una sensibilidad del 95,6 % en médula ósea, y en muestras de sangre periférica 38,5 %. Se contó con cepas brasileñas con las cuales se obtuvo diferencia de temperaturas de fusión entre los subgéneros *Leishmania (Viannia)* (82.88 °C) y *Leishmania (Leishmania)* (84.20 °C). Además mediante las temperaturas de fusión se logró diferenciar entre la *Leishmania infantum* (84.83 °C) de la *Leishmania (L.) amazonensis* (84.20 °C)⁽⁹⁾.

En el estudio de Sevilha *et al.*, en el año 2018, se utilizó cebadores dirigidos al minicírculo para la evaluación de precisión de la qPCR en la cuantificación de ADNk en capas de piel de lesiones cutáneas de *Leishmania*. Para la cuantificación se realizó una curva estándar con diluciones de una cepa de referencia *Leishmania (V.) braziliensis*; para la compatibilidad de las curvas de fusión, se usaron cepas de referencias *Leishmania (V.) braziliensis* (Tm=77.69 °C), *Leishmania (L.) amazonensis* (Tm=78.03 °C) *Leishmania chagasi* (Tm=78.74 °C). Los autores determinaron que las capas superficiales de la piel (epidermis y dermis superior) contenían mucho más parásitos. En cuanto la sensibilidad, 30 de 40 pacientes diagnosticados con Leishmaniosis tegumentaria Americana (LTA) fueron positivos (75 %) mediante la qPCR al menos en una de las capas de piel de la lesión y, además, compatibles a *Leishmania (V.) braziliensis* en la curva de fusión confirmado por RFLP⁽¹⁰⁾.

En el estudio de Rojas (2017), se evaluó la presencia de infecciones naturales de *Leishmania* en garrapatas mediante el ensayo de PCR convencional e identificación de una de estas mediante la PCR HRM de ADN de kinetoplasto. De un total de 81 garrapatas de 6 especies diferentes, se logró la detección de *Leishmania* en 3 *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, de las cuales mediante el análisis de curvas de fusión, una de ellas tenía compatibilidad del 90.23 % con la curva de referencia

de *Leishmania (V.) guyanensis*; las otras 2 obtuvieron una variación mayor al 10 % por lo que se descartó la similitud con las curvas de fusión de las cepas de referencias usadas en este estudio⁽¹¹⁾.

En el año 2017, Gomes *et al.* evaluaron la sensibilidad y especificidad del ensayo de la PCR a tiempo real mediante SYBR Green y TaqMan usando cebadores que amplifican secuencias del minicírculo del kinetoplasto de *Leishmania* (par de cebadores MP1L-MP3H y otros dos cebadores con una sonda FAM). Las muestras que se analizaron para este estudio procedían de biopsias e hisopos con muestra de lesiones cutáneas y mucosas. Para la qPCR con SYBR Green en biopsias de lesiones en mucosas y cutáneas, se obtuvo una sensibilidad de 69.23 % y 75.86 % respectivamente. En la qPCR TaqMan, la sensibilidad en biopsias de lesión en mucosas fue de 46.15% y en las lesiones cutáneas, de 58.62 %. En cuanto a los resultados tomados con hisopos de lesiones en mucosas la qPCR con SYBR Green tuvo una sensibilidad de 50 % y en lesiones cutáneas fue de 94.44 %; con qPCR TaqMan en hisopados de lesiones en mucosas y cutáneas la sensibilidad fue de 42.86 % y 66.67 %, respectivamente. La especificidad de los 2 ensayos fue del 100 %; aunque no se da información de las temperaturas de fusión de las cepas de control que se usó en este estudio, se menciona el ciclo umbral de los cebadores MP1-L/MP3-H de las *Leishmania (V.) braziliensis* Ct=10.84; *Leishmania (V.) guyanensis* Ct=25.13 y *Trypanozoma cruzi* Ct=30.05⁽¹²⁾.

En el año 2014, Ceccarelli realizó un análisis de curva de fusión para la discriminación de los subgéneros *Leishmania (V.)* y *Leishmania (L.)* a partir de los cebadores MaryF-MaryR y MLF-MLR. Con el primer par de cebadores no se encontró una gran diferencia entre las temperaturas de fusión a nivel de subgéneros, a diferencia de los cebadores MLF-MLR con los que se diferenció entre los dos subgéneros con temperaturas fusión de 83.14 °C *Leishmania (L.)* y 84.14 °C *Leishmania (V.)*. Además, se observó diferencias en las temperaturas de fusión entre especies del subgénero *Leishmania (V.)* y un doble pico en *Leishmania infantum* que lo diferencia de *Leishmania (V.) amazonensis*.

Los cebadores MaryF-MaryR que amplifican un fragmento de *Leishmania infantum* amplificaron especies del nuevo mundo, lo que demuestra que existen subpoblaciones de minicírculos en las especies del nuevo mundo⁽¹³⁾.

En el estudio de Rojas *et al.* (2013) se usó cepa de referencia para evaluar la utilidad del análisis de curvas de fusión para diferenciar entre especies de *Leishmania*. Los cebadores empleados amplificaban la región conservada del minicírculo del kinetoplasto de 120 pb (OL1-OL2). Se obtuvo 4 grupos diferenciados mediante SYBR Green con temperaturas de fusión de: *Leishmania (V.) braziliensis* (81.1 °C), *Leishmania (V.) peruviana* (80.3 °C), *Leishmania (L.) amazonensis* (82.5 °C), *Leishmania (L.) mexicana* (83.1 °C). Con el fluoróforo EVA Green también se observó 4 grupos diferenciados con temperaturas de fusión de: *Leishmania (V.) braziliensis* (82.3 °C), *Leishmania (V.) peruviana* (81.5°C), *Leishmania (L.) amazonensis* (83.5°C), *Leishmania (L.) mexicana* (84.5°C)⁽¹⁴⁾.

En el año 2012 Pereira *et al.* demostraron que se puede discriminar entre los subgéneros de *Leishmania*, mediante la qPCR basada en SYBR Green dirigida a una región conservada de 120 pb del minicírculo del kinetoplasto, para lo cual se elaboró perfiles de fusión en cepas de referencias, obteniendo Tm. promedio de 78.95 °C para *Leishmania (L.) infantum* y *Leishmania (L.) amazonensis* y Tm. de 77.34 °C para *Leishmania (V.) braziliensis* y *Leishmania (V.) shawi*, posteriormente los autores añadieron los perfiles de fusión de *Leishmania (V.) guyanensis-naiffi-lainsoni* con una Tm. promedio de 77.3 °C. Además, corroboraron los perfiles de fusión de las cepas de referencias enfrentadas con el ADN de muestras clínicas y vectores infectados por *Leishmania* previamente identificados. Las muestras clínicas dermatópicas y vectores infectados con *Leishmania (V.) braziliensis* obtuvieron una Tm. de 77.68 °C y 77.25 °C, respectivamente. Para muestras clínicas de leishmaniosis visceral y vectores infectados con *Leishmania (L.) infantum*, las Tm. fueron de 78.94 °C y 78.98 °C respectivamente⁽¹⁵⁾.

1.2.IMPORTANCIA DE LA INVESTIGACIÓN

La leishmaniosis es una enfermedad muy compleja por su espectro clínico variado y los diferentes subgéneros y especies que contiene el protozooario *Leishmania*⁽¹⁶⁾. El diagnóstico de leishmaniosis requiere de la clínica y de pruebas de laboratorio, de las cuales el método de referencia, como se ha mencionado, es la observación microscópica del parásito (método parasitológico), la cual es altamente específica, pero su sensibilidad presenta mucha variación en diferentes publicaciones. Es cierto que, con el pasar de los años, se ha mejorado la técnica (recolección de muestra para frotis directo y biopsia), pero las sensibilidades halladas fluctúan de un 33 % hasta un 94%^(6,17,18). El aislamiento del parásito por cultivo es un método de larga duración e igualmente la sensibilidad reportada de diferentes estudios varía de un 20 % hasta un 70%^(17,19). Esta gran variación en la sensibilidad en los métodos de referencia, a pesar de su especificidad, genera el uso de otros métodos para la identificación de este parásito^(6,20,21).

Las pruebas moleculares detectan en muestras clínicas desde un parásito a fracciones de este, lo que equivale a fentogramos de ADN genómico, ribosomal o de kinetoplasto^(16,22). La sensibilidad de las pruebas moleculares específicamente la PCR, va desde un 70 % a un casi 100 % lo cual presenta una mejor sensibilidad en muestras cutáneas raspados, hisopados o biopsias a diferencia que en lesiones de mucosas (biopsias) o leishmaniosis visceral (biopsia de médula ósea). Sin embargo, esta metodología sigue siendo más sensible y con menos variación que la tradicional⁽¹⁶⁾.

Los métodos basados en la PCR convencional logran determinar el género o subgénero de *Leishmania*, la identificación de la especie se puede realizar mediante PCR RFLP (Fragmento de Restricción de Longitud Polimórfica), PCR *multiplex*, PCR con posterior secuenciamiento o también usando la PCR a tiempo real con sondas marcadas. Por ello la caracterización y tipificación del protozooario *Leishmania* implica un proceso complejo y costoso.

Usar las temperaturas de fusión a través de la PCR a tiempo real (PCR High resolution melting), a diferencia de los demás métodos basados en PCR, no involucra una digestión enzimática de restricción, sondas marcadas o electroforesis, además no lleva riesgo de contaminación. La fusión de alta resolución (HRM) ha sido empleada para genotipificar virus, bacterias, hongos, protozoarios, detección de polimorfismo de enfermedades genéticas, etc. El cambio de las temperaturas de fusión nos brinda información valiosa sobre la diferencia de nucleótido en regiones conservadas de diferentes especies de *Leishmania*; esto implica que al usar un par de cebadores se puede distinguir entre especies o subgéneros a partir de diferencias en las secuencias de sus amplicones^(7,23).

En el presente estudio, se usó el método PCR-HRM para la detección de *Leishmania* y, además, se escogió como blanco molecular las regiones conservadas de ADN del minicírculo del kinetoplasto, las cuales presentan de 10 000 a 20 000 copias dentro de un solo parásito, a diferencia de las dianas moleculares usadas en el genoma y el ribosoma con menor cantidad de copias⁽²²⁾. En fusión de tener un método sensible, con pocos pasos y usando menos insumos en el proceso.

1.3.OBJETIVOS

1.3.1. OBJETIVO GENERAL

Evaluar la Reacción en Cadena de la Polimerasa a tiempo real y el análisis de fusión de alta resolución, usando cebadores dirigidos al minicírculo del kinetoplasto, para la detección de *Leishmania* obtenidos de cultivos.

1.3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Seleccionar cebadores dirigidos al minicírculo del kinetoplasto para la detección *Leishmania*.
- Hallar las temperaturas de fusión de los amplicones generados por los cebadores dirigidos a los minicírculos del kinetoplasto de los cultivos de *Leishmania*.
- Evaluar similitudes o diferencias en las temperaturas de fusión de los amplicones obtenidos por los cebadores dirigidos al minicírculo del kinetoplasto de los cultivos de *Leishmania*.
- Determinar el límite de detección y especificidad de los cebadores seleccionados dirigidos al minicírculo del kinetoplasto para la detección de *Leishmania*.
- Evaluar el resultado de las temperaturas de fusión frente a la curva de crecimiento de los cultivos de *Leishmania*.

1.4.BASES TEÓRICAS

1.4.1. BASE TEÓRICA

Leishmania

DEFINICIÓN

Es un protozoo flagelado que parasita de forma intracelular en los macrófagos lográndose multiplicar dentro de estos⁽²⁴⁾. Pertenece al Phylum: *Euglenozoa*, Clase: *Kinetoplastea*, Orden: *Trypanosomatida*, Familia: *Trypanosomatidae* y Género: *Leishmania*. Este parásito tiene un ciclo de vida digenético o dimórfico, y sus hospederos son seres invertebrados (*Phlebotomus*, *Lutzomyia*) y vertebrados, como los mamíferos. Existen alrededor de 20 especies que son patógenas, divididas en tres subgéneros *Leishmania (L.)*, *Leishmania (V.)* y *Leishmania sauroleishmania*^(25,26).

LEISHMANIOSIS

HISTORIA

La leishmaniosis en el hombre data de tiempos antiguos antes de cristo (a. C.); esta enfermedad estuvo presente en el nuevo y en el viejo mundo. El parásito que provoca la leishmaniosis es un protozoo llamado *Leishmania* que se originó en África, aunque otros investigadores mencionan que fue en América. Existen varias teorías en cuanto a su evolución, pero todas ellas comparten que el ancestro común fue *Sauroleishmania*, protozoo hallado en hospederos reptilianos, del cual se separaron en los diferentes subgéneros y especies^(27,28).

LEISHMANIOSIS EN EL PERÚ

La leishmaniosis en el Perú se presentó en una momia peruana de hace 800 años a. C.; también, en los huacos retratos de la cultura Mochica y Chimú del año 330 a. C. al 500 d. C. y 1000 al 1400 d.C., respectivamente. En los años 1500 hacia adelante, muchos conquistadores observaron lesiones deformantes en la población indígena en los Andes. Más tarde la frecuencia de estas lesiones no solo afectaba a los indios sino a españoles de los Andes; esto dio a entender que se trataba de una enfermedad. En el año 1586, Fray Rodrigo la reconoció y la asoció a la ocupación y la geografía. Por otra parte, la identificación de la función de los flebótomos como agente transmisor fue mencionado por el cronista Bueno en el año 1764, quien también describió las llagas provocadas por este insecto. Los nativos denominaban a estas lesiones “UTA” proveniente de una palabra quechua que significa “picadura de mosquito”. La primera identificación de leishmaniosis en Perú se dio en el año 1911, por el médico peruano Escomel en un caso de “ESPUNDIA”. En la universidad de Harvard, en 1913, se determinó que la UTA era un tipo de leishmaniosis de forma cutánea y la ESPUNDIA, como la forma mucocutánea. Luego de estos hallazgos, muchos investigadores peruanos y americanos empezaron a realizar estudios del reconocimientos de nuevos subgéneros y especies de las zonas endémicas^(29,30).

LEISHMANIOSIS EN EL ORIENTE

La leishmaniosis en el viejo mundo fue conocida como “botón del Oriente”; fue encontrada en momias egipcias con leishmaniosis visceral desde 2050-1650 años a. C. y registrada en papiros. También se tiene información que los árabes inmunizaban en las nalgas, con las moscas de arenas o lesiones activas para evitar lesiones desfigurantes. En la edad media, se empezó la descripción del “botón o llaga oriental”, tal como lo hizo Avicena al norte de Afganistán. Los nombres que tomaba esta enfermedad eran variados, dependiendo de la región por lo que muchos científicos la describieron sin pensar que era la misma. El descubrimiento del agente etiológico de esta enfermedad generó la conclusión de que todas estas enfermedades, con una clínica similar, tenían como responsable el mismo parásito. Las primeras

descripciones de la morfología del parásito que causaba el “botón del Oriente” fueron hechas por Cunnighan en 1885, Firth en 1891 y Borowsky en 1898⁽³⁰⁾. Wright, un médico estadounidense, encontró en 1903 a este protozooario en los frotices de lesiones de una niña armenia, al cual describió su morfología, registró en microfotografías y lo denominó *Helcosoma tropicum*⁽²⁹⁾.

Fue Leishman, en 1903, quien encontró cuerpos redondos en frotis coloreadas con derivados de Romanowsky obtenidos del bazo de un soldado con esplenomegalia y los describió como una forma de tripanosomiasis. Más tarde Donovan, observó el mismo caso en un paciente con Kala Azar, trazó un dibujo y se lo envió a Leishman quien concluyó que era un nuevo parásito parecido al *Trypanosoma*, pero, en este caso, eran cuerpos ovales con forma de un *Trypanosoma* degenerado. Luego de varios debates entre los científicos, concluyeron que se trataba de un nuevo parásito al cual denominaron *Leishmania donovani*⁽³¹⁾.

El protozooario que encontró Wright terminó denominándose *Leishmania tropica* luego de que el protozooario cultivado, obtenido de una lesión ulcerosa (Botón de Alepo), tuviera una morfología parecida con el protozooario cultivado responsable de la enfermedad Kala Azar. El cambio del nombre de *Helcosoma tropicum* a *Leishmania tropica* fue hecho por Max Lühe en 1906. De esta manera, se identificaron las dos formas de presentación de la enfermedad: la visceral, hallada en el bazo del soldado descrita por Leishman, y las formas cutáneas encontradas en las lesiones como llagas y úlceras en la piel (Kala Azar)^(29,30).

LEISHMANIOSIS AMERICANA

A raíz de estos descubrimientos, se encontró la asociación entre el “botón del Oriente” y las lesiones dérmicas en nuestro continente. Investigadores, tales como Alexander Cerqueira de Brasil (1885), Indalecio Camacho (1889) y Miguel Canales (1894) de Colombia, consideraron que el “botón oriental”, y que las distintas denominaciones que había recibido en los países americanos se referían a la misma enfermedad.

Los investigadores, tanto en el viejo como en el nuevo mundo, empezaron a comparar si esta dermatitis americana no era más que la *Leishmania tropica* descrita por Wright.

Carlos Lindenberg (Brasil), Antonio Carini (Italia) y Paranhos (Brasil) describieron el parásito de una úlcera Bauru en Brasil y Alfonso Splendore, en lesiones mucocutáneas tomadas de espundia. Gaspar Viannia, al observar el mismo parásito de lesiones cutáneas, concluyó que no se trataba de *Leishmania tropica* por diferencias morfológicas, por lo que le dio el nombre de *lapsus calami Leishmania brazilienses* en 1909 por un error de transcripción inconsciente. Luego, fue corregido a *Leishmania (V.) braziliensis* por Alfredo Augusto da Matta en 1916⁽³⁰⁾.

El avance de la tecnología, especialmente de la biología molecular, ha permitido el descubrimiento de más especies de *Leishmania* a nivel mundial, y su clasificación taxonómica, con árboles genealógicos mucho más exactos y extensos^(29,30,32).

ORGANIZACIÓN GENÓMICA

El género *Leishmania* pertenece a la familia Trypanosomatidae, y su organización genómica se divide en ADN cromosómico en el núcleo, ADN del kinetoplasto formado por minicírculos y maxicírculos dentro de este, y ADN extracromosómico en el citoplasma⁽³³⁾.

El material genético de la *Leishmania* está organizado en cromosomas, aunque no se puedan ver mediante citogenética convencional, debido al corto periodo de división y la formación difusa de estos. Gracias a la introducción de la técnica de Electroforesis en Campo Pulsado, se encontró el cariotipo de la *Leishmania* en el cual se observa su complejidad y polimorfismo. En particular los cromosomas tienen tamaños de 150 kilobases (Kb) para los más pequeños y de 4 megabases (Mb) para los más grandes^(33,34).

El número de cromosomas en las *Leishmania* del viejo mundo (*Leishmania infantum*, *Leishmania major*) equivale a 36 cromosomas; y en las del nuevo mundo, 35 cromosomas, donde, para el complejo *Leishmania (V.) braziliensis*, se tiene fusiones

en los cromosomas 20 con 34 y en el complejo *Leishmania mexicana*, 34 cromosomas con fusiones en los cromosomas 8 con 29 y 20 con 36. A pesar de estos reordenamientos a gran escala en los cromosomas, la colinealidad de los genomas entre las diferentes especies de *Leishmania* es muy alta⁽³⁵⁾.

KINETOPLASTO

El kinetoplasto es una región especializada dentro de la mitocondria, compuesta por una red de moléculas de ADN de forma circular. Este kADN representa el 30 % de la totalidad del ADN de toda la célula⁽³⁶⁾ y está conformado por minicírculos y maxicírculos, los cuales están presentes en muchas copias dentro del kinetoplasto. Los minicírculos representan el 90 % del contenido del ADN del kinetoplasto, y codifican pequeños ARN guía que servirán para la edición de ARN. La cantidad de copias que se presentan dentro del kinetoplasto es de más de 10 000 copias con un tamaño de alrededor de 800 pb⁽³⁷⁻³⁹⁾. La cantidad de minicírculos es diferente en cada especie de *Leishmania* y entre ellas comparten diferentes poblaciones de minicírculos, por lo que se intenta clasificar a las especies mediante esta característica en un futuro. Las secuencias de minicírculos contienen una región conservada de 180 a 200 pb entre las diferentes especies de *Leishmania*, las cuales contienen tres bloques superconservados CSB: *conserved sequence blokcs*⁽³⁹⁾.

Los maxicírculos son moléculas de ADN circular dispuestas en menos de 100 copias y con tamaños de alrededor de 20 kb. Estos cumplen funciones energéticas en la mitocondria (Citocromo b) y ensamblan ARN funcionales. En la división celular, la división del kADN es crucial y debe ser precisa, pues la pérdida de algún minicírculo conllevaría a la falla de edición de los maxicírculos y, por ende, la muerte de la célula^(36,37).

MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO

MICROSCOPIA

Es el método considerado como el *Gold Standar* o método de referencia para el diagnóstico de leishmaniosis. Para lo cual se usa el colorante Giemsa derivado de Romanowsky. La muestra es un frotis tomada de la lesión ulcerosa para leishmaniosis cutánea o aspirado de bazo, médula o ganglio en caso de leishmaniosis visceral.

Este método tiene como ventajas que es muy sencillo, específico rentable y no demanda mucho tiempo; las desventajas son la baja sensibilidad (poca carga parasitaria), y poca información del tipo de *Leishmania*⁽⁴⁰⁾.

El analista debe tener pericia y examinar 2 frotices en 1 hora buscando los amastigotes en el frotis dentro de los macrófagos. Se recomienda, para mejorar la sensibilidad, tomar de dos lugares de la lesión en caso de leishmaniosis cutánea; en el borde y el fondo de la úlcera. En leishmaniosis mucocutánea, se requiere de la extracción de pequeños tejidos (biopsia) y del estudio histopatológico coloreado con Hematoxilina y Eosina, pues existe una mayor positividad cuando son lesiones mucosas múltiples que en lesiones mucosas únicas⁽⁴¹⁾.

CULTIVO

El cultivo de *Leishmania* es un método tradicional en el que el parásito debe crecer en un medio que puede ser monofásico o bifásico.

Los medios monofásicos son líquidos, cuyo principal ingrediente es el suero bovino fetal el cual está en concentraciones de 10 al 20 %; entre ellos tenemos al medio Eagle, MEM (*Minimal Essential Medium*), medio 199 TC, RPMI 1640 y Schneider. Los medios bifásicos contienen una fase sólida (agar) y una fase líquida; el primer medio bifásico usado fue el NNN (Novy MacNeal Nicolle), posteriormente se usó medios más nutritivos como el Medio de Agar Sangre USAMRU, medio de Senekjie, etc.⁽⁶⁾. La sensibilidad de los cultivos se ve limitada por la carga parasitaria, la contaminación muy frecuente, y la gran variedad de subgéneros y especies de

Leishmania, que no crecen de la misma manera. El tiempo de crecimiento puede variar de 15 a 30 días en un cultivo tradicional como el NNN.

La solución a estos problemas ha sido la administración de antibacterianos y antifúngicos, el enriquecimiento de estos medios modificados (medio mycoNNN) o la creación de nuevos medios de cultivos alternativos^(42,43). El microcultivo usando el medio NNN empleado en capilares mostró mejor sensibilidad que el método tradicional (71 % a 54 %); la desventaja era la extracción del parásito por el capilar y la solución fue el minicultivo que se realizó en un tubo de Eppendorf con un volumen de 1,5 mL. Este método obtuvo una sensibilidad menor que el microcultivo, pero mayor que el método tradicional; no obstante, ambos métodos reducen el tiempo de incubación de 2 a 14 días⁽⁴¹⁾.

Por otra parte, el cultivo de *Leishmania* usado para obtener material genético para estudios moleculares; debe tener los componentes adecuados que no alteren características como virulencia, infectividad y morfología de la *Leishmania*⁽⁴⁴⁾.

MÉTODOS DE BIOLOGÍA MOLECULAR

Existen diferentes métodos de biología molecular para la identificación de *Leishmania*; todos tratan de encontrar el ADN o ARN de este parásito. La utilidad de estos métodos se evidencia en la presencia de este aún si el parásito no es viable en la muestra. Los métodos moleculares pueden ser basados en PCR o no basados en PCR y los que son después de la PCR (pos-PCR)⁽⁴⁰⁾.

La Reacción de Cadena Polimerasa (PCR) y las variaciones de la PCR convencional como PCR anidada, PCR RFLP, PCR tiempo real, etc., son los métodos por mucho más sensibles y específicos que los métodos convencionales, como la microscopía y cultivo. La PCR se basa en reacciones enzimáticas por ciclos repetidos usando un termociclador, en el cual una enzima llamada *Taq* ADN polimerasa, en cada ciclo, logra amplificar una secuencia específica de ADN o ARN mediante la utilización de

cebadores (*forward* y *reverse*) que se dirigen exclusivamente a la secuencia diana, y logran obtener como producto millones de copias que denominan amplicones⁽⁴⁵⁾.

La PCR es una prueba muy útil para el diagnóstico de *Leishmania* en casos de poca carga parasitaria y muestras poco invasivas. Es utilizada para evaluar la curación clínica en leishmaniosis visceral, a excepción de leishmaniosis cutánea, en la cual los resultados pueden salir positivos hasta los 8 años de curación. Obtener información sobre epidemiología, mecanismo de resistencia y factores de virulencia⁽⁴⁶⁾.

Además de ello, la biología molecular se emplea para la búsqueda de los parásitos *Leishmania* en nuevos vectores (flebótomos) y reservorios; un ejemplo de esto son los perros, siendo un riesgo para la transmisión de leishmaniosis en su forma visceral^(47,48).

La detección de *Leishmania* por biología molecular se logra mediante el conocimiento del genoma. Los blancos moleculares utilizados son el ADN nuclear y el ADN del kinetoplasto, cuyos minicírculos presentan más copias por parásito, así se logra que las pruebas moleculares tengan mayor sensibilidad⁽⁴⁹⁾.

PCR *High Resolution Melting* (PCR HRM)

La PCR HRM es un método molecular alternativo derivado de la PCR a tiempo real, su uso creciente para tipificar diferentes microorganismos y caracterizar diferentes enfermedades ha sido el motivo para que se emplee como un nuevo método de diagnóstico de leishmaniosis⁽⁵⁰⁾.

El principio de este método se basa en la característica de la molécula de ADN. El ADN es una molécula bicatenario que está compuesta por dos cadenas simples unidas, cada una conformada por nucleótidos. Al enfrentar esta molécula de ADN a un aumento de temperatura se logra separar las dos cadenas simples gradualmente hasta su totalidad a lo que se le denomina desnaturalización, la temperatura de separación depende de los nucleótidos que la conforman y del tamaño de la molécula.

El análisis de fusión de alta resolución es una técnica que busca las diferencias de las temperaturas de fusión entre amplicones. Este método usa un colorante saturante que disminuye su fluorescencia a través del paso de doble cadena a cadena simple.

En el análisis de fusión pos *q*PCR la fluorescencia de los amplicones disminuye con la separación de las cadenas de ADN mientras aumenta la gradiente de temperatura. La temperatura de fusión dependerá del contenido de guanina y citosina, la complementariedad entre las cadenas de ADN o la longitud del amplicón.

Las curvas de fusión son analizadas con diferente software, que tienen en común normalizar las curvas para ser interpretadas; la tecnología HRM es usada para genotipificar microorganismos, virus, identificación de mutaciones, etc. Unas de las ventajas es el menor costo, rapidez y la no contaminación de la muestra (a tubo cerrado)^(51,52).

La metodología de la PCR HRM puede encontrar diferencias entre dos moléculas de ADN a partir de una sola base o nucleótido distinto entre ellas. Las curvas de temperatura de fusión generadas se interpretan como un aumento de fluorescencia cuando las cadenas de ADN están unidas completamente, y una disminución de la fluorescencia tras el aumento de la temperatura.

La temperatura de fusión se define cuando las cadenas de ADN estén en la proporción 50 % monocatenario y 50 % de forma bicatenario, es decir la mitad de la molécula de ADN debe tener las cadenas separadas. El colorante empleado es el mismo que se usa para la PCR a tiempo real; es un colorante intercalante que se une a la molécula de ADN en su estado bicatenario y detecta heteroduplex, aunque no todos tienen la misma sensibilidad, además, el más usado es el SYBR *Green* (Figura N° 1).

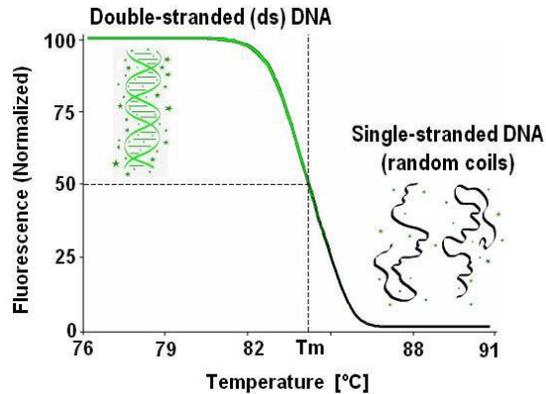


Figura N° 1. Temperatura fusión (molécula de ADN dividida en 50 % bicatenario y 50 % monocatenario).

Fuente: Imagen obtenida de DNA-UTAH⁽⁵³⁾

El SYBR *Green* es eficaz cuando existen grandes diferencias entre las temperaturas de fusión de los genotipos. Pese a ello, la detección de heterocigotos se puede realizar inclusive, aunque no se detecte los heteroduplex. Los tintes o colorantes de ADN elevan la temperatura de fusión, por lo que si el amplicón tiene una temperatura de fusión alta, se puede inhibir la separación de la molécula de ADN⁽²³⁾.

Es muy importante a la hora realizar la metodología de la PCR HRM, evaluar el tamaño del amplicón; pues uno muy grande disminuye la sensibilidad del método, ya que a más grande el amplicón más pequeñas son las diferencias halladas. Además, antes de la elección o el diseño de los cebadores se debe tener dos criterios en consideración el tamaño del producto y la presencia de polimorfismo en el amplicón a estudiar⁽⁵⁴⁾.

ANÁLISIS DE LAS TEMPERATURAS DE FUSIÓN

Luego de obtener los amplicones, estos pasan a una gradiente de temperatura para generar curvas de fusión. Los datos obtenidos son trasladados a un software de análisis de datos. Este *software* normaliza los datos muy variables a datos sencillos que coinciden con algún genotipo. Es importante que el *software* elimine el fondo de fluorescencia para una mejor comparación de las curvas de fusión⁽²³⁾.

CEBADORES USADOS PARA EL DIAGNÓSTICO DE LEISHMANIOSIS

Los cebadores usados para *Leishmania* pueden ser obtenidos de ADN nuclear o ADN del kinetoplasto. Los minicírculos dentro del kinetoplasto están dispuestos en una cantidad de 10 000 a 20 000 copias por cada parásito de *Leishmania*, por lo que son más sensibles en cuanto a detección en comparación con los genes de ARN ribosómico que contienen de 40 a 200 copias por parásito y el gen mini-exón del ADN nuclear de 100 a 200 copias.

Aquí presentamos los cebadores más usados para el diagnóstico de *Leishmania* y las sensibilidades y especificidades obtenidas por diferentes autores en sus respectivos estudios.

- ADN ribosomal

Los cebadores LV1 (*forward*) 5 'CGTCTTCCGGCAACATTT 3' y LV2 (*reverse*) 5 'CGTTAGTTGG AAGCCCAAGG 3' son genes mini-exón obtenidos del ADN nuclear que genera un producto de 177 pb; estos genes se encuentran en el genoma del parásito en un número de repeticiones de 200 copias en tándem. La sensibilidad de estos cebadores detecta mínimo 1,5 parásitos por muestra, por lo que es específico solo para *Leishmania* (V.). Se obtuvo 62 % de positividad en muestras embebidas en parafina, y 46 % en muestras almacenadas en formol⁽⁵⁵⁾.

El gen ITS (espaciador interno transcrita) tiene importancia para estudios filogenéticos, especies relacionadas, evolutivos, etc. Se encuentran en repeticiones en tándem a lo largo del genoma, y su variabilidad ha permitido la identificación del protozoario *Leishmania*. La región conservada que comparten las especies de *Leishmania* tiene un tamaño de 300 a 350 pb. La sensibilidad encontrada usando este gen fue 1 parásito por mililitro en una PCR convencional⁽⁵⁶⁾.

- ADN cromosómicos

El gen *HSP20* es utilizado para análisis filogenéticos, pero se ha visto su aplicación en la detección del género *Leishmania*. Este gen presenta los siguientes cebadores:

HSP20 (*forward*) RRGACTCGCTCAKCAACAGCG HSP20 (*reverse*) CGTTGAAGSTGGCCT TGATTTTGCTG que generan un producto de 720 pares de bases. El gen *HSP20* codifica una proteína de choque térmico que le permite al parásito defenderse de los cambios de temperatura cuando parasita a su hospedero, sea el reservorio, el vector o cuando llega a infectar a un ser humano^(57,58). Se ha encontrado anticuerpos frente a esta proteína en el suero de personas infectadas, y se ha demostrado también su presencia en los perros. El límite de detección de estos cebadores llega hasta 10 fg en 14 especies de *Leishmania* (*V.*) y *Leishmania* (*L.*); a excepción de la *Leishmania tropica* y *Leishmania major*, donde logra detectar 100 fg de ADN. Su sensibilidad en muestras clínicas llegó a un 86,5 % y una especificidad de 100 %⁽⁵⁸⁾.

El gen *HSP70* es otra proteína de choque térmico; este gen está presente en el ADN cromosómico de las *Leishmania*, y presenta una zona muy conservada que contiene gran polimorfismo entre las diferentes especies de *Leishmania*. El gen *HSP70* es un gen de 1422 pb, cuya organización y expresión no es clara, especialmente en la *Leishmania* (*V.*). La cantidad de genes hallados en la *Leishmania* (*V.*) *braziliensis* fueron un total de 7 genes con una repetición en tándem del locus de 3,3 kb por unidad de repetición. Diferentes autores han diseñado cebadores con objetivo diana a este gen para posterior uso de enzimas de restricción (PCR RFLP). También se ha visto su utilidad en la metodología PCR HRM por la gran cantidad de polimorfismo que presenta^(59,60).

- ADN kinetoplasto

Los cebadores 13 A (*forward*) 5'-GTGGGGGAGGGGCGTTCT-3' y 13 B (*reverse*) 5'- ATTTTACACCAACCCCAAGTT -3' fueron obtenidos de los minicírculos de ADN de kinetoplasto presente en varias especies de *Leishmania* que generan un amplicón de 120 pb, pero, en caso de *Leishmania infantum*, un amplicón de 116 pb^(61,62). Para la identificación de *Leishmania tropica* y *Leishmania major*, estos cebadores obtuvieron una buena sensibilidad de 100 % y una especificidad de 71 %

en muestras de lesiones cutáneas de Marruecos; aunque no diferencia entre especies detectan por muestra 0.1 promastigotes⁽⁶³⁾. Otros autores mencionan que puede detectar de 10 fg de *Leishmania (V.) braziliensis* hasta 1 fg de *Leishmania mexicana*⁽⁶¹⁾. Oliveira *et al.* consideraron estos cebadores con un bajo rendimiento teniendo un límite de detección de más de 512 pg para leishmaniosis cutánea, con sensibilidad de 22 % para muestras cutáneas con previa microscopía positiva⁽⁶⁴⁾. Chena *et al.* obtuvieron una sensibilidad de 71 % en muestras clínicas de lesiones cutáneas y mucosas; menciona también que el exceso de ADN de la muestra podría afectar a estos cebadores⁽⁶⁵⁾.

B1 (*forward*) 5'-GGGGTTGGTGTAATATAGTGG-3' y B2 (*reverse*) 5'-CTAATTGTG CACGGGGAGG-3' estos cebadores detectan 1 fg de ADN de kinetoplasto, que representa 1000 minicírculos de 760 pb y fue sintetizado a partir del complejo *Leishmania (V.) braziliensis* que engloban las especies del subgénero *Viannia*: *Leishmania (V.) braziliensis*, *Leishmania (V.) guyanensis*, *Leishmania (V.) peruviana* y *Leishmania panamensis*, aunque no son todas las especies dentro de este complejo⁽⁶⁶⁾. La detección del complejo de *Leishmania braziliensis* por medio de estos cebadores se realiza de forma parcial y no llega a detectar todas las especies, pero tiene una buena sensibilidad y especificidad⁽⁴⁷⁾. En el estudio de Oliveira *et al.* se evidenció una sensibilidad del 100 % en lesiones cutáneas y 35 % en otras que tuvieron un previo resultado negativo por microscopía y una detección de 4 fg de ADN⁽⁶⁴⁾.

Los cebadores B1 (*forward*) 5'-GGGGTTGGTGTAATATAGTGG-3' y LV (*reverse*) (5'-ATTTTTGAACGGGGT TTCTG-3') son una modificación del original B1 y B2, debido a la falta de especificidad del *cebador* B2 que amplifica secuencias de ADN de 718 pb presente en humanos (en altas cantidades en monocitos). Esta falta de especificidad se solucionó creando el *cebador* LV que en la práctica no tuvo ninguna homología con el ADN humano. El nuevo conjunto de cebadores logró detectar hasta 0.3 fg de ADN del parásito con un amplicón de 700 pb⁽⁶⁷⁾. En otro estudio se obtuvo

sensibilidades de 0.2 parásito por muestra, con una sensibilidad de 73 % en muestras obtenidas por hisopo, monocitos sanguíneos y aspirado de lesiones cutáneas⁽⁶⁸⁾.

Los cebadores específicos MP1L (*forward*) 5'-TACTCCCCGACATGCCTCTG-3' MP3H (*reverse*) 5'-GAACGGGGT TTCTGTATGC-3' son obtenidos de secuencias de ADN minicírculos de kinetoplasto para amplificar secuencias del subgénero *Leishmania* (*V.*) con un producto de amplificación de 70 pb con un límite de detección de 2 fg de ADN^(64,69). Oliveira *et al.* obtuvieron una sensibilidad de 100 % en muestras de lesiones cutánea humanas; en biopsias y lesiones en perros, también se obtuvo la misma sensibilidad. En el mismo estudio se estimó una sensibilidad de 60 % de muestras negativas mediante evaluación microscópica⁽⁶⁴⁾. Chena *et al.* en cambio obtuvieron una sensibilidad de 79 % en muestras de lesiones cutáneas y mucosas⁽⁶⁵⁾. Andrea *et al.* obtuvieron una sensibilidad 95.7 % y una especificidad de 90% en biopsias nasales; y en muestras obtenidas en papel filtro una sensibilidad 92.3 % y especificidad de 100 %^(70,71). Velásquez *et al.* detectaron 0,9 fg de ADN equivalente a 3.2 parásitos por muestra en un estudio de *Leishmania* en perros⁽⁷²⁾.

Los cebadores OL1(*forward*) GGGGAGGGGCGTTCTGCGAA y OL2 (*reverse*) CCGCCCTATTT TACACCAACCCC son usados para la identificación del género *Leishmania* obtenidos del ADN del minicírculos del kinetoplasto, la amplificación de estos cebadores nos da un producto de 120 pb, generalmente usados en el campo de entomología⁽⁷³⁾. Se obtuvo una sensibilidad de 98 % en muestras de lesiones cutáneas obtenidas por raspado, con un límite de detección de 2 parásitos o 0.37 pg para notar una banda visible⁽⁷⁴⁾.

Los cebadores LBF1 (*forward*) 5'-AAATTCGCGTTTTTTGGCCTCCCCG-3') y LBR1 (*reverse*) (5'- GCATAAACTAGAGACGGAACAGAG-3') son obtenidos de minicírculos de ADN de kinetoplasto de *Leishmania* (*V.*) *braziliensis*. Este par de cebadores da un producto de 536 pb con límite de detección de 4 ng y es específico para *Leishmania* (*V.*) *braziliensis*⁽⁷⁵⁾. Oliveira *et al.* obtuvieron una sensibilidad de 55.6 % en muestras de úlceras cutáneas confirmadas por microscopía, con un límite

de detección de 64 pg⁽⁶⁴⁾. Estos cebadores no son tan sensibles, pero tienen una alta especificidad al discriminar entre otras especies y amplificar *Leishmania (V.) braziliensis*, aunque debido al gran polimorfismo que tiene el protozooario *Leishmania* no obtuvieron los resultados deseados⁽⁷⁶⁾.

EFICACIA DE LOS CEBADORES DIRIGIDOS AL KINETOPLASTO

Diversos autores evaluaron la eficacia de utilizar cebadores dirigidos al kinetoplasto mediante comparaciones entre estos con base en su sensibilidad y especificidad en diferentes tipos de muestras de infecciones de leishmaniosis, a partir de lo cual se obtuvieron los siguientes resultados

Oliveira *et al.* al comparar los cebadores de ADN de kinetoplasto, mostraron que la mayor sensibilidad fue el MP3H-MP1L entre muestras de humanos y caninos con microscopía positiva e incluso en los que tuvieron una microscopía negativa. El segundo par de cebadores que demostró mejor sensibilidad fue el B1-B2, pese a tener un amplicón de mayor tamaño. El cebador LBF1-LBR1 quedó tercero en sensibilidad, seguido de los cebadores 13A-13B que obtuvieron la sensibilidad más baja. Estos dos últimos cebadores solo fueron sensibles en muestras humanas, pero no en caninos, cuya sensibilidad fue de 0 %.

En cuanto a los cebadores obtenidos del mini-exón LU5A-LB3C, a pesar de estar presente en menos copias en el ADN nuclear que los de ADN kinetoplasto, demostró mayor sensibilidad tanto en muestras humanas y caninas a diferencia de los cebadores LBF1-LBR1 y 13A-13B⁽⁶⁴⁾.

Chena *et al.* concluyeron, en que el par de cebadores MP3H-MP1L fue más sensible que los cebadores 13A-13B, pero la diferencia fue solo 8%. Chena consideró por experiencia que los cebadores 13A-13B son inhibidos por el exceso de ADN de la muestra a diferencia de los cebadores MP3H-MP1L que no fueron inhibidos⁽⁶⁵⁾.

Los cebadores obtenidos de kinetoplasto demuestran gran sensibilidad, Montenegro demostró que la mejor sensibilidad se obtuvo del par de cebadores LV-B1 a diferencia de los cebadores orientados a amplificar secuencias de ADN genómico, pero observó la falta de especificidad al amplificar secuencias de kinetoplasto de *Trypanosoma* y subgénero *Leishmania* (L.)⁽⁷⁷⁾.

La sensibilidad de los cebadores obtenidos de ADN kinetoplasto es muy ventajosa para el diagnóstico de leishmaniosis, pero se debe tener cuidado con la especificidad tal como lo menciona Gabriel, quien encontró amplicones no específicos para el par de cebadores 13A-13B que pertenecían a regiones de la anémona *Nematostella vectensis*, *Homo sapiens* cromosoma 12 y *Mus musculus* cromosoma 8; los cebadores MP3H-MP1L, con los amplicones inespecíficos *Leishmania major*, *Leishmania donovani* y *Macaca mulatta*; y los cebadores B1-B2 con los amplicones *Leishmania major*, *Macaca mulatta*, *H. sapiens* cromosoma 2, región intergénica *H. sapiens* cromosoma 2. En cuanto a los cebadores obtenidos del ADN nuclear, se demostró que el LU5B-LB3C no poseía alineación con otras especies y demostró ser el más específico^(67,78).

La eficacia de los cebadores usando el blanco molecular de ADN de minicírculo de kinetoplasto, demuestra gran sensibilidad cuando la muestra es procedente de lesiones cutáneas o mucocutáneas, pero no en muestras de sangre periférica o de punción medular donde son inhibidas y se obtiene sensibilidades muy bajas o incluso nulas; algunos cebadores también son inhibidos con altas cargas de ADN de la muestra, sin embargo, el límite de detección de estos cebadores en concentraciones de ADN o copias de parásito son tan pequeños que son usados para tamizajes, estudio de vectores o diagnóstico.

PCR HRM APLICADO AL DIAGNÓSTICO DE LEISHMANIOSIS

La fusión de alta resolución en la PCR HRM se usa para la tipificación rápida, segura y confiable del protozooario *Leishmania*. El gran polimorfismo entre las especies de

Leishmania ha sido de utilidad para el uso de este método en el ADN cromosómico *HSP70*, ADN ribosomal ITS1 y ADN kinetoplasto. Estas diferencias en las zonas conservadas, también conocidas como polimorfismo, generan curvas de temperaturas de fusión distintas para discriminar entre los subgéneros y especies.

Los trabajos realizados con el método PCR HRM han demostrado una sensibilidad, especificidad y reproducibilidad frente a otros métodos como PCR RFLP y enzimas multilocus. Entre los blancos genómicos usados para evaluar la fusión de alta resolución, tenemos el kinetoplasto con los cebadores MLF-MLR; estos discriminaron solo hasta nivel subgénero entre *Leishmania* (*V.*) y *Leishmania* (*L.*)⁽¹³⁾.

Los cebadores de origen cromosómico y de ADN ribosomal *HSP70* e ITS, discriminaron entre seis especies de *Leishmania*: *Leishmania* (*V.*) *guyanensis*, *Leishmania* (*V.*) *braziliensis*, *Leishmania panamensis*, *Leishmania* (*L.*) *amazonensis*, *Leishmania mexicana*, y *Leishmania infantum*.

Los cebadores Pan081, Guy901 y Bra1C diseñados a partir del *HSP70*, también lograron discriminar entre la *Leishmania* (*V.*) *guyanensis*, *Leishmania* (*V.*) *braziliensis* y *Leishmania panamensis*⁽⁷⁹⁾.

Los resultados de las temperaturas de fusión de cada una de las especies de *Leishmania* no siempre diferencian totalmente una especie de otra, por lo que es necesario, el uso de dos pares de cebadores para lograr una mayor diferenciación. Un ejemplo de ello es el trabajo de Ceccarelli *et al.*, donde los cebadores MLF-MLR solo llegaron a discriminar hasta el nivel subgénero. El límite de detección por este método va desde una copia del blanco o diana, 0.001 parásito hasta 10 parásitos/mL. Dentro de los colorantes intercalantes, el SYRB *Green* demostró ser de utilidad para el ensayo de la PCR HRM ante otros de mayor sensibilidad de heterodúplex como el LC *Green*, SYTO o EVA *Green*^(7,13).

1.4.2. DEFINICIÓN DE TÉRMINOS

- **Amastigotes:** Forma parasitaria e intracelular del ciclo de vida de algunos protozoarios. Generalmente son ovalados, no móviles con kinetoplasto prominente en forma de barra y un flagelo interno rudimentario⁽⁸⁰⁾.
- **Amplicones:** Producto de pares de bases que se genera en un ensayo de reacción en cadena de la polimerasa (PCR)⁽⁴⁵⁾.
- **Cebadores:** Secuencias de oligonucleótidos que van a definir la secuencia que se desea amplificar en una reacción en cadena de la polimerasa. Son generalmente dos: el *forward* y el *reverse*⁽⁸¹⁾.
- **Coloración Giemsa:** Método de tinción diferencial de tipo Romanowsky que se usa para distinguir componentes celulares. Está compuesto de eosina, azul de metileno y azure B⁽⁸²⁾.
- **Cultivo:** Proceso que permite el crecimiento y proliferación de microorganismos en un medio que contiene todos los nutrientes, suplementos y demás condiciones necesarias⁽⁸³⁾.
- **Kinetoplasto:** Masa de ADN circular que se encuentra en la mitocondria de *Leishmania*, se compone de una red de discos llamados minicírculos y maxicírculos⁽⁵⁶⁾.
- **Lesión de leishmaniosis:** Herida ulcerosa con un borde sobreelevado que puede ser exudativa o seca, además, puede desarrollar hiperqueratosis o ser nodular. Esta lesión comienza con una picadura que evoluciona a una pápula que crece hasta ulcerarse⁽⁵⁾.
- **Minicírculos:** Moléculas de ADN circulares de un tamaño de 750 a 800 pb los cuales poseen una región conservada de 120 pb⁽⁵⁶⁾.
- **Promastigote:** Estadío celular del parásito de *Leishmania* que presenta una forma flagelada móvil dentro de sus vectores. Presenta un núcleo central y un kinetoplasto centrado donde sale un flagelo^(84,85).
- **Reservorio:** Habitación en el cual un microorganismo infeccioso crece y se multiplica normalmente sin causar la enfermedad o síntomas⁽⁸⁶⁾.

- **Taq ADN Polimerasa:** Enzima que proviene de la bacteria termófila *Thermus aquaticus*. Es usada frecuentemente para realizar la PCR, por su capacidad de soportar altas temperaturas⁽⁴⁵⁾.
- **Temperatura de fusión:** Temperatura en la que molécula de ADN se encuentra en un estado 50 % monocatenario y el otro 50 % bicatenario. Conocida como Tm (*melting temperatura*)⁽²³⁾.
- **Vector biológico:** Organismo que puede transportan microorganismos de un portador infectado a un nuevo portador. Estos pueden ser mosquitos, flebótomos, triatomas, roedores, etc. ⁽⁸⁷⁾.
- **Virulencia:** Grado de capacidad de un patógeno para causar enfermedad⁽⁸⁸⁾.

1.4.3. FORMULACIÓN DE LA HIPÓTESIS

La Reacción en Cadena de la Polimerasa a tiempo real y el análisis de fusión de alta resolución usando cebadores dirigidos al minicírculo del kinetoplasto permite la detección a nivel de género, subgénero o especie de *Leishmania* obtenidos de cultivos.

CAPÍTULO II: MÉTODOS

2.1. DISEÑO METODOLÓGICO

2.1.1. TIPO DE INVESTIGACIÓN

Estudio de tipo cuantitativo.

2.1.2. DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN

Estudio descriptivo y transversal.

2.1.3. POBLACIÓN

Cultivos viables de *Leishmania* almacenados en el LEMYG del Instituto de Medicina Tropical “Daniel Alcides Carrión” –CITBM.

2.1.4. MUESTRA Y MUESTREO

Se usó todos los cultivos de *Leishmania*, a los cuales se le extrajo el ADN para evaluar la utilidad del método PCR a tiempo real y análisis de fusión de alta resolución.

2.1.4.1. CRITERIOS DE INCLUSIÓN

- Cultivos de *Leishmania* obtenidos de lesiones epiteliales de pacientes confirmados con la infección leishmaniosis.
- ADN de *Leishmania* obtenidos de cultivos.

2.1.4.2. CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

- Cultivos de protozoarios flagelados negativos con la PCR a nivel de género.
- Cultivos de *Leishmania* contaminados con otros microorganismos.

2.1.5. VARIABLES

Principales variables de estudio:

- a) La PCR en tiempo real y análisis de fusión de alta resolución de amplicones.
- b) *Leishmania*.

2.1.6. TÉCNICAS E INSTRUMENTOS DE RECOLECCIÓN DE DATOS

TÉCNICAS DE RECOLECCIÓN DE DATOS

Se usaron fichas de recolección de datos para la elaboración de la curva parasitaria, y el registro de las concentraciones de ADN obtenido de cada cultivo, la elección de cebadores, temperaturas de fusión y límite de detección. Estas fichas fueron validadas y aprobadas por jueces expertos (Anexo 7).

INSTRUMENTOS DE RECOLECCIÓN DE DATOS

Se utilizaron las siguientes fichas para la recolección de datos:

- Ficha de datos para elaboración de la curva parasitaria de *Leishmania* (Anexo 1).
- Ficha de registro de concentraciones de ADN de *Leishmania* (Anexo 2).
- Ficha de registro de cebadores dirigidos al minicírculo de kinetoplasto de *Leishmania* (Anexo 3).
- Ficha de registro de temperaturas de fusión de los cultivos de *Leishmania* (Anexo 4).
- Ficha de registro de límite de detección de los cebadores dirigidos al minicírculo de kinetoplasto de *Leishmania* seleccionados (Anexo 5).

2.1.7. PROCEDIMIENTOS Y ANÁLISIS DE DATOS:

PROCEDIMIENTOS

PLAN DE PROCEDIMIENTO DE RECOLECCIÓN DE DATOS

Se reactivaron 9 cultivos de *Leishmania* los cuales estaban almacenados en el Instituto de Medicina Tropicales (IMT) "Daniel A. Carrión"(DAC) y el LEMYG-CITBM usando el medio bifásico NNN (Novy, Mac Neal y Nicolle) modificado. En este medio bifásico se realizó pasajes consecutivos hasta obtener una población homogénea de promastigotes, sin restos muertos de los cultivos viejos.

Con los parásitos reactivados se realizó un pasaje en el medio Schneider a una concentración de 500 parásitos por mL y temperatura de incubación de 26° C. Para la elaboración de esta curva parasitaria, se realizó pasajes por triplicado del medio Schneider a partir de cada cultivo reactivado en el medio NNN modificado. El recuento de promastigotes se hizo con cámara Neubauer para evaluar la cantidad de parásito obtenido cada 24 horas para graficar la curva parasitaria⁽⁸⁹⁾.

EXTRACCIÓN DE ADN DE *Leishmania*

Para obtener la mayor cantidad ADN se realizó la extracción al inicio de la fase estacionaria donde se obtuvo los mayores recuentos en la curva parasitaria. Además, se registró la concentración parasitaria y la concentración de ADN que se extrajo para cada cultivo de *Leishmania*.

ANÁLISIS GENÓMICO

Se usó el programa AliView donde se colocó las secuencias completas de ADN de minicírculo del kinetoplasto de *Leishmania* obtenidas de la base de datos *GenBank*. Con el programa se alinearon las secuencias del ADN de diferentes especies, las cuales se usaron para la selección de los cebadores.

SELECCIÓN Y ESTANDARIZACIÓN DE CEBADORES DIRIGIDOS AL MINICÍRCULO DEL KINETOPLASTO DE *Leishmania*

La selección se realizó partiendo de cebadores usados en estudios anteriores, los cuales se dirigen al minicírculo del kinetoplasto. Para la selección, se usaron criterios basados en el método PCR HRM como:

- Presencia de regiones polimórficas en las secuencias de nucleótidos de los subgéneros y especies de *Leishmania*, donde van dirigidos los cebadores.
- Amplicones que presenten un tamaño igual o menor a 200 pb para mejor precisión del análisis de las curvas fusión.

Con los cebadores seleccionados, se estandarizó la PCR variando los componentes como la concentración del cebador y la temperatura de anillamiento, y se buscó la optimización del método.

PCR EN TIEMPO REAL Y PCR HRM

A continuación, se realizó una *qPCR* con *SYBR Green* en el termociclador MiniOpticon *Real Time PCR System* e, inmediatamente, una curva de fusión de los amplicones obtenidos con una rampa de 0.1 °C cada 20 segundos comenzando de 60 °C a 95 °C. Las curvas de fusión obtenidas se analizaron con el *Software* de fusión de alta resolución CFX Maestro, y se estableció las temperaturas fusión para cada uno de los cultivos de *Leishmania* utilizadas en este estudio.

ANÁLISIS DE DATOS

El análisis estadístico para la determinación del grado de significancia de la prueba fue obtenido a través del TEST DE ANOVA, el cual validó que los datos cumplieran una distribución normal. Para las comparaciones, se usó el MÉTODO DE TUKEY y el programa SPSS 25. Por último, se usó MICROSOFT OFFICE EXCEL 2016 para la elaboración de las curvas parasitarias, análisis de las curvas de fusión y cálculo de concentración parasitaria y ADN extraído.

LÍMITE DE DETECCIÓN DE LOS CEBADORES SELECCIONADOS

El límite de detección se realizó con diluciones seriadas del ADN total extraído de los cultivos de *Leishmania* a concentraciones de 100 ng, 10 ng, 1 ng, 100 pg, 10 pg, 1 pg, 100 fg, 10 fg y 1 fg. Para este estudio, se consideró como límite de detección el pico de fusión observable y homogéneo obtenido en la curva de fusión.

2.1.8. CONSIDERACIONES ÉTICAS.

El presente estudio, no se utilizó datos del paciente ni la historia clínica, por lo que no se considera necesario el consentimiento informado, de acuerdo con la pauta número 11 del CIOMS-2016. Para el desarrollo del trabajo de investigación se contó con la aprobación de la coordinación y dirección del LEMYG-CITBM (Anexo N° 9). Finalmente se presentó al CIEI del Instituto de Medicina Tropical "Daniel A. Carrión" de la Facultad de Medicina de la UNMSM.

CAPÍTULO III: RESULTADOS

3. RESULTADOS

CURVA PARASITARIA

En el estudio se reactivaron 9 cultivos de *Leishmania*, 5 almacenados en el IMT/DAC-UNMSM y 4 en el CITBM, los cuales fueron enumerados del C1 al C9. Al observar las curvas de crecimiento obtenidas, se encontró que los cultivos C1 al C5 describieron un patrón de curva similar en contraste con los cultivos del C6 al C9. Los cultivos del C1 al C5 obtuvieron recuentos altos de promastigotes en comparación con los cultivos del C6 al C9, cuyos recuentos fueron cercanos al inóculo inicial (Figura N° 2).

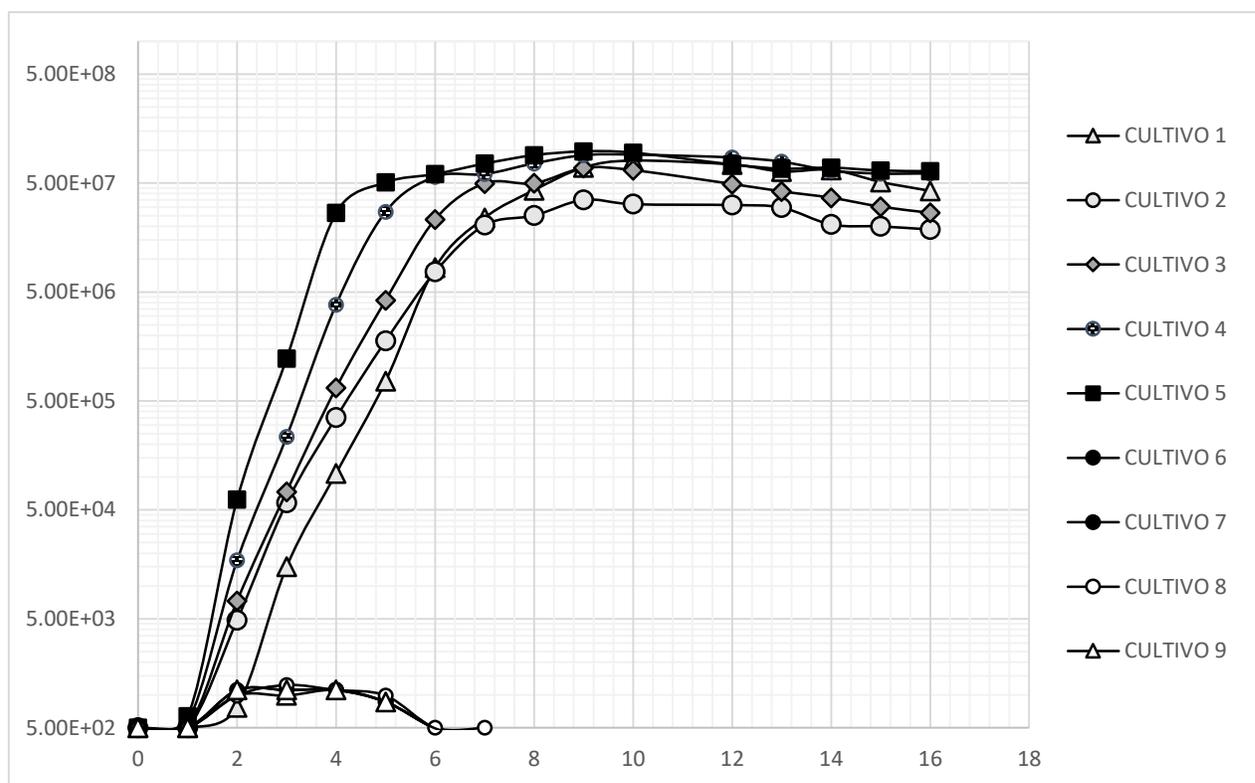


Figura N° 2. Curva parasitaria de promastigotes de los cultivos almacenados en el IMT/DAC y el CITBM.

Fuente: Elaboración propia

Los cultivos del C1 al C5 obtuvieron la mayor cantidad de promastigotes por mL en las fases logarítmica y estacionaria, llegando a cifras entre los 30 a 70 millones de parásitos por mL, mientras los cultivos del C6 al C9 solo mantuvieron recuentos alrededor de 500 parásitos por mL.

A partir de los datos de las curvas parasitarias se calculó los tiempos de la fase de latencia y de la fase de generación de cada cultivo de *Leishmania* usando la ecuación de Gompertz⁽⁹⁰⁾.

Al comparar las fases de latencia de los 9 cultivos se encontró que el tiempo de latencia de C1 era estadísticamente diferente del cultivo C4 (0.017; $p < 0.05$), diferente al cultivo C5 (0.007; $p < 0.05$) y diferente al cultivo C8 (0.026; $p < 0.05$). En cuanto a los tiempos de generación, el cultivo C1 es estadísticamente diferente a los cultivos C5 al C9 ($p < 0.05$); el cultivo C2 es diferente a los cultivos C5 al C9 ($p < 0.05$); el cultivo C3 es diferente a los cultivos C5 al C9 ($p < 0.05$); el cultivo 4 es diferente a los cultivos C6 al C9 ($p < 0.05$); el cultivo C5 es diferente a los cultivos C6 al C9 ($p < 0.05$); los cultivos C7 y C8 son diferentes entre ellas y diferentes a los demás cultivos ($p < 0.05$), los cultivos C6 y C9 son estadísticamente similares (1.000; $p > 0.05$) y diferentes a los demás cultivos ($p < 0.05$).

En la Tabla 1, se visualiza subconjuntos homogéneos con los tiempos de latencia con un $p > 0.05$. El primer grupo agrupa a todos los cultivos excepto al cultivo C1 que tiene un tiempo de latencia diferente al resto de cultivos; y el segundo grupo agrupa los cultivos C2, C3, C6, C7 y C9 y separa a los cultivos C4, C5 y C8 por tener tiempos de latencia diferentes a este subconjunto de cultivos.

Tabla 1. Comparación de los tiempos de latencia de los cultivos de *Leishmania*

CULTIVOS DE <i>Leishmania</i>	TIEMPO DE LATENCIA	
	Subconjunto para $p = 0.05$	
	1	2
C5	24.24	
C4	26.83	
C8	27.96	
C3	33.07	33.07
C2	34.57	34.57
C7	37.53	37.53
C6	43.09	43.09
C9	43.09	43.09
C1		49.96
Significancia	0.08	0.14

Fuente: Elaboración propia

En la Tabla 2, se observa subconjuntos homogéneos de los cultivos de *Leishmania* con tiempos de generación similares con $p > 0.05$. Los cultivos C4 y C5 presentan tiempos de generación similares (0.708; $p > 0.05$). Los cultivos C1, C2, C3 y C4 son similares (0.090; $p > 0.05$) y este conjunto es diferente a los demás cultivos. Los cultivos C6 y C9 presentan tiempos de generación iguales y diferentes al resto, mientras que los cultivos C8 y C9 son diferentes a los demás al agruparse individualmente.

Tabla 2. Comparación de los tiempos de generación de los cultivos de *Leishmania*

CULTIVOS DE <i>Leishmania</i>	TIEMPO DE GENERACIÓN				
	Subconjunto para $p = 0.05$				
	1	2	3	4	5
C5	8.34				
C4	10.64	10.64			
C3		13.38			
C1		13.84			
C2		15.22			
C6			32.59		
C9			32.59		
C8				51.55	
C7					69.35
Significancia	0.79	0.09	1.00	1.00	1.00

Fuente: Elaboración propia

SELECCIÓN DE CEBADORES

La selección de los cebadores se realizó recopilando las secuencias de los minicírculos del kinetoplasto de *Leishmania* almacenadas en la base de datos *GenBank* (Fotografía N° 1). Estas secuencias se ingresaron en el programa AliView donde se seleccionaron las secuencias de minicírculos de *Leishmania* completas, eliminando las secuencias parciales y secuencias pertenecientes al Citocromo. Las secuencias restantes de minicírculos se alinearon en el programa para la posterior evaluación de homología con los cebadores encontrados en la bibliografía (Tabla 3).

The screenshot shows the GenBank search interface with the following details:

- Search Query:** nucleótido [dropdown] leishmania kinetoplast AND (ls_nuclcore[filter] AND ('500'[SLEN] : '1000'[SLEN]) AND ('0001/01/')) [Buscar]
- Filters:** Especies, Protistas (2608), Personaliza..., tipos de moléculas, ADN/ARN genómico (2795), ARNm (13), Personaliza..., Bases de datos de origen, INSDC (GenBank) (2,802), RefSeq (6), Personaliza..., Tipo de secuencia, Nucleótido (2808), Compartimentos genéticos mitocondria (2772), Longitud de la secuencia, Rango personalizado..., Fecha de
- Results:** Artículos: 1 a 20 de 2808. Three articles are listed, each with a checkbox, title, and details like 'ADN lineal de 692 pb' and 'Adhesión: Z32844.1 SOLDADO AMERICANO:483595'.
- Taxonomy:** Resultados por taxón. Top Organismos [Árbol] list includes: Leishmania braziliensis (465), Leishmania infantum (437), Leishmania guyanensis (430), Leishmania chagasi (192), Leishmania tropical (189), Leishmania lainsoni (181), Leishmania major (157), Leishmania naifi (134), Leishmania donovani (128), Leishmania amazonensis (116), Leishmania tarentolae (91), Leishmania sp. (54), Leishmania mexicana (51), Leishmania donovani complejo sp. KP-2013 (43), Leishmania panamensis (28), Leishmania peruana (9), Leishmania braziliensis x Leishmania guyanensis (6), Leishmania donovani complejo sp. (5), Trypanosoma grayi (5), Leishmania aethiopia (4).

Fotografía N° 1. Búsqueda de secuencias de minicírculo de kinetoplasto de *Leishmania* en el *GenBank*. Para la búsqueda se filtró el tamaño de ADN de 500 a 1000 pb y el tipo de secuencia solo nucleótido.

Fuente: Elaboración propia

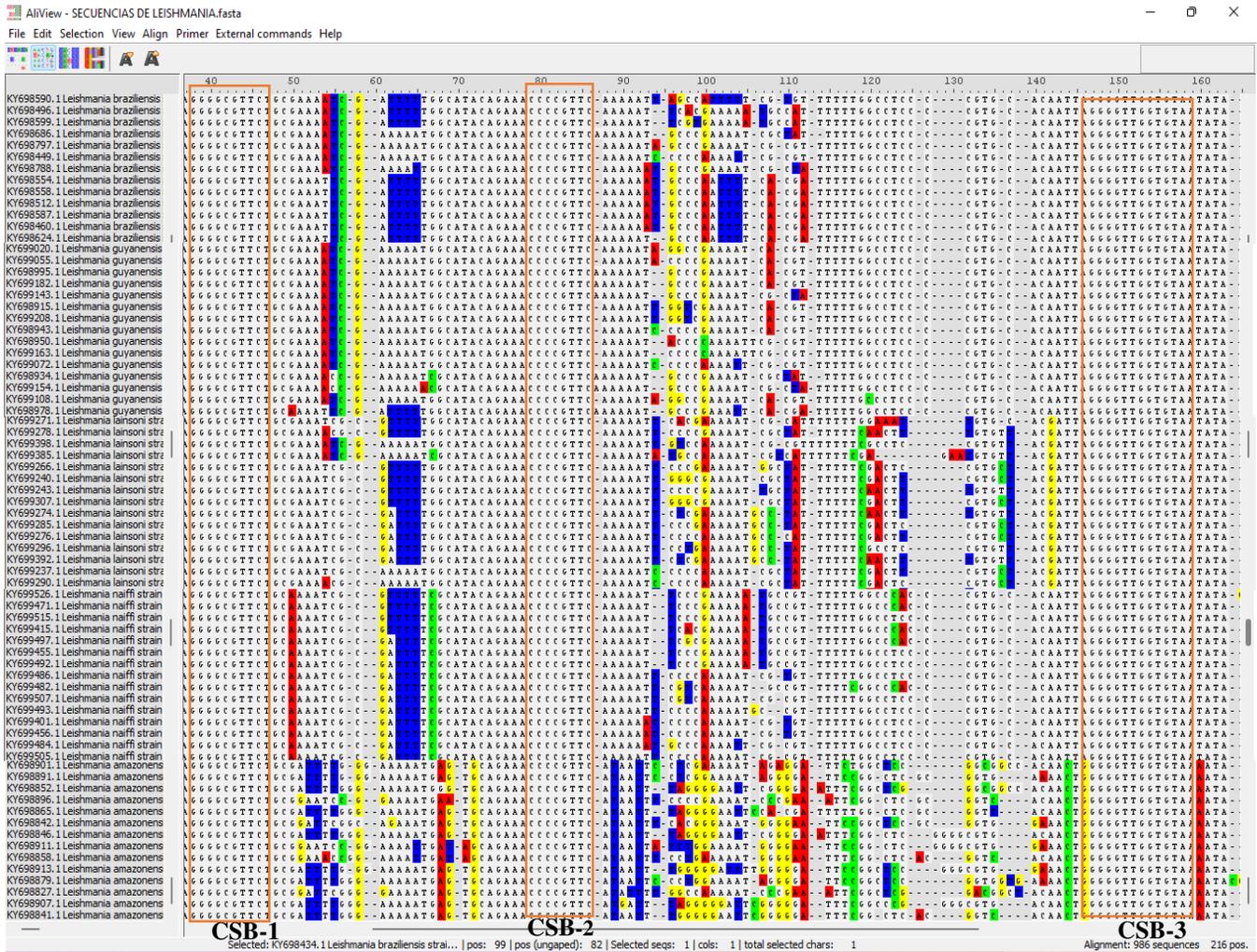
Tabla 3. Secuencias de ADN de minicírculos de kinetoplasto *GenBank*

Microorganismo	ARTÍCULOS <i>GenBank</i>	Secuencias de ADN completas de minicírculo de kinetoplasto
<i>Leishmania (V.) braziliensis</i>	465	404
<i>Leishmania (V.) guyanensis</i>	430	320
<i>Leishmania (V.) lainsoni</i>	181	100
<i>Leishmania (V.) naiffi</i>	134	120
<i>Leishmania (L.) amazonensis</i>	116	42
<i>Leishmania (V.) peruviana</i>	9	0
<i>Leishmania (V.) shawi</i>	2	0

Fuente: Elaboración propia

Se alineó en total 986 secuencias de los minicírculos con el programa AliView, donde se observa la región conservada de 120 a 200 pb y los 3 bloques de secuencias superconservados⁽³⁹⁾. De toda la secuencia del minicírculo, se quedó con esta zona conservada para el análisis de homología frente a las secuencias de cebadores.

En la Fotografía N° 2, se observa parte de la región conservada donde se encuentran los 3 bloques superconservados: CSB, *conserved sequence blocks* que comparten las *Leishmania*. En esta región conservada se buscó la homología entre las secuencias de los cebadores hallados en la bibliografía y las 986 secuencias de minicírculos alineados de *Leishmania*. En la fotografía solo se muestra algunas secuencias de los minicírculos de cada especie de *Leishmania* de manera informativa, debido a la cantidad de secuencias que se analizaron.



Fotografía N° 2. Región conservada y bloques de región conservada de *Leishmania*.

Fuente: Elaboración propia

CRITERIOS DE SELECCIÓN DE CEBADORES

Los cebadores que se evaluaron para la selección fueron un total de 33 (Tabla 4), de los cuales en la selección se buscó cebadores con el menor tamaño de amplicón, por lo que se eliminaron todos los cebadores con tamaños superiores a los 200 pb. En este estudio se consideró tener un par de cebadores que amplifiquen los subgéneros *Viannia* y *Leishmania*; y otro par de cebadores que amplifiquen el subgénero *Viannia*. El primer par de cebadores mediante las temperaturas de fusión ayudará a discriminar la presencia de algún subgénero e incluso de la especie entre los cultivos y el segundo par de cebadores ayudará a discriminar la presencia de alguna especie dentro del subgénero *Viannia*, por ser el de mayor predominio en el Perú contando con 6 especies a diferencia del subgénero *Leishmania* donde tenemos solo a la *Leishmania (L.) amazonensis*^(8,91).

Tabla 4. Revisión de cebadores hallados en la bibliografía

CEBADORES	<i>Forward</i>	<i>Reverse</i>	TAMAÑO (pb)	GÉNERO	SUBGÉNERO	AUTOR
Uni21 Lmj4	GGGGTTGGTGTA ATAAGGCC	CTAGTTTCCCGCCTCCGA G	650-800	<i>Leishmania</i>	<i>L. Leishmania/ L. Viannia</i>	Moultaki <i>et al.</i> , 2014 ⁽⁶³⁾
LINR4 LIN17 LIN19 B1 B2	GGGGTTGGTGTA ATAAGGG	TTTGAACGGGATTTCTG / CAGAACGCCCTACCCG	700	<i>Leishmania</i>	<i>L. Leishmania/ L. Viannia</i>	Reis <i>et al.</i> , 2013 Aransay <i>et al.</i> , 2000 ^(92,93)
	GGGGTTGGTGTAAT ATAAGTGG	CTAATTGTGCACGGGGA GG	750	<i>Leishmania</i>	<i>L. Leishmania/ L. Viannia</i>	Oliveira <i>et al.</i> , 2011 McCann <i>et al.</i> , 1999 De Fátima Arruda Pereira <i>et al.</i> , 2008 de Bruijn y Barker, 1992 ^(64,94-96)
M1 M2	CCAGTTTCGAGCCC CGGAG	GGTGTAATAATAGGGGCG GATGCTCTG	600- 750	<i>Leishmania</i>	<i>L. Leishmania/ L. Viannia</i>	Eresh <i>et al.</i> , 1994 Oliveira <i>et al.</i> , 2005 ^(97,98)
L.MC-1S L.MC-1R	CTRGGGGTTGGTGT AAAATAG	TWTGAACGGGRTTTCTG	700	<i>Leishmania</i>	<i>L. Leishmania/ L. Viannia</i>	Tiwananthagorn <i>et al.</i> , 2017 Kato <i>et al.</i> , 2005 y 2007 ⁽⁹⁹⁻¹⁰¹⁾
F4-1 F4-2	GTTTCATGCACGCCA CTACTTGCAAGG	CAGGGTACGAGATGGCG CACATCC	128	<i>Leishmania</i>	<i>L. Leishmania/ L. Viannia</i>	Mimori <i>et al.</i> , 1998 ⁽¹⁰²⁾

CEBADORES	Forward	Reverse	TAMAÑO (pb)	GÉNERO	SUBGÉNERO	AUTOR
Linf.1-23F	TCCCAAACCTTTTCT	TTACACCAACCCCCAGT	132	<i>Leishmania</i>	<i>L. Leishmania</i>	Cavalcanti, 2008 ⁽¹⁰³⁾
Linf.1-154R	GGTCCT	TTC				
kDNaf	ATGCCTCTGGGTAG	GGGAGCGCGGCCCACTA	138	<i>Leishmania</i>	<i>L. Leishmania/</i>	De Paiva
kDNAr1	GGGCGTTC	TATT /			<i>L. Viannia</i>	Cavalcanti <i>et al.</i> ,
kDNAr2		GGGTGCGCGGCCCACTA				2013 ⁽¹⁰⁴⁾
		TATT				
13Z 13Y	ACTGGGGGTTGGTG TAAAATAG	CGCCCCTCCCCACGGG	400-700	<i>Leishmania</i>	<i>L. Leishmania/</i> <i>L. Viannia</i>	Rodgers <i>et al.</i> , 1990 Silva <i>et al.</i> , 2012 ^(61,105)
13A 13B	GTGGGGGAGGGGC GTTCT	ATTTTACACCAACCCCC AGTT	120	<i>Leishmania</i>	<i>L. Leishmania/</i> <i>L. Viannia</i>	Rodgers <i>et al.</i> , 1990 Aviles <i>et al.</i> , 1999 ^(61,106)
KDNA 1	GGGTAGGGGCGTTC TGC	TACACCAACCCCCAGTT TGC	<150	<i>Leishmania</i>	<i>L. Leishmania/</i> <i>L. Viannia</i>	Weirather <i>et al.</i> , 2011 ⁽¹⁰⁷⁾
KDNA 2	AACTTTTCTGGTCC TCCGGGTAG	ACCCCAGTTTCCCGCC	<150	<i>Leishmania</i>	<i>L. Donovanii/</i> <i>L. Leishmania</i>	
KDNA 3	GGGTAGGGGCGTTC TGC	CCCGGCCTATTTTACACC AACC	<150	<i>Leishmania</i>	<i>L. Leishmania/</i> <i>L. Viannia</i>	
KDNA 4	GGGTGCAGAAATCC CGTTCA	CCCCGGCCCTATTTTACA CCA	<150	<i>Leishmania</i>	<i>L. Leishmania/</i> <i>L. Viannia</i>	
KDNA 5	CTTTTCTGGTCCTCC GGGTAGG	CCACCCGGCCCTATTTTA CACCAA	<150	<i>Leishmania</i>	<i>L. Donovanii/</i> <i>L. Leishmania</i>	
KDNA 7	AATGGGTGCAGAA ATCCCGTTC	CCACCACCCGGCCCTAT TTTAC	<150	<i>Leishmania</i>	<i>L. Leishmania/</i> <i>L. Viannia</i>	
L. amazonensis kDNA 1	GGTCCCGGCCCAA CTTTTC	CCGGGGTTTCGCACTCA TTT	<150	<i>Leishmania</i>	<i>L. Leishmania/</i> <i>L. Viannia</i>	

CEBADORES	Forward	Reverse	TAMAÑO (pb)	GÉNERO	SUBGÉNERO	AUTOR
<i>L. amazonensis</i> kDNA 2	GGTAGGGGCGTTCT GCGAAT	CCCGGCCTATTTACACC AACC	<150	<i>Leishmania</i>	<i>L. Leishmania</i>	Weirather <i>et al.</i> , 2011 ⁽¹⁰⁷⁾
<i>L. amazonensis</i> kDNA 3	GGGTAGGGGCGTTC TGC	TACACCAACCCCCAGTT TGC	<150	<i>Leishmania</i>	<i>L. Leishmania</i> / <i>L. Viannia</i>	
<i>L. major</i> minicircle 1	ACGGGGTTTCTGCA CCCATT	GTAGGGGCGTTCTGCGA AAA	<150	<i>Leishmania</i>	<i>L. Leishmania</i> / <i>L. Viannia</i>	
F10-1 F10-2	CTGACTGGCTCGGC GCTCGGTAC	GGTCGCAGTACATGGCG TAAGG	263	<i>Leishmania</i>	<i>L. Viannia</i>	
V1 V2	GCTTCTCGTTTCGC TTTGAAC	CAAGACAAGAAAAAAG GCGGC	168	<i>Leishmania</i>	<i>L. Viannia</i>	Mimori <i>et al.</i> , 1998 ⁽¹⁰²⁾
MP1L MP3H	TACTCCCCGACATG CCTCTG	GAACGGGGTTTCTGTAT GC	70	<i>Leishmania</i>	<i>L. Viannia</i>	Cardoso <i>et al.</i> , 2019 Enrique Perez <i>et al.</i> , 2007 ^(108,109)
A1 A2	(G/C)(G/C)(C/G)CC(A/ C)CTAT(A/T)TTACA CCAACCCC	GGGGAGGGGCGTTCTGC GAA	120	<i>Leishmania</i>	<i>L. Viannia</i>	Romero <i>et al.</i> , 2001 ⁽¹¹⁰⁾
M1 M2	CCAGTTTCGAGCCC CGGAG	GGTGTAATAAGGGGCG GATGCTCTG	600	<i>Leishmania</i>	<i>L. Leishmania</i>	Eresh <i>et al.</i> , 1994 ⁽⁹⁷⁾
LBF1 LBR1	AAATTCGCGTTTTT TGGCCTCCCCG	GCATAAACTAGAGACGG AACAGAG	536	<i>Leishmania</i>	<i>L. Viannia</i>	M Marcussi <i>et al.</i> , 2008 ⁽⁷⁵⁾
<i>L. braziliensis</i> kDNA 1	AATTCGCAGAACG CCCCTAC	GTACTCCCCGACATGCC TCTG	<150	<i>Leishmania</i>	<i>L. Viannia</i>	Weirather <i>et al.</i> , 2011 ⁽¹⁰⁷⁾
<i>L. braziliensis</i> kDNA 3 b1 b2	TGCTATAAAATCGT ACCACCCGACA GTGGGCGTATCTGC TGATGAC	GAACGGGGTTTCTGTAT GCCATTT CAAAAAGCGAGGGACTG CGGA	<150 103	<i>Leishmania</i>	<i>L. Viannia</i>	Mimori <i>et al.</i> , 1998 ⁽¹⁰²⁾

CEBADORES	<i>Forward</i>	<i>Reverse</i>	TAMAÑO (pb)	GÉNERO	SUBGÉNERO	AUTOR
OL1 OL2	GGGGAGGGGCGTT CTGCGAA	CCGCCCTATTTTACACC AACCCC	120	<i>Leishmania</i>	<i>L. Leishmania/ L. Viannia</i>	Romero <i>et al.</i> , 2001 Rojas Palomino, 2021 ^(110,111)
MLF MLR	CGTTCTGCGAAAA CCGAAA	CGGCCCTATTTTACACCA ACC	111	<i>Leishmania</i>	<i>L. Leishmania/ L. Viannia</i>	Diotallevi <i>et al.</i> , 2020 Ceccarelli <i>et al.</i> , 2014 ^(9,13)
Mary F R	CTTTTCTGGTCCTC CGGGTAGG	CCACCCGGCCCTATTTTA CACCAA	140	<i>Leishmania</i>	<i>L. Leishmania/ L. Viannia</i>	Ceccarelli <i>et al.</i> , 2014 ⁽¹³⁾
PASSOS F PASSOS R	GGGGTAGGGGCGT TCTGCGAA	GGCCCACTATATTACAC CAACCCC	120	<i>Leishmania</i>	<i>L. Leishmania/ L. Viannia</i>	Sevilha-Santos <i>et al.</i> , 2019 Pita-Pereira <i>et al.</i> , 2012 Passos <i>et al.</i> , 1996 ^(10,15,112)

Fuente: Elaboración propia, basado en la revisión sistemática de Conter *et al.* 2019⁽²²⁾.

De los cebadores expuestos en la Tabla 4, se descartaron los cebadores con un tamaño de amplicón mayor a 200 pb, sombreados de amarillo en la columna CEBADOR; además, para la identificación del subgénero *Viannia*, se seleccionó el par de cebadores MP1L-MP3H por presentar el amplicón de menor tamaño dentro de los que identifican este subgénero en la tabla expuesta. Los demás cebadores que identificaron el subgénero *Viannia* se descartaron y se sombreadon de naranja en la columna CEBADOR al igual que los que amplifican solo el subgénero *Leishmania*, quedando los cebadores que amplifican ambos subgéneros.

El par de cebadores MP1L-MP3H presentaron homología entre las secuencias de los minicírculos de *Leishmania (V.) braziliensis* y *Leishmania (V.) guyanensis*. La secuencia del cebador MP1L (*forward*) presentó 2 desajustes en los nucleótidos con la *Leishmania (V.) naiffi* y 3 desajustes con la *Leishmania (V.) lainsoni*. Sin embargo, Cardoso *et al.* y Perez *et al.* demostraron la obtención de producto con estos pares de cebadores en *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) naiffi* y *L. (V.) peruviana* (Tabla 5).

Tabla 5. Homología entre las secuencias de los cebadores y de los minicírculos de *Leishmania* obtenidas del *GenBank* y confirmación de producto mediante PCR tiempo real o convencional

CEBADORES	TAMAÑO DE AMPLICÓN	PRESENCIA DEL CEBADOR EN LAS SECUENCIAS DE <i>Leishmania</i> - PROGRAMA AliView - OBSERVACIÓN DEL PRODUCTO AMPLIFICADO SEGÚN LA BIBLIOGRAFÍA																			
		<i>L. (V.) braziliensis</i>			<i>L. (V.) guyanensis</i>			<i>L. (V.) lainsoni</i>			<i>L. (V.) naiffi</i>			<i>L. (V.) peruviana</i>			<i>L. (L.) amazonensis</i>				
		F	R	P	F	R	P	F	R	P	F	R	P	F	R	P	F	R	P		
Uni21 Lmj4	650-800	NO	NO	SÍ	NO	NO	SÍ	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	--	--	SÍ	NO	NO	SÍ
LINR4	700	NO	NO	SÍ	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	--	--	--	SÍ	NO	SÍ
LIN17																					
LIN19																					
B1 B2	750	SÍ	SÍ	SÍ	SÍ	SÍ	SÍ	SÍ	NO	NO	SÍ	SÍ	NO	--	--	SÍ	NO	NO	SÍ	NO	SÍ
M1 M2	600- 750	NO	NO	SÍ	NO	NO	SÍ	NO	NO	NO	NO	NO	NO	--	--	SÍ	NO	NO	SÍ	NO	SÍ
L.MC-1S	700	NO	SÍ	SÍ	NO	SÍ	SÍ	NO	SÍ	NO	NO	SÍ	NO	--	--	--	NO	SÍ	SÍ	NO	SÍ
L.MC-1R																					
F4-1 F4-2	128	NO	NO	SÍ	NO	NO	SÍ	NO	NO	NO	NO	NO	NO	--	--	--	NO	NO	SÍ	NO	SÍ
Linf.1-23F	132	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	--	--	--	NO	SÍ	NO	NO	SÍ
Linf.1-154R																					
kDNAf	138	SÍ	SÍ	SÍ	SÍ	SÍ	SÍ	SÍ	SÍ	SÍ	SÍ	NO	SÍ	--	--	--	NO	NO	SÍ	NO	SÍ
kDNAr1																					
kDNAr2																					

CEBADORES	TAMAÑO DE AMPLICÓN	PRESENCIA DEL CEBADOR EN LAS SECUENCIAS DE <i>Leishmania</i> - PROGRAMA AliView - OBSERVACIÓN DEL PRODUCTO AMPLIFICADO SEGÚN LA BIBLIOGRAFÍA																	
		<i>L. (V.) braziliensis</i>			<i>L. (V.) guyanensis</i>			<i>L. (V.) lainsoni</i>			<i>L. (V.) naiffi</i>			<i>L. (V.) peruviana</i>			<i>L. (L.) amazonensis</i>		
		F	R	P	F	R	P	F	R	P	F	R	P	F	R	P	F	R	P
13Z 13Y	400-700	NO	NO	SÍ	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	--	--	--	SÍ	SÍ	NO
13A 13B	120	NO	NO	SÍ	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	--	--	--	SÍ	SÍ	SÍ
KDNA 1	<150	SÍ	NO	SÍ	SÍ	NO	NO	SÍ	NO	NO	SÍ	NO	NO	--	--	--	SÍ	NO	SÍ
KDNA 2	<150	NO	NO	SÍ	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	--	--	--	NO	NO	NO
KDNA 3	<150	SÍ	NO	SÍ	SÍ	NO	NO	SÍ	NO	NO	SÍ	NO	NO	--	--	--	SÍ	NO	SÍ
KDNA 4	<150	NO	NO	SÍ	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	--	--	--	NO	NO	SÍ
KDNA 5	<150	NO	NO	SÍ	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	--	--	--	NO	NO	NO
KDNA 7	<150	NO	NO	SÍ	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	--	--	--	NO	NO	SÍ
<i>L. amazonensis</i> kDNA 1	<150	NO	NO	SÍ	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	--	--	--	NO	NO	SÍ
<i>L. amazonensis</i> kDNA 2	<150	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	--	--	--	NO	NO	SÍ
<i>L. amazonensis</i> kDNA 3	<150	SÍ	NO	SÍ	SÍ	NO	NO	SÍ	NO	NO	SÍ	NO	NO	--	--	--	SÍ	NO	SÍ
<i>L. major</i> minicircle 1	<150	NO	NO	SÍ	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	--	--	--	NO	NO	SÍ
F10-1 F10-2	263	NO	NO	SÍ	NO	NO	SÍ	NO	NO	NO	NO	NO	NO	--	--	--	NO	NO	NO
V1 V2	168	NO	NO	SÍ	NO	NO	SÍ	NO	NO	NO	NO	NO	NO	--	--	--	NO	NO	NO
MP1L MP3H	70	SÍ	SÍ	SÍ	SÍ	SÍ	SÍ	NO	SÍ	SÍ	NO	SÍ	SÍ	--	--	SÍ	NO	NO	NO

CEBADORES		TAMAÑO DE AMPLICÓN	PRESENCIA DEL CEBADOR EN LAS SECUENCIAS DE <i>Leishmania</i> - PROGRAMA AliView - OBSERVACIÓN DEL PRODUCTO AMPLIFICADO SEGÚN LA BIBLIOGRAFÍA																		
			<i>L. (V.) braziliensis</i>			<i>L. (V.) guyanensis</i>			<i>L. (V.) lainsoni</i>			<i>L. (V.) naiffi</i>			<i>L. (V.) peruviana</i>			<i>L. (L.) amazonensis</i>			
			F	R	P	F	R	P	F	R	P	F	R	P	F	R	P	F	R	P	
A1	A2	120	NO	NO	SÍ	NO	NO	SÍ	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	--	--	--	NO	NO	NO
M1	M2	600	NO	NO	N O	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	--	--	--	NO	NO	SÍ
LBF1	LBR1	536	SÍ	NO	SÍ	SÍ	NO	NO	NO	NO	NO	SÍ	NO	NO	--	--	--	NO	NO	NO	
<i>L. braziliensis</i> kDNA 1		<150	NO	NO	SÍ	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	--	--	--	NO	NO	NO	
<i>L. braziliensis</i> kDNA 3 b1 b2		<150	NO	SÍ	SÍ	NO	SÍ	NO	NO	SÍ	NO	NO	NO	NO	--	--	--	NO	SÍ	NO	
OL1	OL2	103	NO	NO	SÍ	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	--	--	--	NO	NO	NO	
MLF	MLR	120	NO	NO	SÍ	NO	NO	SÍ	NO	NO	SÍ	NO	NO	NO	--	--	SÍ	SÍ	SÍ	SÍ	
MLF	MLR	111	SÍ	NO	SÍ	SÍ	NO	SÍ	SÍ	NO	NO	NO	NO	NO	--	--	--	NO	NO	SÍ	
Mary F	Mary R	140	NO	NO	SÍ	NO	NO	SÍ	SÍ	SÍ	NO	SÍ	SÍ	NO	--	--	--	NO	NO	SÍ	
PASSOS F	PASSOS R	120	NO	SÍ	SÍ	NO	SÍ	SÍ	NO	SÍ	SÍ	NO	SÍ	SÍ	--	--	--	NO	NO	SÍ	

Fuente: Elaboración propia

* F: homología del cebador *forward* con la secuencia del minicírculo de *Leishmania*.

*R: homología del cebador *reverse* con la secuencia del minicírculo de *Leishmania*.

*P: obtención del producto amplificado de los cebadores según los autores en la bibliografía.

De los cebadores restantes, se descartaron los pares de cebadores que no se conocía el tamaño exacto de pb de su amplicón y tampoco se pudo determinar en el programa AliView por falta de homología en las secuencias de sus cebadores con las secuencias de los minicírculos, estos cebadores están sombreados de azul en la columna CEBADOR en la Tabla 5.

Tabla 6. Cebadores restantes luego de la selección de las Tablas 4 y 5

PRESENCIA DEL CEBADOR EN LAS SECUENCIAS DE <i>Leishmania</i> - PROGRAMA AliView - OBSERVACIÓN DEL PRODUCTO AMPLIFICADO SEGÚN LA BIBLIOGRAFÍA																				
CEBADORES	TAMAÑO DE AMPLICÓN	<i>L. (V.) braziliensis</i>			<i>L. (V.) guyanensis</i>			<i>L. (V.) lainsoni</i>			<i>L. (V.) naiffi</i>			<i>L. (V.) peruviana</i>			<i>L. (L.) amazonensis</i>			
		F	R	P	F	R	P	F	R	P	F	R	P	F	R	P	F	R	P	
F4-1 F4-2	128	NO	NO	SÍ	NO	NO	SÍ	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	--	--	--	NO	NO	SÍ
kDNAf	138	SÍ	SÍ	SÍ	SÍ	SÍ	SÍ	SÍ	SÍ	SÍ	SÍ	SÍ	NO	SÍ	--	--	--	NO	NO	SÍ
kDNAr1																				
kDNAr2																				
13A 13B	120	NO	NO	SÍ	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	--	--	--	SÍ	SÍ	SÍ
MP1L	70	SÍ	SÍ	SÍ	SÍ	SÍ	SÍ	NO	SÍ	SÍ	NO	SÍ	SÍ	--	--	SÍ	NO	NO	NO	
MP3H																				
OL1 OL2	120	NO	NO	SÍ	NO	NO	SÍ	NO	NO	SÍ	NO	NO	NO	NO	--	--	SÍ	SÍ	SÍ	SÍ
MLF MLR	111	SÍ	NO	SÍ	SÍ	NO	SÍ	SÍ	NO	NO	NO	NO	NO	NO	--	--	--	NO	NO	SÍ
Mary F	140	NO	NO	SÍ	NO	NO	SÍ	SÍ	SÍ	SÍ	NO	SÍ	SÍ	NO	--	--	--	NO	NO	SÍ
Mary R																				
PASSOS F	120	NO	SÍ	SÍ	NO	SÍ	SÍ	NO	SÍ	SÍ	NO	SÍ	SÍ	SÍ	--	--	--	NO	NO	SÍ
PASSOS R																				

Fuente: Elaboración propia

* F: homología del cebador *forward* con la secuencia del minicírculo de *Leishmania*.

*R: homología del cebador *reverse* con la secuencia del minicírculo de *Leishmania*.

*P: obtención del producto amplificado de los cebadores según los autores en la bibliografía revisada.

En la Tabla 6 se descartaron los cebadores en los que no se halló producto de amplificación en una o más especies de *Leishmania* de los subgéneros *Viannia* y *Leishmania*. Según los autores expuestos en la Tabla 4, estos cebadores se sombrearon de naranja en la columna CEBADOR.

Los últimos cebadores restantes kDNAf-kDNAr1-kDNAr2 y PASSOS F-PASSOS R se descartó el de mayor tamaño de amplicón, quedando el par de cebadores PASSOS F-PASSOS R con 120 pb de amplicón. La homología de las secuencias de los cebadores seleccionados PASSOS F-PASSOS R en la secuencia *forward* presenta un desajuste en un nucleótido de las secuencias de *Leishmania (V.) braziliensis*, *Leishmania (V.) guyanensis*, *Leishmania (V.) lainsoni*, *Leishmania (L.) amazonensis* y dos desajustes con la secuencia de *Leishmania (V.) naiffi*. La secuencia *reverse* presenta cuatro desajustes en los nucleótidos de las secuencias de *Leishmania (V.) naiffi* y *Leishmania (L.) amazonensis*; sin embargo, esta falta de homología y existencia de producto sugiere la presencia de subpoblaciones de minicírculos que hibridan las secuencias de cebadores evaluados, las cuales no están presentes en la base de datos del *GenBank*⁽¹³⁾.

Con los cebadores seleccionados MP1L-MP3H y PASSOS F- PASSOS R se realizó una combinación entre la secuencia *forward* PASSOS F y la secuencia *reverse* MP3H obteniendo un producto de 54 pb, similar a lo que realizaron Aviles *et al.* 1999, combinando los cebadores 13A-MP3H con un producto amplificado de 54 pb⁽¹⁰⁶⁾. Con este pequeño amplicón se esperó una mayor resolución en las temperaturas de fusión halladas (Figura N° 3).

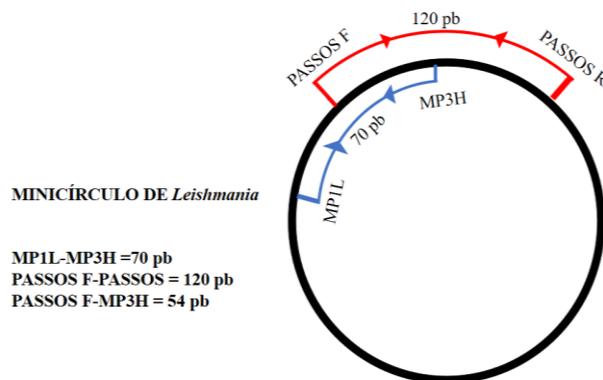
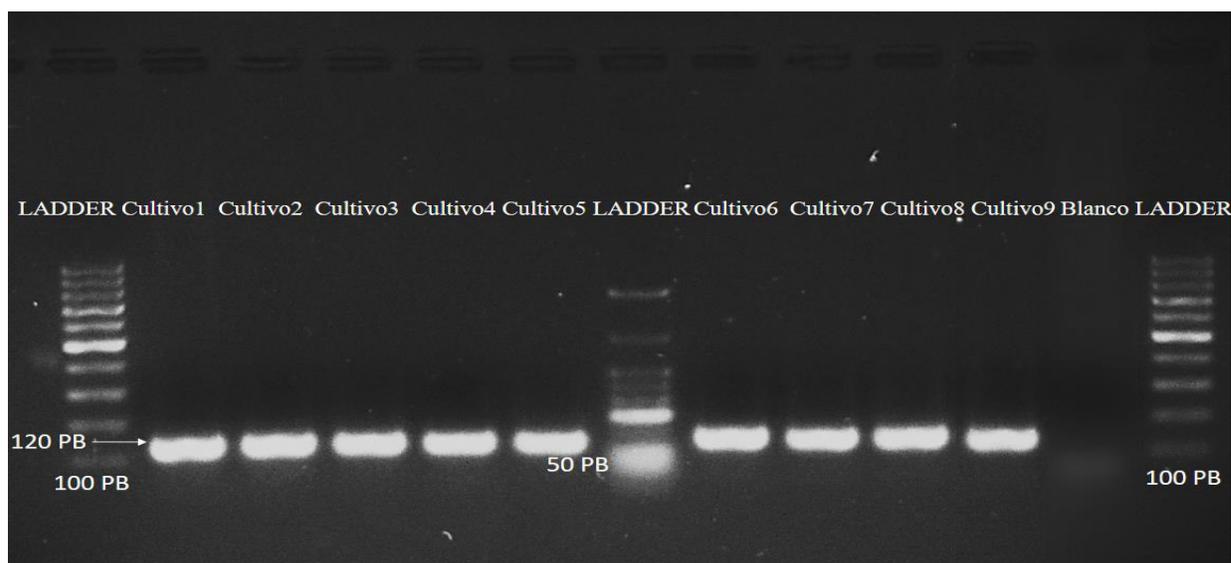


Figura N° 3. Esquema de los cebadores usados para la PCR HRM
 Fuente: Elaboración propia, basado en Aviles *et al.* 1999⁽¹⁰⁶⁾

ESTANDARIZACIÓN DE LA PCR

La estandarización de la PCR HRM se realizó evaluando el producto obtenido con los cebadores seleccionados mediante una PCR convencional, para ello se consideró las concentraciones de los cebadores seleccionados, las temperaturas de anillamiento de los cebadores y la concentración de SYBR *Green master mix*. Los amplicones obtenidos en la PCR convencional debían tener el tamaño descrito y bandas nítidas sin impurezas. Las concentraciones y tiempos para la PCR HRM que se estandarizaron se muestran en el Anexo N° 14. A continuación, se muestran fotografías de las electroforesis de las PCR convencionales que se obtuvieron luego de estandarizar los cebadores seleccionados para este estudio.

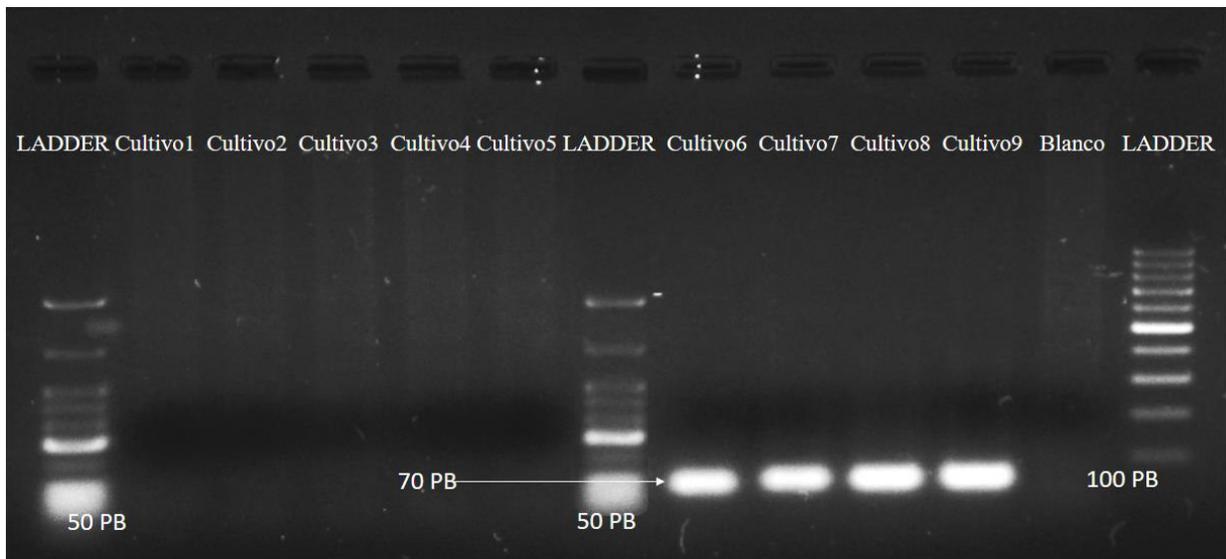
Los 9 cultivos, usando los cebadores PASSOS F-PASSOS R obtuvieron un producto de 120 pb, amplicón que pertenece al género *Leishmania*⁽¹¹²⁾. Además, se observa que los productos presentan bandas nítidas libres de impurezas y un blanco sin producto (Fotografía N° 3).



Fotografía N° 3. Electroforesis de los productos amplificados por los cebadores PASSOS F-PASSOS R. En el carril 1 y 13: Marcador molecular de 100 pb ADN *Ladder Invitrogen*TM. Carril 7: Marcador molecular de 50 pb ADN *Ladder Invitrogen*TM. Carril 12: Blanco. Carriles 2 al 6 y 7 al 10: Cultivos del C1 al C9.

Fuente: Elaboración propia

Los cultivos C6 al C9 usando los cebadores MP1L-MP3H obtuvieron un producto 70 pb, amplicón que pertenece al subgénero *Viannia*⁽¹⁰⁸⁾. Los cultivos del C1 al C5 al no evidenciar producto pertenecieron al subgénero *Leishmania*. Los amplicones obtenidos con estos cebadores presentaron bandas nítidas libres de impurezas y un blanco sin producto (Fotografía N° 4).

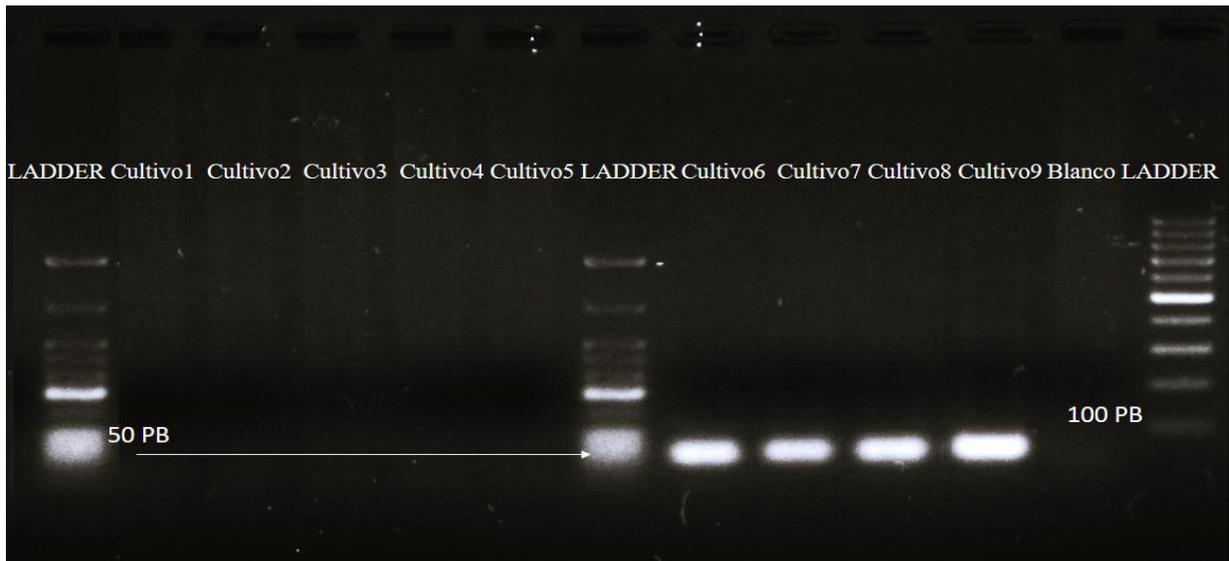


Fotografía N° 4. Electroforesis de los productos amplificados por los cebadores MP1L-MP3H. En el carril 1 y 7: Marcador molecular de 50 pb ADN *Ladder Invitrogen*TM. Carril 13: Marcador molecular de 100 pb ADN *Ladder Invitrogen*TM. Carril 12: Blanco. Carriles 2 al 6 y 7 al 10: Cultivos del C1 al C9.

Fuente: Elaboración propia

El último par de cebadores PASSOS F-MP3H al ser la combinación de dos cebadores de diferentes diseñadores, se evaluó la probable presencia de dímeros, bandas inespecíficas y la obtención de un amplicón del tamaño de 54 pb hallado en el programa AliView al enfrentar el par de cebadores con las secuencias de minicírculos y contar los nucleótidos que abarcaron.

Los cultivos del C1 al C5 no amplificaron ningún producto, mientras los cultivos del C6 al C9 sí evidenciaron el producto de 54 pb. Además, la electroforesis muestra productos con bandas nítidas libres de impurezas y el blanco no hubo producto, demostrando en estas condiciones de la PCR que no hay dímeros entre los cebadores usados (Fotografía N°5).



Fotografía N° 5. Electroforesis de los productos amplificados por los cebadores PASSOS F-MP3H. En el carril 1 y 7: Marcador molecular de 50 pb ADN *Ladder Invitrogen*TM. Carril 13: Marcador molecular de 100 pb ADN *Ladder Invitrogen*TM. Carril 12: Blanco. Carriles 2 al 6 y 7 al 10: Cultivos del C1 al C9.

Fuente: Elaboración propia

TEMPERATURAS DE FUSIÓN

Las temperaturas de fusión encontradas con los cebadores usados se detallan en la Tabla 7. Se aprecia que las temperaturas de fusión de los amplicones generados con los cebadores PASSOS F-PASSOS R presentan una diferencia de más de 1° C entre los cultivos del C1 al C5 y los cultivos del C6 al C9. Los amplicones de los cebadores MP1L-MP3H y PASSOS F-MP3H no generaron temperaturas de fusión con diferencias entre los cultivos C6 al C9.

Tabla 7. Temperaturas de fusión obtenidos de los cebadores evaluados

TEMPERATURA DE FUSIÓN DE LOS CEBADORES			
CULTIVO	PASSOS F-PASSOS R Amplicón 120 pb	MP1L-MP3H Amplicón 70 pb	PASSOS F-MP3H Amplicón 54 pb
C1	79.10	-	-
C2	79.10	-	-
C3	79.05	-	-
C4	79.10	-	-
C5	79.03	-	-
C6	80.85	80.45	77.45
C7	80.83	80.45	77.65
C8	80.80	80.40	77.60
C9	80.78	80.45	77.53

Fuente: Elaboración propia.

Las curvas de fusión de cada cultivo evaluado representados en las figuras N° 4, 5 y 6 se puede observar, que los picos de fusión de los amplicones se agrupan si las temperaturas de fusión son iguales o cercanas, por ello, vemos los picos alineados en las figuras siguientes.

En los cebadores PASSOS F- PASSOS R, los amplicones generados con los cultivos C1 al C5 obtuvo temperaturas de fusión similares con picos de fusión alineados al igual que los cultivos del C6 al C9 con picos de fusión similares pero diferentes al otro grupo de cultivos (Figura N° 4).

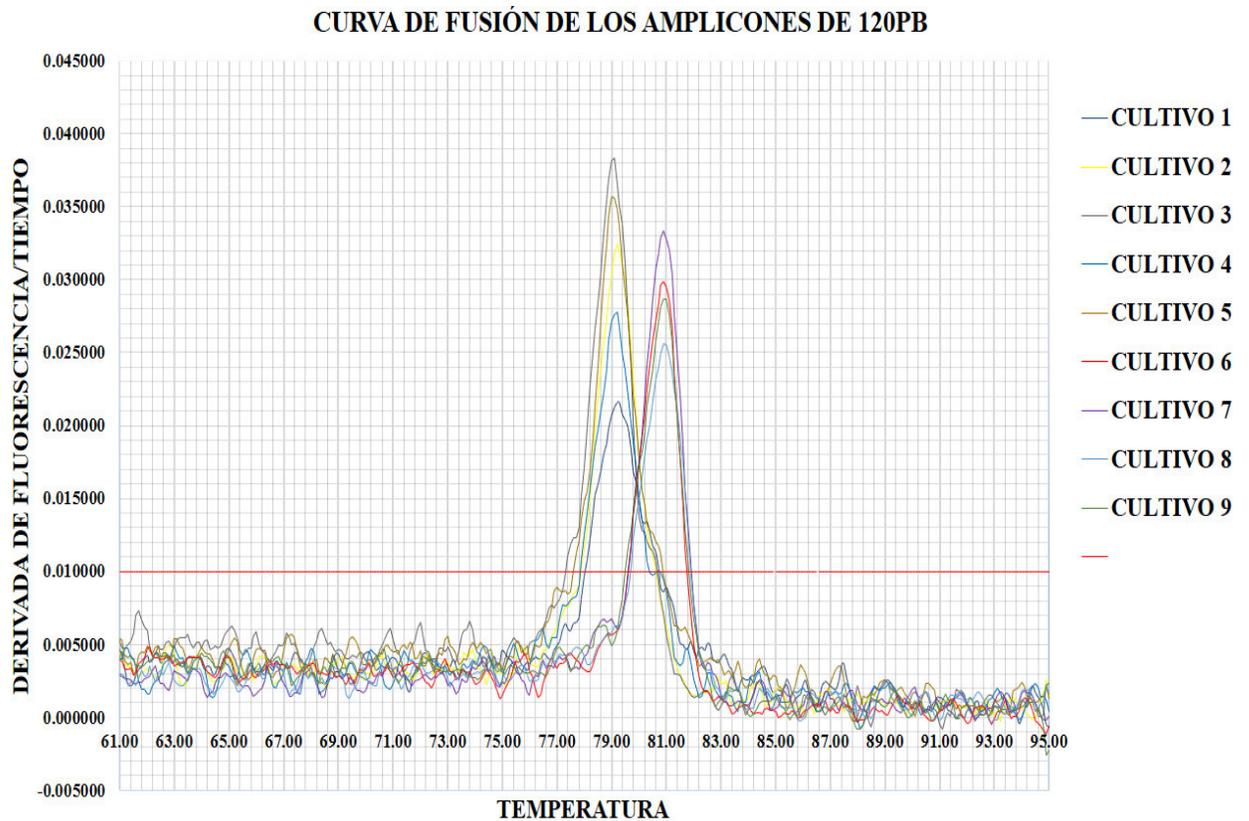


Figura N° 4. Curvas de fusión de los amplicones de 120 pb obtenidos de los 9 cultivos de *Leishmania* usando los cebadores PASSO F-PASSOS R.

Fuente: Elaboración propia

Los amplicones de 70 pb generados con los cebadores MP1L-MP3H de los cultivos C6 al C9 obtuvo temperaturas similares y picos de fusión alineados al igual que los amplicones de 54 pb generados con los cebadores PASSOS F-MP3H con los mismos cultivos (Figura N°5 y 6).

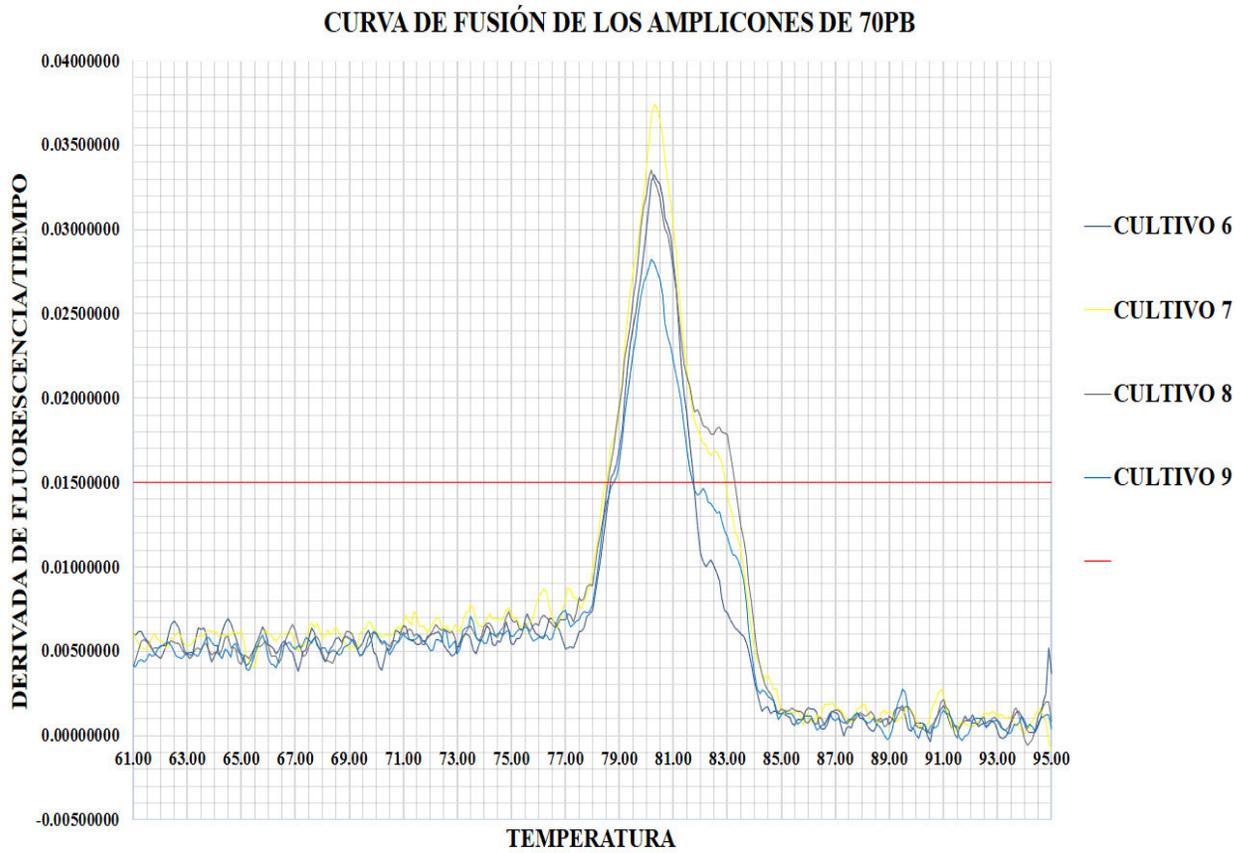


Figura N° 5. Curvas de fusión de los amplicones de 70 pb obtenidos de los cultivos del C6 al C9 de *Leishmania* usando los cebadores MP3H-MP1L.

Fuente: Elaboración propia

CURVA DE FUSIÓN DE LOS AMPLICONES DE 54 PB

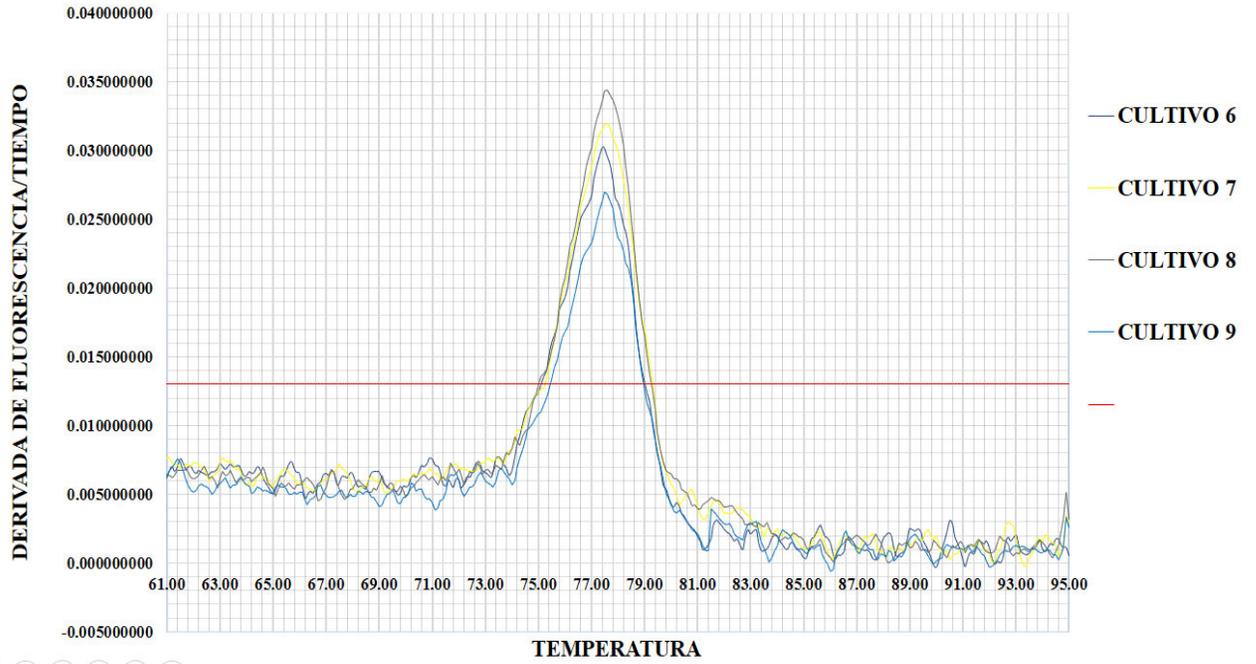


Figura N° 6. Curvas de fusión de los amplicones de 54 pb obtenidos de los cultivos C6 al C9 de *Leishmania* usando los cebadores PASSOS F-MP3H

Fuente: Elaboración propia

LÍMITE DE DETECCIÓN DE LOS CEBADORES SELECCIONADOS

Los límites de detección de los cebadores usados en este estudio fueron hallados mediante dilución seriada a partir de 100 ng hasta 1 fg de ADN extraído de los cultivos de *Leishmania*. Para el límite de detección se informó los resultados del CT (*Threshold Cycle*) hallado con la PCR a tiempo real y las temperaturas de fusión donde se evidencio picos de fusión homogéneos en las curvas de fusión con el PCR HRM. Los tres pares de cebadores se evaluaron tomando como referencia un cultivo de *Leishmania* que amplifique cada uno de ellos.

Los CT hallados al amplificar el ADN de los cultivos de *Leishmania* usando los cebadores PASSOS F- PASSOS R a una concentración de 100 ng, obtuvieron valores cercanos entre los cultivos del C1 al C5 y diferentes a los CT de los cultivos de los cultivos C6 al C9 siendo el cultivo C6 un poco diferente entre estos últimos cultivos. En cuanto a los pares de cebadores MP1L-MP3H y PASSOS F-MP3H los CT hallados al amplificar el ADN de *Leishmania* de los cultivos C6 al C9 a una concentración de 100 ng, se observó que el CT del cultivo C6 presentó un valor mayor a los demás cultivos amplificados por estos cebadores (Tabla 8).

Tabla 8. CT de todos los cultivos de *Leishmania* con cada cebador usado con una concentración de 100 ng de ADN

CULTIVO	CT DE LOS CEBADORES		
	PASSOS F-PASSOS R	MP1L-MP3H	PASSOS F-MP3H
C1	23.02	-	-
C2	25.35	-	-
C3	24.60	-	-
C4	24.27	-	-
C5	23.47	-	-
C6	11.12	11.81	12.36
C7	7.31	7.31	8.57
C8	7.65	7.27	8.56
C9	7.46	7.43	8.86

Fuente: Elaboración propia

El límite de detección de los cebadores PASSOS F-PASSOS R se evaluó usando los cultivos C5 y C6; cada uno representa a un grupo de los 2 que se observan en las curvas de fusión de la figura N° 4. Los límites de detección de los cebadores MP1L-MP3H y PASSOS F-MP3H se halló usando el cultivo C6 como representante, ya que no hubo diferencias en las curvas fusión de los amplicones de los cultivos C6 al C9 con estos cebadores (Figura N° 5 y 6).

Antes de las extracciones de ADN total de los cultivos de *Leishmania* se identificó la concentración parasitaria de cada uno; por lo que además de contar con una concentración de ADN conocida, también se contó con la concentración de parásito de *Leishmania* al momento de hallar el límite de detección de estos cebadores.

El par de cebadores PASSOS F-PASSOS R presento un CT de 24.24, en el cultivo C5, mayor al CT del cultivo C6, que fue de 11.28 a una concentración de 100 ng de ADN. El CT máximo detectable por el equipo con el cultivo C5 fue de 35.1 con una concentración de 100 fg equivalente a 0.3 parásitos y para el cultivo C6 fue de 10 fg o 0.1 parásitos, con un CT de 34.75 por lo que, se entiende que la cantidad de minicírculos dentro del kinetoplasto a la misma concentración de ADN total extraído en los cultivos C5 y C6 no es el mismo (Tabla 9).

En los otros pares de cebadores, el CT máximo detectable al amplificar una concentración de 100 fg de ADN del cultivo C6 con los cebadores MP1L-MP3H fue de 30.9 que equivale a 0.57 parásitos de *Leishmania* y el CT máximo detectable del cultivo C6 usando los cebadores PASSOS F-MP3H fue de 33.41 con una concentración de 100 fg de ADN que equivale a 0.57 parásitos de *Leishmania* (Tabla 9).

Tabla 9. Límite de detección de los CT hallados

CONCENTRACIÓN DE ADN	CULTIVO C5		CULTIVO C6			
	Nº DE PARÁSITO	CT CEBADORES PASSOS F-PASSOS R	Nº DE PARÁSITO	CT CEBADORES PASSOS F-PASSOS R	CT CEBADORES MP1L-MP3H	CT CEBADORES PASSOS F-MP3H
100 ng	338159.6	24.24	566004.2	11.28	11.81	12.36
10 ng	33816.0	25.79	56600.4	13.25	13.73	14.59
1 ng	3381.6	27.44	5660.0	15.55	16.05	17.21
100 pg	338.2	29.20	566.0	18.26	18.92	20.32
10 pg	33.8	31.08	56.6	21.45	22.30	23.98
1 pg	3.4	33.07	5.7	25.19	26.29	28.30
100 fg	0.3	35.10	0.6	29.58	30.99	33.41
10 fg			0.1	34.76		

Fuente: Elaboración propia

Los gráficos de las curvas de fusión de los cebadores evaluados con los cultivos C5 y C6 obtuvieron un límite de detección menor a diferencia de los hallados con los CT en el PCR a tiempo real. Se consideró que el límite de detección de las curvas de fusión mantuvieran un mismo pico en las diferentes concentraciones y conservaran la homogeneidad en las temperaturas⁽¹⁰⁴⁾.

En la Tabla 10, se observa las temperaturas de fusión de los 3 pares de cebadores, en donde los picos de las curvas de fusión son detectables y presentan homogeneidad en las temperaturas de fusión a las diferentes concentraciones de ADN de *Leishmania*. Los cebadores PASSOS F-PASSOS R con el cultivo C5 lograron producir picos de fusión hasta la concentración de 100 pg y con el cultivo C6, obtuvieron picos de fusión hasta la concentración de 100 fg. Los cebadores MP1L-MP3H con el cultivo C6 presentaron picos de fusión hasta la concentración de 1 pg, y los cebadores PASSOS F-MP3H obtuvo picos de fusión hasta la concentración de 10 pg con el mismo cultivo.

Tabla 10. Límite de detección de los cebadores usados a diferentes concentraciones y temperaturas de fusión con picos de fusión detectables

CEBADORES	TM CEBADOR PASSOS F-PASSOS R (°C)		TM CEBADOR MP1L-MP3H (°C)	TM CEBADOR PASSOS F- MP3H (°C)
	CULTIVO C5	CULTIVO C6	CULTIVO C6	
CONCENTRACIÓN DE ADN				
100 ng	79.03	80.85	80.45	77.45
10 ng	79.20	80.90	80.55	77.50
1 ng	79.00	80.90	80.55	77.80
100 pg	79.00	80.75	80.55	77.80
10 pg	----	80.80	80.55	77.50
1 pg	----	80.65	80.55	----
100 fg	----	80.65	----	----
10 fg	----	----	----	----
1 fg	----	----	----	----

Fuente: Elaboración propia

En los gráficos de las curvas de fusión de cada cebador se aprecia hasta dónde la concentración de ADN usada puede emitir la fluorescencia adecuada para que el equipo la detecte y construya luego una curva de fusión con un pico observable.

Las curvas de fusión con los cebadores PASSOS F-PASSOS R en el cultivo C5, solo se observó picos en las concentraciones de 10 ng, 1ng y 100 pg (Figura N° 7).

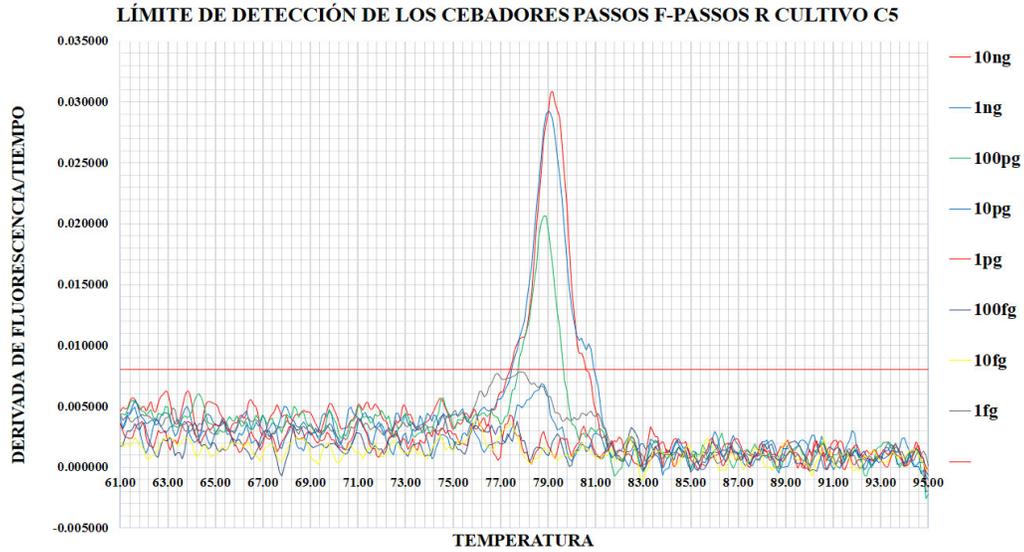


Figura N° 7. Curvas de fusión de los cebadores PASSOS F-PASSO R usando diferentes concentraciones de ADN del cultivo C5.

Fuente: Elaboración propia

En el cultivo C6 con los mismos cebadores, la curva de fusión evidencio picos hasta la concentración de 100 fg (Figura N° 8).

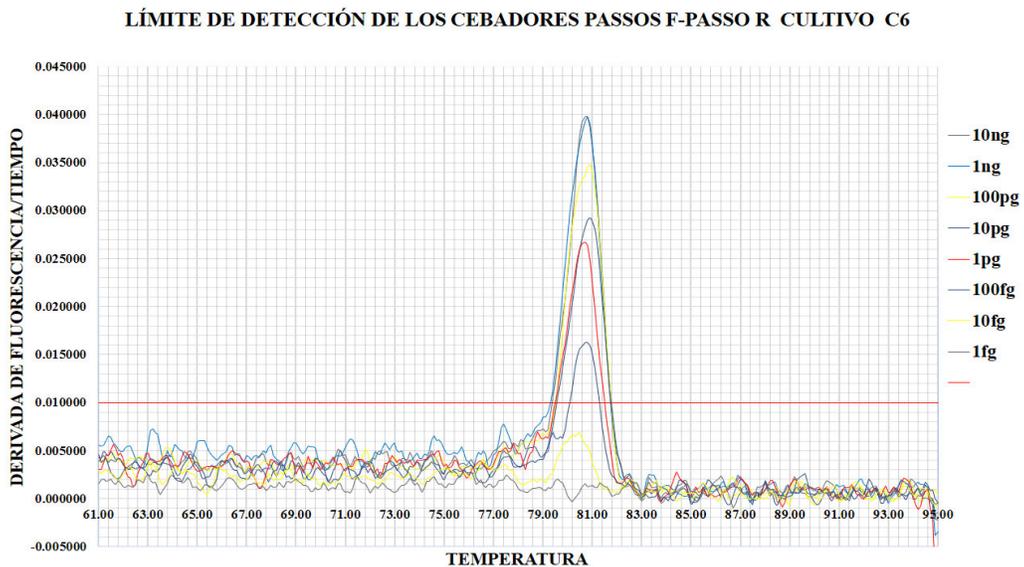


Figura N° 8. Curvas de fusión de los cebadores PASSOS F-PASSO R usando diferentes concentraciones de ADN del cultivo C6.

Fuente: Elaboración propia

La curva de fusión de los cebadores MP1L-MP3H evidenció picos con el cultivo C6 desde concentraciones de 10 ng, 1 ng, 100 pg 10 pg y 1 pg (Figura N° 9).

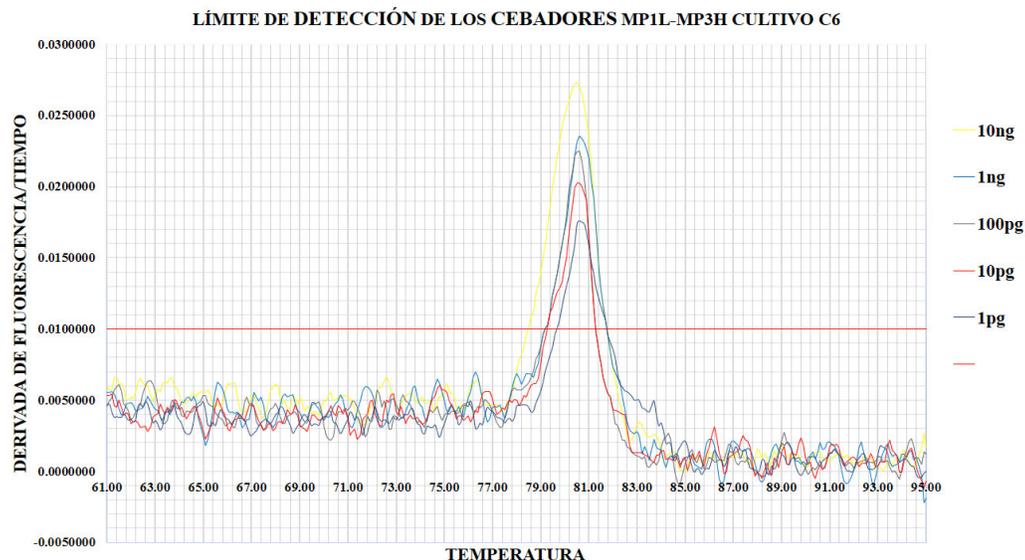


Figura N° 9. Curvas de fusión de los cebadores MP1L-MP3H usando diferentes concentraciones de ADN del cultivo C6.

Fuente: Elaboración propia

Con los cebadores PASSOS F-MP3H y el cultivo C6, se halló picos observables en las curvas de fusión desde concentraciones de 10 ng, 1 ng, 100 pg y 10 pg (Figura N° 10).

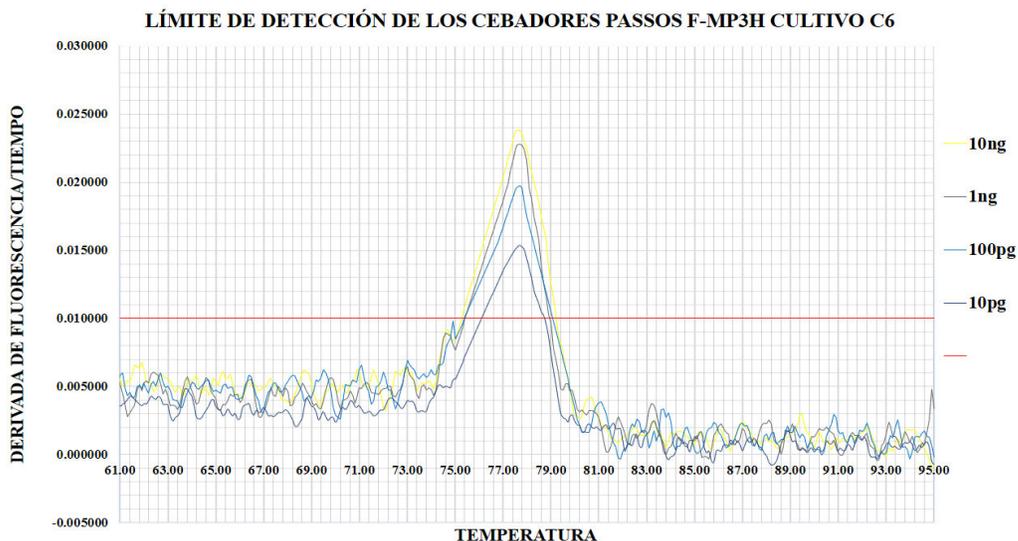


Figura N° 10. Curvas de fusión de los cebadores PASSOS F-MP3H usando diferentes concentraciones de ADN del cultivo C6.

Fuente: Elaboración propia

ESPECIFICIDAD DE LOS CEBADORES

Los cebadores usados han sido diseñados y probados por los autores descritos en la bibliografía. Se revisó si los cebadores presentaron la especificidad en los estudios presentados por los siguientes autores, tales como: Cardoso *et al.* demostraron que los cebadores MP1L-MP3H eran específicos para el subgénero *Leishmania* (V.), y no amplificaron *Leishmania* (L.) *amazonensis*, *Leishmania mexicana*, *Leishmania donovani*, *Leishmania infantum*⁽¹⁰⁸⁾. Gabriel, en su estudio usando *Primer-BLAST*, encontró que los cebadores MP1L-MP3H presentaron similitudes con la *Leishmania* (V.) *braziliensis*, *Leishmania major*, *Leishmania donovani* y *Macaca mulata*⁽⁷⁸⁾. Gomes *et al.* usaron estos cebadores con un cultivo de *Trypanosoma cruzi* hallando amplificación con un CT de 30.05 con una temperatura de anillamiento de 58 °C a diferencia de la usada en este estudio de 65 °C⁽¹²⁾. Los cebadores PASSOS F-PASSOS R en el ensayo de Pita *et al.* no amplificaron *Trypanosoma cruzi*, tampoco al vector *Lutzomyia* ni sangre periférica de pacientes sanos para descartar de leishmaniosis visceral⁽¹⁵⁾.

DIFERENCIAS DE TEMPERATURAS ENTRE LOS CULTIVOS DE *Leishmania*

A las temperaturas de fusión halladas con los amplicones generados con los cebadores PASSOS F-PASSOS R, usando los cultivos de *Leishmania*, presentaron diferencias estadísticamente significativas con un $p < 0.05$. Las temperaturas halladas se enfrentaron mediante el método estadístico Tukey, basado en comparaciones múltiples. Las temperaturas de fusión de los cultivos C1 al C5 son diferentes a los cultivos C6 al C9, $p < 0.05$. Además, con las temperaturas halladas se agrupo en dos subconjuntos homogéneos: en el primer subconjunto a los cultivos C1 al C5 sin diferencias estadísticas; y en el segundo, a los cultivos C6 al C9 (0.810 ; $p > 0.05$), Tabla 11.

Tabla 11. Comparación de las temperaturas de fusión usando los cebadores PASSOS F-PASSOS R

SUBCONJUNTOS HOMOGÉNEOS DE LAS TEMPERATURAS DE FUSIÓN DE LOS CEBADORES PASSOS F-PASSOS R		
CULTIVO DE <i>Leishmania</i>	Subconjunto para $p = 0.05$	
	1	2
C5	79.025	
C3	79.050	
C1	79.100	
C2	79.100	
C4	79.100	
C9		80.775
C8		80.800
C7		80.825
C6		80.850
Significancia	0.810	0.810

Fuente: Elaboración propia

El gráfico de cajas, se aprecia claramente los dos subconjuntos homogéneos de temperaturas de fusión entre los cultivos C1 al C5 y los cultivos C6 al C9 (Figura N° 11).

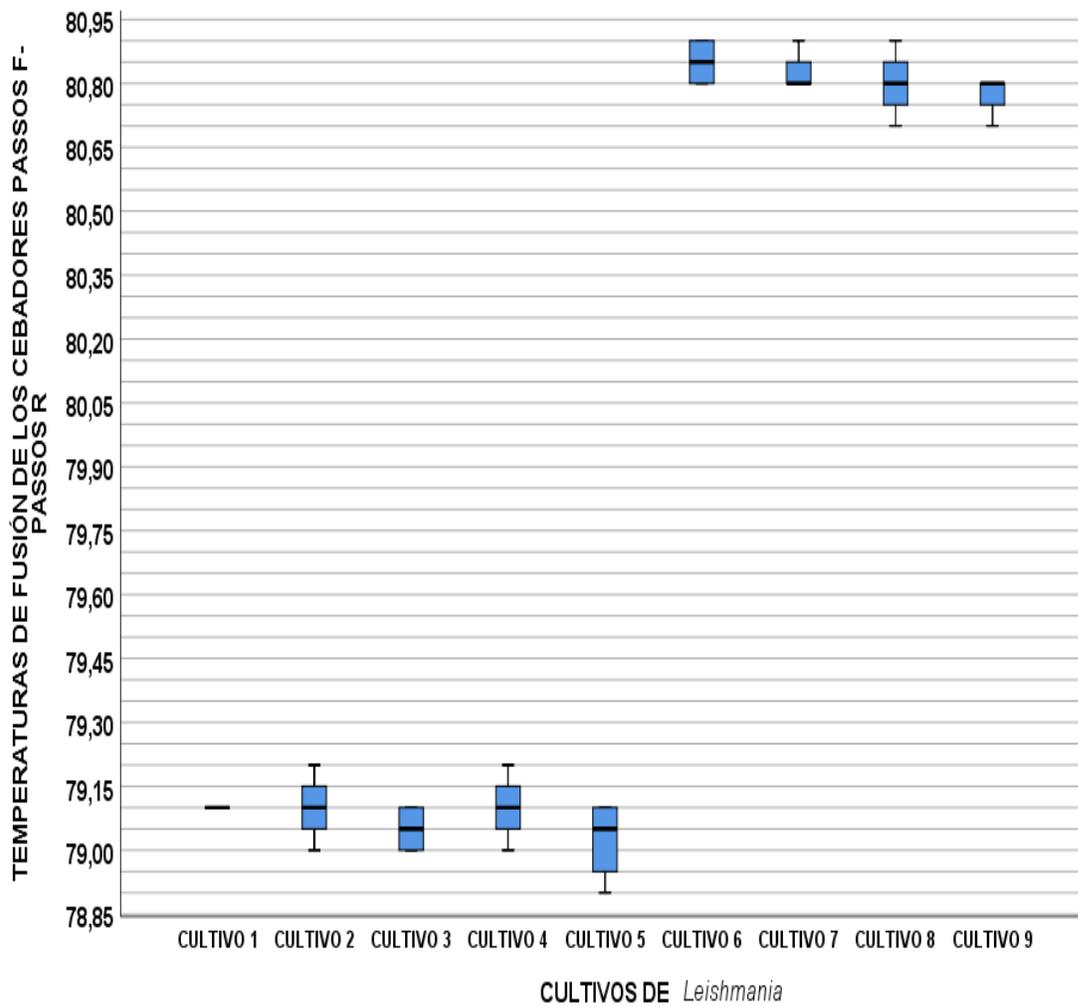


Figura N° 11. Temperaturas de fusión de los cebadores PASSOS F-PASSOS R de los cultivos de *Leishmania* C1 al C9.

Fuente: Elaboración propia.

Con los cebadores MP1L-MP3H, al realizar el test de ANOVA, se obtuvo temperaturas de fusión similares (0.956 ; $p > 0.05$) sin diferencias estadísticamente significativas entre los amplicones de los cultivos C6 al C9, (Figura N° 12).

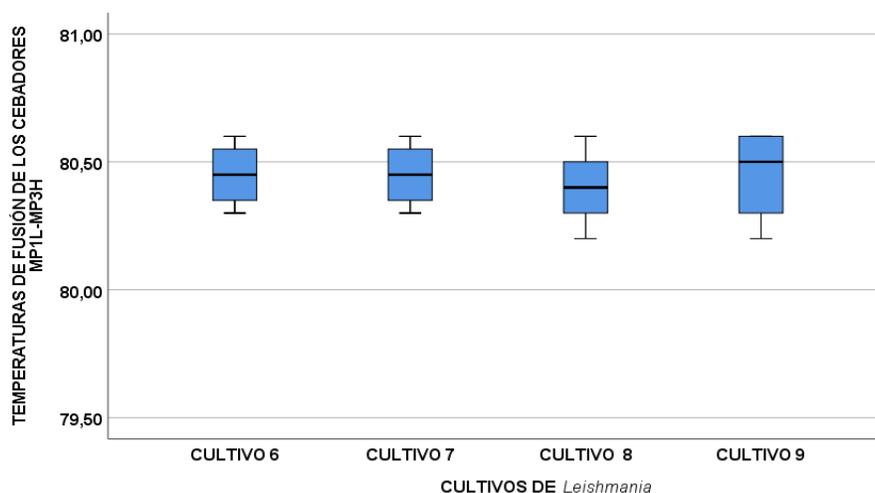


Figura N° 12. Temperaturas de fusión de los cebadores MP1L-MP3H de los cultivos de *Leishmania* C6 al C9.

Fuente: Elaboración propia

Al aplicar el test de ANOVA a las temperaturas halladas con los cebadores PASSOS F-MP3H de los cultivos C6 al C9, se halló que existe diferencia significativa (0.03 ; $p < 0.05$), al presentar diferencias entre las temperaturas halladas con estos cebadores, se aplicó el método de múltiples comparaciones Tukey, a partir de la cual las temperaturas de fusión del cultivo C6 fueron diferentes al cultivo C7 (0.028 ; $p < 0.05$) y a la vez estos dos cultivos por separados fueron estadísticamente similares a los demás (con 0.113 ; $p > 0.05$ y 0.217 ; $p > 0.05$ respectivamente) (Tabla 12).

Tabla 12. Comparación de las temperaturas de fusión halladas usando los cebadores PASSOS F-MP3H

SUBCONJUNTOS HOMOGÉNEOS DE LAS TEMPERATURAS DE FUSIÓN DE LOS CEBADORES PASSOS F-MP3H		
CULTIVO DE <i>Leishmania</i>	Subconjunto para $p = 0.05$	
	1	2
C6	77.45	
C9	77.53	77.53
C8	77.60	77.60
C7		77.65
Significancia	0.113	0.217

Fuente: Elaboración propia

Las temperaturas de fusión se agruparon en dos subconjuntos: en el primero se incluyeron a los cultivos C6, C8 y C9; y en el segundo, a los cultivos C7, C8 y C9. En la Figura N° 13 se observa las temperaturas de fusión halladas mediante diagrama de cajas.

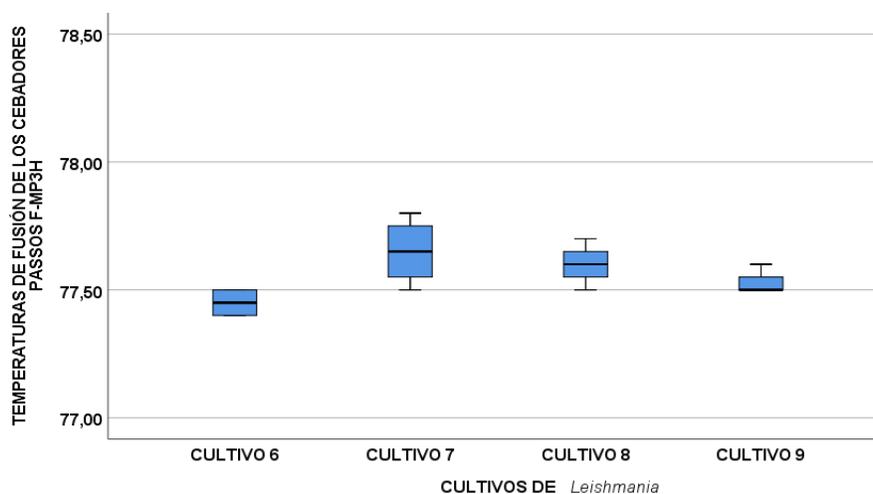


Figura N° 13. Temperaturas de fusión de los cebadores PASSOS F-MP3H 54 pb de los cultivos de *Leishmania* C6 al C9.

Fuente: Elaboración propia

COMPORTAMIENTO DE LOS CULTIVOS FRENTE A LAS TEMPERATURAS DE FUSIÓN HALLADAS

Los cultivos C1 al C5 presentaron recuentos parasitarios altos y temperaturas de fusión similares de 79.08 ± 0.03 °C al usar los cebadores PASSOS F-PASSOS R, por lo cual se agrupan en un subconjunto; mientras que en otro a los cultivos C6 al C9, con temperaturas similares de 80.82 ± 0.03 °C y recuentos bajos o iguales al inóculo inicial. Con respecto a los tiempos de generación los cultivos C1 al C4 eran similares con 13.7 ± 1.7 h y el cultivo C5 también era muy cercano a estos con 10.6 h, pero, diferente a los cultivos C6 al C9 que presentaron similitudes y diferencias previamente descritas entre ellas (Tabla 13).

Tabla 13. Temperaturas de fusión de los cebadores PASSOS F-PASSOS R frente al comportamiento parasitario (recuento y tiempo de generación)

CULTIVO	CRECIMIENTO PARASITARIO MÁXIMO POR mL	TEMPERATURAS DE FUSIÓN	SUBCONJUNTOS DE TEMPERATURAS DE FUSIÓN	TIEMPO DE GENERACIÓN	SUBCONJUNTOS TIEMPOS DE GENERACIÓN		
C1	8.02E+07	79.03	0.810; $p > 0.05$	13.84	0.09; $p > 0.05$		
C2	3.51E+07	79.05		15.22			
C3	6.85E+07	79.10		13.38			
C4	9.09E+07	79.10		10.64			0.79; $p > 0.05$
C5	9.75E+07	79.10		8.34			0.00; $p < 0.05$
C6	1.11E+03	80.85	0.810; $p > 0.05$	32.59	0.00; $p < 0.05$		
C9	1.11E+03	80.78		32.59			1.00; $p > 0.05$
C7	1.11E+03	80.83		69.35			0.00; $p < 0.05$
C8	1.23E+03	80.80		51.55			0.00; $p < 0.05$

Fuente: Elaboración propia

$p > 0.05$ no hay diferencias significativas; $p < 0.05$ hay diferencias significativas.

Los cebadores MP1L-MP3H y PASSOS F-MP3H enfrentados con el comportamiento de crecimiento de los cultivos de *Leishmania* C6 al C9 no demostraron gran diferencia entre ellos.

Los cebadores MP1L-MP3H carecieron de diferencias entre las temperaturas de fusión en los cultivos C6 al C9, con alrededor de 80.44 ± 0.02 °C. En cuanto el crecimiento parasitario, todos tuvieron recuentos bajos; los tiempos de generación de los cultivos C6 y C9 fueron

similares con 32.59 h; y en los cultivos C7 y C8 fueron diferentes a los otros 2 cultivos y entre ellos (Tabla 14).

Tabla 14. Temperaturas de fusión de los cebadores MP1L-MP3H frente al comportamiento parasitario (recuento y tiempo de generación)

CULTIVO	CRECIMIENTO PARASITARIO MÁXIMO POR mL	TEMPERATURAS DE FUSIÓN	SUBCONJUNTOS DE TEMPERATURAS DE FUSIÓN	TIEMPO DE GENERACIÓN	SUBCONJUNTOS TIEMPOS DE GENERACIÓN
C6	1.11E+03	80.45		32.59	1,00; $p > 0.05$
C9	1.11E+03	80.45		32.59	
C7	1.11E+03	80.45	0.956; $p > 0.05$	69.35	0.000; $p < 0.05$
C8	1.23E+03	80.40		51.55	0.00; $p < 0.05$

Fuente: Elaboración propia

$p > 0.05$ no hay diferencias significativas; $p < 0.05$ hay diferencias significativas.

Las temperaturas de fusión de los cebadores PASSOS F-MP3H entre los cultivos C6 y C7 fueron estadísticamente distintas (0.028; $p < 0.05$), pero cada una fue similar a los cultivos C8 y C9 (0.113; $p > 0.05$ y 0.217; $p > 0.05$ respectivamente). En cuanto a los recuentos de estos cultivos, se observa que fueron bajos. Por su parte los tiempos de generación de los cultivos C6 y C9 eran similares, mientras que de los cultivos C7 y C8 fueron diferentes al resto (Tabla N° 15).

Tabla 15. Temperaturas de fusión de los cebadores PASSOS F-MP3H frente al comportamiento parasitario (recuento y tiempo de generación)

CULTIVO	CRECIMIENTO PARASITARIO MÁXIMO POR mL	TEMPERATURAS DE FUSIÓN	SUBCONJUNTOS DE TEMPERATURAS DE FUSIÓN	TIEMPO DE GENERACIÓN	SUBCONJUNTOS TIEMPOS DE GENERACIÓN
C6	1.11E+03	77.45		32.59	0.000; 1,000;
C9	1.11E+03	77.53	0.113; $p > 0.05$	32.59	0.217; $p > 0.05$
C8	1.11E+03	77.60		51.55	0.000; $p < 0.05$
C7	1.23E+03	77.65		69.35	0.000; $p < 0.05$

Fuente: Elaboración propia

$p > 0.05$ no hay diferencias significativas; $p < 0.05$ hay diferencias significativas.

CAPÍTULO IV: DISCUSIÓN

4. DISCUSIÓN

La leishmaniosis es una enfermedad tropical desatendida. Los nuevos casos reportado por año asciende alrededor de 700 000 a 1 000 000. Esta enfermedad desfigurante, en sus formas cutánea, mucocutánea o cutánea difusa están presente en el Perú y en otros países del mundo⁽¹⁻⁴⁾. Los métodos referenciales para el diagnóstico presentan problemas de sensibilidad y rapidez en el resultado^(6,8). En el presente estudio, se evaluó la detección de *Leishmania* a partir del método de PCR a tiempo real y análisis de fusión de alta resolución con cebadores dirigidos a los minicírculos del kinetoplasto.

Lesmere *et al.* en su estudio concluyeron que la especie *Leishmania (V.) braziliensis* era difícil de cultivar *in vitro* usando el medio GLSH (Glucosa, Lactoalbumina, Suero y Hemoglobina), a diferencia de las otras especies. Al igual que en nuestro estudio, los cultivos que pertenecen al subgénero *L. Viannia* fueron difíciles de cultivar en medio Schneider y las curvas parasitarias halladas con estos fueron cercanas al del inóculo en el día 0 de la curva. Lesmere *et al.* al probar con mayores densidades de inóculo inicial con la especie *Leishmania (V.) braziliensis*, comenzando de 10 000 parásitos por mL, encontraron una curva sostenida a partir de 500 000 a 1 000 000 de parásitos por mL, esto debido a probables metabolitos excretados y secretados a mayores densidades que favorecían el crecimiento⁽¹¹³⁾. En el estudio de Aylas *et al.*, la especie *Leishmania (L.) amazonensis* obtuvo mayores recuentos que la *Leishmania (V.) braziliensis* en medio Schneider a 26 °C. Lesmere *et al.* también presentaron en las *L. (L.) amazonensis* y *L. (L.) mexicana* curvas con densidades parasitarias superiores que las especies *L. (V.) braziliensis* y *L. (V.) guyanensis* con el medio de cultivo GLSH a 26 °C⁽¹¹⁴⁾. En el estudio de Calvay *et al.* realizaron una curva parasitaria para el subgénero *L. Viannia* a una concentración inicial de 500 parásitos por mL, al igual que nuestro estudio, pero, en contraste a nuestros resultados obtuvieron recuentos de *Leishmania (V.) peruviana* y *Leishmania (V.) braziliensis* cercanos a los 100 millones por mL, con una temperatura de incubación de 29 °C en medio Schneider. En cambio, Méndez *et al.* halló con el mismo subgénero en las especies *Leishmania (V.) braziliensis* y *Leishmania (V.) guyanensis* recuentos similares al nuestro de alrededor a 500 a 1000 parásitos por mL en medio Schneider a 26 °C^(89,115).

Los cebadores PASSOS F- PASSOS R, descritos por Passos *et al.*, amplificaron un producto de 120 pb con *L. Viannia*. Pita *et al.* obtuvieron el mismo amplicón con las especies *L. (L.) amazonensis* y *L. (V.) braziliensis* al igual que nuestro estudio. Los 9 cultivos utilizados presentaron el mismo amplicón, confirmando el género *Leishmania* en estos cultivos^(15,112). Cardoso *et al.*, al usar el par de cebadores MP1L-MP3H, obtuvieron amplicones de 70 pb con las especies que pertenecen al subgénero *L. Viannia*: *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) naifi* y *L. (V.) shawi*, excepto las especies *L. (L.) amazonensis* y *L. (L.) mexicana*. Perez *et al.* obtuvieron el mismo producto con las especies *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis* y *L. (V.) peruviana*. Al igual que estos autores, se obtuvo el mismo amplicón con los cultivos del C6 al C9, lo cual indica que pertenecen al subgénero *L. Viannia*^(108,109). Cardoso *et al.* demostraron la especificidad de estos cebadores al no amplificar al subgénero *L. Leishmania*. Nuestros cultivos C1 al C5 tampoco amplificaron con estos cebadores indicando que pertenecen a este subgénero⁽¹⁰⁸⁾.

Los resultados de Sevilha *et al.* usando los cebadores PASSOS F-PASSOS R, al igual que este estudio, demostraron obtener 2 temperaturas diferentes con los amplicones de 120 pb entre los dos subgéneros de *Leishmania* con las cepas de referencia. El autor halló entre las especies *Leishmania (V.) braziliensis* un $T_m = 77.69$ °C y con la *Leishmania (L.) amazonensis* un $T_m = 78.03$ °C⁽¹⁰⁾. El estudio presentado por Pita *et al.* también demostró diferencias entre los dos subgéneros; al usar estos cebadores se halló temperaturas de fusión con las especies *Leishmania (V.) braziliensis* y *Leishmania (V.) shawi* de 77.34 °C y de *Leishmania (L.) amazonensis* de 78.95 °C⁽¹⁵⁾.

Entre los cultivos evaluados en el presente estudio con los cebadores PASSOS F-PASSOS R se presentó una temperatura de fusión mayor en el subgénero *L. Viannia* (cultivos del C6 al C9) $T_m = 80.81 \pm 0.03$ °C que en el subgénero *L. Leishmania* (cultivos del C1 al C5) $T_m = 79.07 \pm 0.03$ °C. Los autores Ceccarelli *et al.* y Pita *et al.* mencionaron que las temperaturas eran mayores en el subgénero *Leishmania (L.)* por contener mayor cantidad de GC (G=guanina, C= citosina) en las secuencias amplificadas, que en el subgénero *L. Viannia*. A pesar de que Ceccarelli *et al.* usaron 2 pares de cebadores diferentes a los de este estudio, los cebadores Mary F-Mary R discriminaron los 2 subgéneros con una diferencia mínima, y se obtuvo una temperatura de fusión mayor con el subgénero *L. Viannia* que con el subgénero

L. Leishmania con 87.67 °C y 87.62 °C, respectivamente; su otro par de cebadores MLF-MLR discriminó con mayor diferencia *L. Viannia* y *L. Leishmania* con Tm de 85.01 °C y 85.74 °C respectivamente^(13,15).

Los cebadores usados por Ceccarelli *et al.* se dirigen a la misma región que amplifica el producto de 120 pb con nuestros cebadores, por ello se explica la similitud de las Tm halladas con Sevilha *et al.* y Pita *et al.*, las cuales fueron mayores en el subgénero *L. Leishmania* a pesar de usar cebadores diferentes^(10,13,15). Galluzi *et al.* mencionaron que la heterogeneidad de las clases de minicírculos puede ser afectada con los pasajes continuos de cultivos cambiando el predominio de alguna subpoblación de minicírculos presente en el kinetoplasto⁽¹¹⁶⁾.

El CT hallado con los cebadores PASSOS F-PASSOS R por Sevilha *et al.* con la *Leishmania (L.) amazonensis* fue CT = 21.57, el cual estuvo cerca al obtenido con los cultivos C1 al C5 (subgénero *L. Leishmania*) que fue en promedio un CT = 24.14 ± 0.92 y, en la especie *Leishmania (V.) braziliensis* el autor halló un CT = 10.49 cercano al obtenido en los cultivos C6 al C9 (subgénero *L. Viannia*), el cual obtuvo un CT promedio de 8.38 ± 1.58⁽¹⁰⁾. Los datos hallados describen que el subgénero *Leishmania (L.)* presenta menos copias de minicírculos dentro del kinetoplasto que el subgénero *Leishmania (V.)*. Brewster, en su estudio evaluó las poblaciones de minicírculos de las especies del subgénero *L. Viannia* halló diferencias en las cantidades y clases de minicírculos, al igual que Kocher, *et al.*, quienes mencionaron usar estas características propias entre especies de *Leishmania* como huella dactilar para su caracterización en un futuro^(39,117).

Las Tm halladas con los cebadores MP1L-MP3H no muestran diferencias estadísticamente significativas (Tm = 80.44 ± 0.14 °C). Este resultado no indica que los cultivos C6 al C9 puedan ser especies iguales, sino que este método no encontró diferencias entre los cultivos al analizar estos amplicones. Gomes *et al.* usaron estos cebadores, pero no menciona si lograron discriminar entre la *Leishmania (V.) braziliensis* y *Leishmania (V.) guyanensis*; sin embargo, se observa que los CT hallados de estas 2 cepas eran de 10.84 y 25.13, respectivamente. En nuestro estudio, los cultivos C6 al C9 obtuvieron un CT promedio de 8.45 ± 1.93⁽¹²⁾.

Los cebadores PASSOS F-MP3H al generar un amplicón más pequeño (54 pb) se esperó encontrar alguna diferencia en las temperaturas de fusión entre los cultivos C6 al C9 (*L. Viannia*). Este par de cebadores fue una combinación similar a la que hizo Belli *et al.* con los cebadores 13A–13B y MP1L-MP3H formando el nuevo par de cebadores 13A–MP3H con un producto de 54 pb⁽¹¹⁸⁾.

Belli *et al.* con estos cebadores amplificó las especies: *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis* y *L. (V.) panamensis*; menos las especies: *L. (L.) amazonensis* y *L. (L.) mexicana*. En la bibliografía revisada, no se encontró algún autor que realizara esta combinación para comparar nuestros resultados, ya que fue una invención con el objetivo de obtener un par de cebadores con un menor tamaño de amplicón y una mayor resolución en la temperatura de fusión. Las temperaturas de fusión halladas con estos cebadores no generó datos concluyentes entre los cultivos; esto se debió a que las Tm de los cultivos C6 y C7 eran diferentes entre ellos, pero la Tm del cultivo C6 además era similar a las Tm de C8 y C9; y la Tm de C7 de la misma forma era similar a las Tm de C8 y C9; sin embargo, aunque no se pueda observar una clara diferencia significativa, tampoco se puede afirmar que estos cebadores no puedan discriminar entre especies de *Leishmania* sin tener los datos de la secuenciación de los cultivos y de los amplicones obtenidos con estos cebadores para la verificación si hubiera algún polimorfismo entre estos.

Los límites de detección de los cebadores PASSOS F- PASSOS R mediante PCR HRM fue de 100 pg o 338 parásito con el subgénero *L. Leishmania* y de 100 fg o 0.6 parásito con el subgénero *L. Viannia*, Sevilha *et al.* hallaron un límite de cuantificación de 1 pg de ADN o 12.02 equivalente de parásito mediante PCR a tiempo real con diluciones seriadas con la especie *Leishmania (V.) braziliensis* llegando a una CT de 26.03. El límite de detección usando la PCR a tiempo real para el subgénero *L. Viannia* en nuestro estudio fue de 10 fg que equivale a 0.1 parásito y a la concentración de obtenida Sevilha *et al.* de 1pg se obtuvo un CT de 25.17⁽¹⁰⁾. Ceccarelli *et al.*, aunque no usaron nuestros cebadores, detectaron 0.1 equivalente de parásitos en su ensayo de PCR HRM con 30 ng de ADN canino de fondo, evaluando que las temperaturas de fusión estén constantes con un coeficiente de variación muy bajo y picos de fusión homogéneos sin desplazamientos⁽¹³⁾.

En cuanto a los cebadores MP1L-MP3H, el límite de detección encontrado por Gomes *et al.* fue alrededor de 0.06 equivalentes de ADN de parásito en la PCR a tiempo real. En este estudio, hallamos mediante PCR a tiempo real un límite de 100 fg que equivale a 0.57 parásitos y en cuanto al HRM el límite hallado fue de 1 pg o 5.6 parásitos⁽¹²⁾. Oliveira *et al.*, en una PCR convencional, detectaron con estos cebadores una cantidad de 2 fg y mencionó que los autores López *et al.* y Velásquez *et al.* obtuvieron valores mucho más pequeños de 0.14 fg y 0.9 fg, respectivamente^(64,69,72).

El límite de detección hallado con los últimos cebadores evaluados PASSOS F-MP3H fue de 100 fg o 0.57 con la PCR a tiempo real y, con el análisis de temperaturas de fusión, se detectó hasta un límite de 10 pg o 56.6 parásitos.

Los cebadores dirigidos al minicirculo son muy sensibles por la cantidad de copias que presentan, sin embargo, la variabilidad que presentan en las subpoblaciones o subclases dentro de los kinetoplasto de las especies de *Leishmania* y el elevado polimorfismo que presentan en sus secuencias son parte de la dificultad a la hora de interpretar estos tipos de ensayos^(39,117). Al usar las herramientas bioinformáticas, se observó que estas secuencias presentan de uno a más desajustes en diferentes cebadores publicados a pesar de la amplificación *in vitro* demostrada, por lo que se entiende que falta mucha información sobre las subpoblaciones de minicirculos para llegar a un mejor análisis de todas las especies de *Leishmania*.

En este estudio, se ha logrado la detección de *Leishmania* a nivel del género *Leishmania* y de subgéneros, *L. Viannia* y *L. Leishmania* mediante PCR en tiempo real y análisis de fusión de alta resolución al utilizar cebadores dirigidos al minicirculo del kinetoplasto de promastigotes como una alternativa diagnóstica. Las diferencias de Tm entre especies de *Leishmania*, a partir de cultivos almacenados, muestras clínicas o cepas de referencia, pueden ser evidenciados con este método, por ello debe ser mejorado y validado en campo antes de ser utilizado para el diagnóstico en laboratorios de centros asistenciales de zonas endémicas de leishmaniosis en el Perú.

CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. CONCLUSIONES

- Los cebadores usados en este estudio, lograron amplificar el ADN de los cultivos de *Leishmania*, identificando dos Tm diferentes entre los amplicones de 120 pb, determinando el género y la presencia de 2 subgéneros. Al contrastar con los cebadores que generaron un amplicón de 70 pb, se diferenció que las dos Tm obtenidas del amplicón de 120 pb pertenecían a los subgéneros: *L. Viannia* y *L. Leishmania*. Además, la combinación de estos 2 pares de cebadores generó un amplicón de 54 pb, el cual no presentó diferencias en las Tm de los cultivos amplificados.
- Los cebadores seleccionados bajo el criterio planteado y con base a los estudios revisados fueron, primero, los de menor tamaño amplificado de 70 pb y por el par de cebadores MP1L-MP3H que solo amplifica al subgénero *L. Viannia*; el segundo par de cebadores PASSOS F-PASSOS R fue seleccionado por amplificar los dos subgéneros *in vitro* y poseer un tamaño de amplicón pequeño de 120 pb; y el tercer par de cebadores fue una combinación de los anteriores PASSOS F-MP3H contando con el menor tamaño dentro de los 3 cebadores usados de 54 pb.
- Los cebadores MP1L-MP3H solo obtuvieron temperaturas en los cultivos C6 al C9 sin diferencias significativas con Tm de 80.44 ± 0.14 °C. Con el par cebadores PASSOS F-PASSOS R las temperaturas de fusión se dividieron en dos grupos bien diferenciados: el primer grupo, los cultivos C1 al C5 (*L. Leishmania*) sin diferencias significativas entre ellos con un Tm de 79.07 ± 0.03 °C, y el segundo grupo, entre los cultivos C6 al C9 (*L. Viannia*) sin diferencias significativas con un Tm de 80.81 ± 0.03 °C. Por último, con los cebadores PASSOS F-MP3H, se halló diferencias entre los cultivos C6 y C7, pero estos dos cultivos eran similares a los cultivos C8 y C9 por separado con Tm de 77.45 ± 0.06 °C, 77.65 ± 0.12 °C, 77.60 ± 0.08 °C, 77.53 ± 0.05 °C respectivamente.
- Los cebadores MP1L-MP3H solo amplificaron los cultivos C6 al C9 que pertenecen al subgénero *L. Viannia*. Los cebadores PASSOS F-PASSO R diferenciaron los dos subgéneros por las temperaturas de fusión, en dos grupos: los cultivos C1 al C5 como subgénero *L. Leishmania* y el C6 al C9 como subgénero *L. Viannia*. Los cebadores PASSOS F-MP3H solo amplificaron el subgénero *Viannia* conformado por los cultivos

C6 al C9. Entre los cultivos de los dos grupos hallados, no se evidenció mayor diferencia en las temperaturas de fusión o picos de fusión que indicaran la presencia de especies diferentes con los cebadores usados, solo se logró detectar el género y discriminar entre subgéneros de *Leishmania*.

- Con los límites de detección con el método PCR HRM para los cebadores MP1L-MP3H se obtuvo 1 pg que equivale a 5.66 parásito; con los cebadores PASSOS F-PASSOS R con el subgénero *L. Leishmania* se obtuvo 100 pg o 338.2 parásito; y 100 fg o 0.57 parásito con el subgénero *L. Viannia*; por último, con los cebadores PASSOS F-MP3H se obtuvo 10 pg o 56.6 parásito.
- Las curvas parasitarias de los cultivos evaluados presentaron un patrón similar a lo obtenido con el PCR HRM, el subgénero *L. Leishmania* agrupó los cultivos C1 al C5, que obtuvieron los recuentos más altos cercanos a los 100 millones de parásitos por mL, y los cultivos C6 al C9 del subgénero *L. Viannia* presentaron los recuentos muy bajos cercanos al inóculo inicial de 500 parásitos por mL.

5.2. RECOMENDACIONES

- Nuestro estudio demostró que los cebadores PASSOS F-PASSOS R dirigidos al minicírculo del kinetoplasto logran diferenciar hasta el subgénero en contraste con los cebadores MP1L-MP3H. Sería necesario secuenciar los amplicones obtenidos usando las diferentes especies de *Leishmania* para evaluar dentro de estas las diferencias de nucleótidos hallados mediante las temperaturas de fusión como información para posteriores estudios, al igual que la secuenciación completa de los minicírculos del kinetoplasto.
- Para estudios posteriores, será necesario enfrentar los cebadores usados en este estudio en muestras clínicas para hallar la sensibilidad o simular muestras clínicas con ADN humano y material contaminante presente en estas lesiones.
- Para evaluar el método de PCR HRM usando las secuencias de los minicírculos de *Leishmania*, se recomienda estudiar a fondo las poblaciones de minicírculos existentes en cada especie. La amplificación de especies de *Leishmania* registrados con distintos cebadores, a pesar de la falta de homología de la secuencia de los cebadores y la secuencia del minicírculo presente en el *GenBank*, demuestra la importancia de definir las poblaciones de minicírculos que no están registrados en esta plataforma, lo cual ayudaría a ubicar o diseñar cebadores más adecuados para lograr detectar no solo el género o subgénero, sino también discriminar entre especies.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. La OMS presenta un nuevo plan a 10 años para poner fin al sufrimiento causado por las enfermedades tropicales desatendidas [Internet]. [citado 5 de julio de 2022]. Disponible en: <https://www.who.int/es/news/item/28-01-2021-who-issues-new-10-year-plan-to-end-suffering-from-neglected-tropical-diseases>
2. Scotti L, Scotti MT. Neglected Diseases - New Compounds and Treatments. *Curr Med Chem.* 2020;27(5):659-61.
3. Engels D, Zhou XN. Neglected tropical diseases: an effective global response to local poverty-related disease priorities. *Infect Dis Poverty.* 28 de enero de 2020; 9:10.
4. Leishmaniasis [Internet]. [citado 5 de julio de 2022]. Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>
5. Rosal Rabes T del, Baquero-Artigao F, García Miguel MJ. Leishmaniasis cutánea. *Pediatría Atención Primaria.* 2010;12(46):263-71.
6. Cuba Cuba C. Diagnóstico Parasitológico de la Leishmaniasis Tegumentaria Americana. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica.* 2000;17(1-4):39-52.
7. Hernández C, Alvarez C, González C, Ayala MS, León CM, Ramírez JD. Identification of six New World Leishmania species through the implementation of a High-Resolution Melting (HRM) genotyping assay. *Parasit Vectors.* 14 de noviembre de 2014; 7:501.
8. Reed GH, Kent JO, Wittwer CT. High-resolution DNA melting analysis for simple and efficient molecular diagnostics. *Pharmacogenomics.* junio de 2007;8(6):597-608.
9. Diotallevi A, Buffi G, Ceccarelli M, Neitzke-Abreu HC, Gnutzmann LV, da Costa Lima MS, et al. Real-time PCR to differentiate among Leishmania (Viannia) subgenus, Leishmania (Leishmania) infantum and Leishmania (Leishmania) amazonensis: Application on Brazilian clinical samples. *Acta Tropica.* 1 de enero de 2020; 201:105178.
10. Sevilha-Santos L, Júnior ACM dos S, Medeiros-Silva V, Bergmann JO, Silva EF da, Segato LF, et al. Accuracy of qPCR for quantifying Leishmania kDNA in different skin layers of patients with American tegumentary leishmaniasis. *Clinical Microbiology and Infection.* 1 de febrero de 2019;25(2):242-7.
11. Rojas Jaimes JE. Detección e identificación molecular de Leishmania (Viannia) guyanensis en garrapatas de la especie Rhipicephalus (Boophilus) microplus colectadas de Pecari tajacu, Madre de Dios. Repositorio de Tesis - UNMSM [Internet]. 2017 [citado 13 de julio de 2022]; Disponible en: <https://cybertesis.unmsm.edu.pe/handle/20.500.12672/6205>

12. Gomes CM, Cesetti MV, de Paula NA, Vernal S, Gupta G, Sampaio RNR, et al. 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. *J Clin Microbiol.* febrero de 2017;55(2):526-34.
13. Ceccarelli M, Galluzzi L, Migliazzo A, Magnani M. Detection and Characterization of *Leishmania (Leishmania)* and *Leishmania (Viannia)* by SYBR Green-Based Real-Time PCR and High Resolution Melt Analysis Targeting Kinetoplast Minicircle DNA. *PLOS ONE.* 13 de febrero de 2014;9(2): e88845.
14. Rojas N, Minaya G, Sandoval A, Caceres O. Diferenciación de especies de *Leishmania* mediante PCR en tiempo real. 2013.
15. Pita-Pereira D, Lins R, Oliveira MP, Lima RB, Pereira BA, Moreira OC, et al. SYBR Green-based Real-Time PCR targeting kinetoplast DNA can be used to discriminate between the main etiologic agents of Brazilian cutaneous and visceral leishmaniasis. *Parasites Vectors.* 12 de enero de 2012;5(1):15.
16. Montalvo AM, Fraga J, Monzote L, García M, Fonseca L. Diagnóstico de la leishmaniasis: de la observación microscópica del parásito a la detección del ADN. *Revista Cubana de Medicina Tropical.* agosto de 2012;64(2):108-31.
17. Dimier-David L, David C, Ravisse P, Bustillos R, Revollo S, Lyèvre P, et al. Parasitological diagnosis of mucocutaneous leishmaniasis due to *Leishmania b. braziliensis* in Bolivia. *Rev Soc Bras Med Trop.* diciembre de 1991;24(4):231-4.
18. Ramírez JR, Agudelo S, Muskus C, Alzate JF, Berberich C, Barker D, et al. Diagnosis of Cutaneous Leishmaniasis in Colombia: the Sampling Site within Lesions Influences the Sensitivity of Parasitologic Diagnosis. *J Clin Microbiol.* octubre de 2000;38(10):3768-73.
19. Luz ZMP, Silva AR da, Silva F de O, Caligorne RB, Oliveira E, Rabello A. Lesion aspirate culture for the diagnosis and isolation of *Leishmania* spp. from patients with cutaneous leishmaniasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* febrero de 2009;104(1):62-6.
20. Sotto MN, Yamashiro-Kanashiro EH, da Matta VLR, de Brito T. Cutaneous leishmaniasis of the new world: Diagnostic immunopathology and antigen pathways in skin and mucosa. *Acta Tropica.* 1 de marzo de 1989;46(2):121-30.
21. Schubach A, Cuzzi-Maya T, Oliveira AV, Sartori A, Oliveira-Neto MP de, Mattos MS, et al. Leishmanial antigens in the diagnosis of active lesions and ancient scars of American tegumentary leishmaniasis patients. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* octubre de 2001; 96:987-96.
22. Conter CC, Mota CA, dos Santos BA, de Souza Braga L, de Souza Terron M, Navasconi TR, et al. PCR primers designed for new world *Leishmania*: A systematic review. *Experimental Parasitology.* 1 de diciembre de 2019; 207:107773.

23. Farrar JS, Wittwer C. High-Resolution Melting Curve Analysis for Molecular Diagnostics. En: *Molecular Diagnostics: Third Edition*. 2017. p. 79-102.
24. David CV, Craft N. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Dermatol Ther*. 2009;22(6):491-502.
25. Gontijo B, de Carvalho M de LR. [American cutaneous leishmaniasis]. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2003;36(1):71-80.
26. Balmaseda NF. Consideraciones acerca de la taxonomía e identificación de *Leishmania* spp. 1 de enero de 2015;
27. Noyes HA, Morrison DA, Chance ML, Ellis JT. Evidence for a neotropical origin of *Leishmania*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2000;95(4):575-8.
28. Momen H, Cupolillo E. Speculations on the origin and evolution of the genus *Leishmania*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2000;95(4):583-8.
29. León L. Leishmanias y leishmaniasis. *Revista de la Facultad de Ciencias Médicas (Quito)*. 1957;8(1):5-109.
30. Steverding D. The history of leishmaniasis. *Parasites & Vectors*. 15 de febrero de 2017;10(1):82.
31. Gibson ME. The identification of kala-azar and the discovery of *Leishmania donovani*. *Med Hist*. abril de 1983;27(2):203-13.
32. Basano S, Camargo L, Camargo A. American cutaneous leishmaniasis: history, epidemiology and prospects for control. *Revista Brasileira de Epidemiologia*. 1 de septiembre de 2004;7.
33. Morales Hernández MÁ, Morales Hernández MÁ. Epidemiología molecular de la coinfección por «*Leishmania*»-VIH [Internet]. Universidad Complutense de Madrid, Servicio de Publicaciones; 2002 [citado 24 de junio de 2023]. Disponible en: <https://eprints.ucm.es/id/eprint/4591/>
34. Vickerman K, Preston TM. Spindle microtubules in the dividing nuclei of trypanosomes. *J Cell Sci*. marzo de 1970;6(2):365-83.
35. Britto C, Ravel C, Bastien P, Blaineau C, Pagès M, Dedet JP, et al. Conserved linkage groups associated with large-scale chromosomal rearrangements between Old World and New World *Leishmania* genomes. *Gene*. 5 de noviembre de 1998;222(1):107-17.
36. Cavalcanti DP, de Souza W. The Kinetoplast of Trypanosomatids: From Early Studies of Electron Microscopy to Recent Advances in Atomic Force Microscopy. *Scanning*. 19 de junio de 2018;2018: e9603051.

37. Shapiro TA, Englund PT. The Structure and Replication of Kinetoplast Dna. *Annual Review of Microbiology*. 1995;49(1):117-43.
38. VILLAVICENCIO EAD. TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE MAESTRO EN BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR.
39. Kocher A, Valière S, Bañuls AL, Murienne J. High-throughput sequencing of kDNA amplicons for the analysis of *Leishmania* minicircles and identification of Neotropical species. *Parasitology*. abril de 2018;145(5):585-94.
40. Akhoundi M, Downing T, Votýpka J, Kuhls K, Lukeš J, Cannet A, et al. *Leishmania* infections: Molecular targets and diagnosis. *Mol Aspects Med*. octubre de 2017; 57:1-29.
41. Yuil JR, Ríos EY de. Métodos diagnósticos parasitológicos, inmunológicos, histopatológicos y moleculares de leishmaniasis cutánea. *Revista Médico Científica [Internet]*. 2010 [citado 24 de junio de 2023];23(2). Disponible en: <https://www.revistamedicocientifica.org/index.php/rmc/article/view/260>
42. Saki J, Akhlaghi L, Maraghi S, Meamar AR, Mohebbali M, Oormazdi H, et al. Evaluation of Modified Novy-MacNeal-Nicolle Medium for Isolation of *Leishmania* Parasites from Cutaneous Lesions of Patients in Iran. *Research Journal of Parasitology*. 4(2):56-62.
43. Limoncu ME, Ozbilgin A, Balcioglu IC, Ozbel Y. Evaluation of three new culture media for the cultivation and isolation of *Leishmania* parasites. *J Basic Microbiol*. 2004;44(3):197-202.
44. Santarém N, Cunha J, Silvestre R, Silva C, Moreira D, Ouellette M, et al. The impact of distinct culture media in *Leishmania infantum* biology and infectivity. *Parasitology*. febrero de 2014;141(2):192-205.
45. Tamay de Dios L, Ibarra C, Velasquillo C. Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Investigación en discapacidad*. 2013;2(2):70-8.
46. Reithinger R, Dujardin JC. Molecular diagnosis of leishmaniasis: current status and future applications. *J Clin Microbiol*. enero de 2007;45(1):21-5.
47. Santamaría E, Ponce N, Puerta C, Ferro C. [Validation of PCR as a tool for the detection of *Leishmania* (Vianna) spp. parasites in the *Lutzomyia* (Diptera: Psychodidae) vector]. *Biomedica*. junio de 2005;25(2):271-9.
48. Xavier SC, de Andrade HM, Monte SJH, Chiarelli IM, Lima WG, Michalick MSM, et al. Comparison of paraffin-embedded skin biopsies from different anatomical regions as sampling methods for detection of *Leishmania* infection in dogs using histological, immunohistochemical and PCR methods. *BMC Vet Res*. 8 de junio de 2006; 2:17.

49. Bensoussan E, Nasereddin A, Jonas F, Schnur LF, Jaffe CL. Comparison of PCR assays for diagnosis of cutaneous leishmaniasis. *J Clin Microbiol.* abril de 2006;44(4):1435-9.
50. Wojdacz TK, Dobrovic A. Methylation-sensitive high resolution melting (MS-HRM): a new approach for sensitive and high-throughput assessment of methylation. *Nucleic Acids Res.* 2007;35(6): e41.
51. Prado Mantilla A. Evaluación de la técnica de análisis de fusión de alta resolución para la detección y genotipificación de los genogrupos humanos de sapovirus. 2017 [citado 24 de junio de 2023]; Disponible en: <https://repositorio.upch.edu.pe/handle/20.500.12866/713>
52. Arthofer W, Steiner FM, Schlick-Steiner BC. Rapid and cost-effective screening of newly identified microsatellite loci by high-resolution melting analysis. *Mol Genet Genomics.* octubre de 2011;286(3-4):225-35.
53. Introducción a la fusión de alta resolución (también conocida como HRM, HRMA, análisis de la curva de fusión) [Internet]. [citado 20 de junio de 2023]. Disponible en: https://dna-utah.org/Hi-Res/TOP_Hi-Res%20Melting.html
54. Montgomery J, Wittwer CT, Palais R, Zhou L. Simultaneous mutation scanning and genotyping by high-resolution DNA melting analysis. *Nat Protoc.* 2007;2(1):59-66.
55. Paiva BR, Passos LN, Falqueto A, Malafronte R dos S, Andrade HF de. Single step polymerase chain reaction (PCR) for the diagnosis of the *Leishmania* (*Viannia*) subgenus. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2004;46(6):335-8.
56. León Ramos CM. Evaluación del desempeño analítico del diagnóstico molecular de leishmaniasis cutánea. 19 de octubre de 2017 [citado 24 de junio de 2023]; Disponible en: <https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/60290>
57. Fraga J, Montalvo AM, Van der Auwera G, Maes I, Dujardin JC, Requena JM. Evolution and species discrimination according to the *Leishmania* heat-shock protein 20 gene. *Infect Genet Evol.* agosto de 2013; 18:229-37.
58. Montalvo AM, Fraga J, Rodríguez O, Blanco O, Llanos-Cuentas A, García AL, et al. Detección de *Leishmania* spp. en base al gen que codifica la proteína HSP20. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica.* octubre de 2014;31(4):635-43.
59. Silva Molina JI. Identificación de las especies del género *Leishmania* mediante marcadores moleculares de alta sensibilidad a partir de láminas coloreadas con Giemsa empleando la técnica PCR-High Resolution Melting (HRM). 2018 [citado 24 de junio de 2023]; Disponible en: <http://repositorio.lamolina.edu.pe/handle/20.500.12996/3832>
60. Montalvo AM, Fraga J, Montano I, Monzote L, Auwera GV der, Marín M, et al. Identificación molecular con base en el gen hsp70 de aislamientos clínicos de *Leishmania* spp. en Colombia. *Biomédica.* 2016;36(1):37-44.

61. Rodgers MR, Popper SJ, Wirth DF. Amplification of kinetoplast DNA as a tool in the detection and diagnosis of Leishmania. *Experimental Parasitology*. 1 de octubre de 1990;71(3):267-75.
62. Reale S, Maxia L, Vitale F, Glorioso NS, Caracappa S, Vesco G. Detection of *Leishmania infantum* in Dogs by PCR with Lymph Node Aspirates and Blood. *J Clin Microbiol*. septiembre de 1999;37(9):2931-5.
63. Mouttaki T, Morales-Yuste M, Merino-Espinosa G, Chiheb S, Fellah H, Martin-Sanchez J, et al. Molecular diagnosis of cutaneous leishmaniasis and identification of the causative *Leishmania* species in Morocco by using three PCR-based assays. *Parasit Vectors*. 4 de septiembre de 2014; 7:420.
64. Oliveira DM de, Lonardon MVC, Teodoro U, Silveira TGV. Comparison of different primers for PCR-based diagnosis of cutaneous leishmaniasis. *Braz J Infect Dis*. 2011;15(3):204-10.
65. Chena L, Nara E, Canese A, Oddone R, Russomando G. Aplicación de la PCR para la detección de género y complejos de *Leishmania* en diferentes tipos de muestras biológicas. *Memorias del Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud*. junio de 2013;11(1):45-51.
66. Córdoba Lanús E, Piñero JE, González AC, Valladares B, Lizarralde de Grosso M, Salomón OD. Detection of *Leishmania braziliensis* in human paraffin-embedded tissues from Tucumán, Argentina by polymerase chain reaction. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. abril de 2005; 100:187-92.
67. Vergel C, Walker J, Saravia NG. 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. *Am J Trop Med Hyg*. abril de 2005;72(4):423-9.
68. Romero I, Téllez J, Suárez Y, Cardona M, Figueroa R, Zelazny A, et al. Viability and burden of *Leishmania* in extralesional sites during human dermal leishmaniasis. *PLoS Negl Trop Dis*. 14 de septiembre de 2010;4(9): e819.
69. Lopez M, Inga R, Cangalaya M, Echevarria J, Llanos-Cuentas A, Orrego C, et al. Diagnosis of *Leishmania* using the polymerase chain reaction: a simplified procedure for field work. *Am J Trop Med Hyg*. septiembre de 1993;49(3):348-56.
70. Boggild AK, Valencia BM, Espinosa D, Veland N, Ramos AP, Arevalo J, et al. Detection and Species Identification of *Leishmania* DNA from Filter Paper Lesion Impressions for Patients with American Cutaneous Leishmaniasis. *CLIN INFECT DIS*. enero de 2010;50(1): e1-6.
71. Boggild AK, Valencia BM, Veland N, Pilar Ramos A, Calderon F, Arevalo J, et al. Non-Invasive Cytology Brush PCR Diagnostic Testing in Mucosal Leishmaniasis:

Superior Performance to Conventional Biopsy with Histopathology. PLoS One. 27 de octubre de 2011;6(10): e26395.

72. Velasquez L, Membrive N, Membrive U, Rodrigues G, Reis N, Lonardoni M, et al. PCR in the investigation of canine American tegumentary leishmaniasis in northwestern Paraná State, Brazil. *Cadernos de saúde pública / Ministério da Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Escola Nacional de Saúde Pública*. 1 de abril de 2006; 22:571-8.
73. Vásquez-Trujillo A, Santamaría-Herreño E, González-Reina AE, Buitrago-Álvarez LS, Góngora-Orjuela A, Cabrera-Quintero OL. *Lutzomyia antunesi*, Probable Vector de Leishmaniasis Cutánea en el Área Rural de Villavicencio. *Rev salud pública*. octubre de 2008;10(4):625-32.
74. Jojoa Jojoa SJ. Detección molecular de *Leishmania* spp en lesiones cutáneas del personal del Ejército Nacional de Colombia expuesto en zonas endémicas. 2012 [citado 24 de junio de 2023]; Disponible en: <https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/10892>
75. Marcussi VM, Marcussi LM, Barbosa-Tessmann IP, Lonardoni MVC, Silveira TGV. *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis*: New primers for identification using polymerase chain reaction. *Experimental Parasitology*. 1 de diciembre de 2008;120(4):300-5.
76. Marcussi LM, Skraba CM, Perles TF, Pedroso RB, Lonardoni MVC, Silveira TGV. AVALIAÇÃO DE PRIMERS ESPECÍFICOS PARA IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES DE *Leishmania* (*V.*) *braziliensis*. *Revista de Patologia Tropical/Journal of Tropical Pathology*. 2013;42(1).
77. Arcila MCM, Barbosa JCS. EVALUACIÓN DE TRES PRUEBAS DE PCR PARA LA IDENTIFICACIÓN DE *Leishmania* (*Viannia*) EN DIFERENTES MUESTRAS BIOLÓGICAS.
78. Gabriel JE. Evaluating the specificity of primers employed for PCR-based diagnostics of Leishmaniasis using multiple alignment analysis. *Estudios de Biología*. 2013;35(85).
79. Marin J, Urrea D, Muskus C, Echeverry MC, Mejía AM, Triana O. Curvas de fusión de regiones genómicas específicas: una herramienta prometedora para el diagnóstico y tipificación de las especies causantes de la leishmaniasis cutánea en Colombia. *Biomédica*. 1 de diciembre de 2017;37(4):538-47.
80. Medical Definition of AMASTIGOTE [Internet]. [citado 25 de junio de 2023]. Disponible en: <https://www.merriam-webster.com/medical/amastigote>
81. Garibyan L, Avashia N. Research Techniques Made Simple: Polymerase Chain Reaction (PCR). *J Invest Dermatol*. marzo de 2013;133(3): e6.
82. Sasiain JP. Giemsa stain's 100th year. *Biomédica*. 1 de marzo de 2003;23(1):5-18.

83. McGraw Hill Medical [Internet]. [citado 25 de junio de 2023]. Cultivo de microorganismos. Disponible en: <https://accessmedicina.mhmedical.com/content.aspx?sectionid=248862188&bookid=2955>
84. LEISHMANIASIS [Internet]. [citado 2 de julio de 2023]. Disponible en: <https://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:21ceZ-2Ap58J:https://revistabiomedica.org/index.php/biomedica/article/download/1865/1891/7145&cd=24&hl=es&ct=clnk&gl=pe>
85. Muskus CE, Marín M. Metaciclologénesis: un proceso fundamental en la biología de *Leishmania* [PhD Thesis]. Tesis doctoral no publicada). Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia; 2012.
86. Elsevier. Elsevier Connect. [citado 25 de junio de 2023]. Cadena de infección y métodos de transmisión de microbios. Disponible en: <https://www.elsevier.com/es-es/connect/enfermeria/edu-cadena-de-infeccion-y-metodos-de-transmision-de-microbios>
87. Enfermedades transmitidas por vectores [Internet]. [citado 25 de junio de 2023]. Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/vector-borne-diseases>
88. Rodríguez N. Factores de virulencia en *Leishmania* y su relación con el desarrollo de la leishmaniasis. *Dermatología Venezolana* [Internet]. 2003 [citado 25 de junio de 2023];41(3). Disponible en: <https://revista.svderma.org/index.php/ojs/article/view/284>
89. Calvay-Sánchez KD, Rojas-Palomino NM, Sandoval-Juárez AC, Cisneros-Tarmeño A, Obregón-Cahuaya C, Minaya-Gómez GS. Capacidad infectiva de promastigotes en fase estacionaria de *leishmania (viannia) braziliensis* y *leishmania (viannia) peruviana*, en línea celular dh82. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*. marzo de 2015; 32:33-40.
90. Cardenas FJC, Giannuzzi L, Noia MA, Zaritzky NE. El modelado matemático: una herramienta útil para la industria alimenticia. *Ciencia Veterinaria*. 2001;3(1):22-8.
91. Zampieri RA, Laranjeira-Silva MF, Muxel SM, Lima ACS de, Shaw JJ, Floeter-Winter LM. High Resolution Melting Analysis Targeting hsp70 as a Fast and Efficient Method for the Discrimination of *Leishmania* Species. *PLOS Neglected Tropical Diseases*. 29 de febrero de 2016;10(2): e0004485.
92. Reis LES, Coura-Vital W, Roatt BM, Bouillet LÉM, Ker HG, Fortes de Brito RC, et al. Molecular diagnosis of canine visceral leishmaniasis: A comparative study of three methods using skin and spleen from dogs with natural *Leishmania infantum* infection. *Veterinary Parasitology*. 8 de noviembre de 2013;197(3):498-503.
93. Aransay AM, Scoulica E, Tselentis Y. Detection and Identification of *Leishmania* DNA within Naturally Infected Sand Flies by Seminested PCR on Minicircle Kinetoplastic DNA. *Applied and Environmental Microbiology*. mayo de 2000;66(5):1933-8.

94. McCann SH, Eresh S, Barker DC. Kinetoplast minicircle DNA from *Leishmania (Viannia) lainsoni*. *Parasitology*. abril de 1999;118 (Pt 4):371-4.
95. De Fátima Arruda Pereira E, Thomaz-Soccol V, Lima HC, Thomaz-Soccol A, De Castro EA, Mulinari-Brenner F, et al. Molecular diagnosis of leishmaniosis in the Paraná state of southern Brazil. *Experimental Dermatology*. 2008;17(12):1024-30.
96. de Bruijn MHL, Barker DC. Diagnosis of New World leishmaniasis: Specific detection of species of the *Leishmania braziliensis* complex by amplification of kinetoplast DNA. *Acta Tropica*. 1 de septiembre de 1992;52(1):45-58.
97. Eresh S, McCallum SM, Barker DC. Identification and diagnosis of *Leishmania mexicana* complex isolates by polymerase chain reaction. *Parasitology*. noviembre de 1994;109(4):423-33.
98. Oliveira FS, Pirmez C, Pires MQ, Brazil RP, Pacheco RS. PCR-based diagnosis for detection of *Leishmania* in skin and blood of rodents from an endemic area of cutaneous and visceral leishmaniasis in Brazil. *Veterinary Parasitology*. 15 de mayo de 2005;129(3):219-27.
99. Tiwananthagorn S, Kato H, Yeewa R, Muengpan A, Polseela R, Leelayoova S. Comparison of LAMP and PCR for molecular mass screening of sand flies for *Leishmania martiniquensis* infection. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. febrero de 2017; 112:100-7.
100. Kato H, Uezato H, Katakura K, Calvopina M, Marco JD, Barroso PA, et al. Detection and identification of *Leishmania* species within naturally infected sand flies in the Andean areas of Ecuador by a polymerase chain reaction. diciembre de 2005 [citado 23 de febrero de 2023]; Disponible en: <https://ri.conicet.gov.ar/handle/11336/43443>
101. Kato H, Uezato H, Gomez EA, Terayama Y, Calvopiña M, Iwata H, et al. Establishment of a mass screening method of sand fly vectors for *Leishmania* infection by molecular biological methods. *Am J Trop Med Hyg*. agosto de 2007;77(2):324-9.
102. Mimori T, Sasaki J ichiro, Nakata M, Gomez EA, Uezato H, Nonaka S, et al. Rapid identification of *Leishmania* species from formalin-fixed biopsy samples by polymorphism-specific polymerase chain reaction. *Gene*. 14 de abril de 1998;210(2):179-86.
103. Cavalcanti M de P. Desenvolvimento e avaliação de um sistema baseado em PCR em tempo real para o diagnóstico da infecção por *Leishmania (Leishmania) infantum* em cães [Internet] [Thesis]. 2008 [citado 23 de febrero de 2023]. Disponible en: <https://www.arca.fiocruz.br/handle/iciict/3902>
104. de Paiva Cavalcanti M, Dantas-Torres F, da Cunha Gonçalves de Albuquerque S, Silva de Moraes RC, de Brito MEF, Otranto D, et al. Quantitative real time PCR assays for the detection of *Leishmania (Viannia) braziliensis* in animals and humans. *Mol Cell Probes*. 2013;27(3-4):122-8.

105. Silva JGL da, Silva TM da, Peloso E de F, Machado-Coelho GLL, Mayrink W, Ariosa MCF, et al. Comparison among three polymerase chain reaction assays on detection of DNA from *Leishmania* in biological samples from patients with american cutaneous leishmaniasis. *Rev Soc Bras Med Trop.* abril de 2012; 45:257-9.
106. Aviles H, Belli A, Armijos R, Monroy FP, Harris E. PCR Detection and Identification of *Leishmania* Parasites in Clinical Specimens in Ecuador: A Comparison with Classical Diagnostic Methods. *The Journal of Parasitology.* 1999;85(2):181-7.
107. Weirather JL, Jeronimo SM, Gautam S, Sundar, S, Kang M, Kurtz A, et al. Serial Quantitative PCR Assay for Detection, Species Discrimination, and Quantification of *Leishmania* spp. in Human Samples. *Journal of Clinical Microbiology.* noviembre de 2011;49(11):3892-904.
108. Cardoso MS, Bento GA, de Almeida LV, de Castro JC, Reis-Cunha JL, Barbosa V de A, et al. Detection of multiple circulating *Leishmania* species in *Lutzomyia longipalpis* in the city of Governador Valadares, southeastern Brazil. *PLoS One.* 5 de febrero de 2019;14(2): e0211831.
109. Enrique Perez J, Veland N, Espinosa D, Torres K, Ogusuku E, Llanos-Cuentas A, et al. Isolation and molecular identification of *Leishmania* (*Viannia*) *peruviana* from naturally infected *Lutzomyia peruensis* (Diptera: Psychodidae) in the Peruvian Andes. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* agosto de 2007; 102:655-8.
110. Romero GAS, Guerra MVF, Paes MG, Cupolillo E, Bentin Toaldo C, Macêdo VO, et al. Sensitivity of the polymerase chain reaction for the diagnosis of cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania* (*Viannia*) *guyanensis*. *Acta Tropica.* 22 de junio de 2001;79(3):225-9.
111. Rojas Palomino NM. Identificación de especies de *Leishmania* spp aisladas de pacientes procedentes de áreas endémicas mediante análisis de curvas de disociación de los minicírculos del kADN. Universidad Nacional Mayor de San Marcos [Internet]. 2021 [citado 23 de febrero de 2023]; Disponible en: <https://cybertesis.unmsm.edu.pe/handle/20.500.12672/16735>
112. Passos VM, Lasmar EB, Gontijo CM, Fernandes O, Degraive W. Natural infection of a domestic cat (*Felis domesticus*) with *Leishmania* (*Viannia*) in the metropolitan region of Belo Horizonte, state of Minas Gerais, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* febrero de 1996; 91:19-20.
113. Lemesre JL, Darcy F, Kweider M, Capron A, Santoro F. Requirements of defined cultivation conditions for standard growth of *Leishmania* promastigotes in vitro. *Acta Trop.* junio de 1988;45(2):99-108.
114. Aylas Chujutalli AV, Villacorta Barbarán GO. Estudio químico biodirigido in vitro sobre formas parasitarias de *Leishmania* spp. y *Plasmodium falciparum* de los extractos y fracciones de las especies de *Piper callosum* (guayusa) y *Unonopsis stipitata* (vara caspi). 2011;139-139.

115. Méndez Bejarano CP. Cuantificación de la carga parasitaria en leishmaniasis cutánea por medio de PCR en tiempo real. [citado 5 de noviembre de 2023]; Disponible en: <https://repository.javeriana.edu.co/handle/10554/15452>
116. Galluzzi L, Ceccarelli M, Diotallevi A, Menotta M, Magnani M. Real-time PCR applications for diagnosis of leishmaniasis. *Parasit Vectors*. 2 de mayo de 2018; 11:273.
117. Brewster S, Barker DC. Analysis of minicircle classes in *Leishmania* (*Viannia*) species. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 1 de abril de 2002;96: S55-63.
118. Belli A, Rodriguez B, Aviles H, Harris E. Simplified polymerase chain reaction detection of new world *Leishmania* in clinical specimens of cutaneous leishmaniasis. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 1 de enero de 1998;58(1):102-9.

ANEXOS

ANEXO 1

Ficha de datos para la elaboración de la curva parasitaria de *Leishmania*

N° CULTIVO	N° RÉPLICA	RECUENTO EN CÁMARA DE NEUBAUER			PROMEDIO DE LECTURA	CONCENTRACIÓN PARASITARIA/mL (PROMEDIO DE RÉPLICA x FACTOR DE DILUCIÓN)
		N° PROMASTIGOTES				
		LECTURA 1	LECTURA 2	LECTURA 3		
1	1					
	2					
	3					
2	1					
	2					
	3					
3	1					
	2					
	3					
4	1					
	2					
	3					
5	1					
	2					
	3					
6	1					
	2					
	3					
7	1					
	2					
	3					
8	1					
	2					
	3					
9	1					
	2					
	3					

ANEXO 2

Ficha de registro de concentraciones de ADN de *Leishmania*

N° CULTIVO	CONCENTRACIÓN TOTAL DE PARÁSITO USADA PARA LA EXTRACCIÓN DE ADN	CONCENTRACIÓN DE ADN (<i>Nanodrop</i>)		PROMEDIO DE LECTURAS (ng)
		N° LECTURA	RESULTADO (ng)	
1		1		
		2		
		3		
2		1		
		2		
		3		
3		1		
		2		
		3		
4		1		
		2		
		3		
5		1		
		2		
		3		
6		1		
		2		
		3		
7		1		
		2		
		3		
8		1		
		2		
		3		
9		1		
		2		
		3		

ANEXO 4

Ficha de registro de temperaturas de fusión de los cultivos de *Leishmania*

CULTIVO	CEBADORES:				CEBADORES:				CEBADORES:			
	TAMAÑO DE AMPLICÓN:				TAMAÑO DE AMPLICÓN:				TAMAÑO DE AMPLICÓN:			
	TEMPERATURAS DE FUSIÓN °C				TEMPERATURAS DE FUSIÓN °C				TEMPERATURAS DE FUSIÓN °C			
	RÉPLICA 1	RÉPLICA 2	RÉPLICA 3	RÉPLICA 4	RÉPLICA 1	RÉPLICA 2	RÉPLICA 3	RÉPLICA 4	RÉPLICA 1	RÉPLICA 2	RÉPLICA 3	RÉPLICA 4
1												
2												
3												
4												
5												
6												
7												
8												
9												

ANEXO 5

Ficha de registro de límite de detección de los cebadores dirigidos al minicírculo de kinetoplasto de *Leishmania* seleccionados.

CONCENTRACIÓN DE ADN	CEBADORES:						
	CULTIVO:			LÍMITE DE DETECCIÓN PCR HRM			
	CT			TEMPERATURAS DE FUSIÓN CON PICOS DE FUSIÓN HOMOGÉNEOS			NÚMERO DE PARÁSITOS
	RÉPLICA 1	RÉPLICA 2	RÉPLICA 3	RÉPLICA 1	RÉPLICA 2	RÉPLICA 3	
100 ng							
10 ng							
1 ng							
100 pg							
10 pg							
1 pg							
100 fg							
10 fg							
1 fg							

ANEXO 6

OPERALIZACIÓN DE VARIABLES

VARIABLES DE ESTUDIO	DEFINICIÓN DE VARIABLE	DIMENSIÓN	INDICADOR	CRITERIO DE MEDICIÓN	VALORES	ESCALA DE MEDICIÓN	TÉCNICA	INSTRUMENTO DE MEDICIÓN
PCR en tiempo real y análisis de fusión alta resolución de amplicones.	Método de biología molecular basada en el análisis de las temperaturas de fusión de amplicones para encontrar presencia de polimorfismo.	Separación del 50% de las cadenas simples de ADN.	Fluorescencia	Temperatura	Grados Celsius (°C)	Ordinal	PCR HRM	Termociclador a tiempo real Software de análisis de curvas de fusión.
<i>Leishmania</i>	Protozooario flagelado que causa la leishmaniosis.	Taxonomía	Características propias e inherentes de cada <i>Leishmania</i> .	Género Subgénero Especie	Característica, bioquímicas o moleculares.	Nominal	Pruebas basadas en biología molecular.	Equipos de biología molecular.

ANEXO 7

VALIDACIÓN DE INSTRUMENTO DE INVESTIGACIÓN

Proyecto de Investigación: **PCR en tiempo real y análisis de fusión de alta resolución de amplicones obtenidos de cebadores dirigidos al minicírculo del kinetoplasto para la detección de *Leishmania*. Peru-2023.**

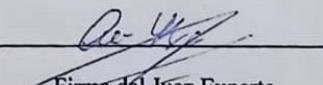
Nombre del egresado(a):

Nombre del Juez Experto: Bla Alina Florencia Huiza Franco

ESCALA DE CALIFICACIÓN

Marque con una X (aspa) en SI o NO en cada criterio según su opinión

Nº	CRITERIOS	SI	NO	OBSERVACIONES
1	El instrumento recoge información que permite dar respuesta al problema de investigación.	✓		
2	El instrumento propuesto responde al (los) objetivos(s) de estudio.	✓		
3	La estructura del instrumento es adecuado.	✓		
4	Los ítems del instrumento responden a la operacionalización de la variable.	✓		
5	La secuencia presentada facilita el desarrollo del instrumento.	✓		
6	Los ítems son claros y entendibles.	✓		
7	El número de ítems es adecuado para su aplicación.	✓		


Firma del Juez Experto
ALINA HUIZA FRANCO
*Profesor Asociado - U.B.
Facultad de Medicina
U.B. San Marcos

ANEXO 7

VALIDACIÓN DE INSTRUMENTO DE INVESTIGACIÓN

Proyecto de Investigación: **PCR en tiempo real y análisis de fusión de alta resolución de amplicones obtenidos de cebadores dirigidos al minicírculo del kinetoplasto para la detección de *Leishmania*. Peru-2023.**

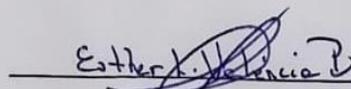
Nombre del egresado(a): Julio Jairzinho Montoya Alvarado

Nombre del Juez Experto: Esther Lilia Valencia Bazar

ESCALA DE CALIFICACIÓN

Marque con una X (aspa) en SI o NO en cada criterio según su opinión

N°	CRITERIOS	SI	NO	OBSERVACIONES
1	El instrumento recoge información que permite dar respuesta al problema de investigación.	X		
2	El instrumento propuesto responde al (los) objetivos(s) de estudio.	X		
3	La estructura del instrumento es adecuado.	X		
4	Los ítems del instrumento responden a la operacionalización de la variable.	X		
5	La secuencia presentada facilita el desarrollo del instrumento.	X		
6	Los ítems son claros y entendibles.	X		
7	El número de ítems es adecuado para su aplicación.	X		



Firma de: Esther Lilia Valencia Bazar
Tecnólogo Médico
CTMP. 10185

ANEXO 9
CONSTANCIA DE REALIZACIÓN DE TESIS



**Centro de Investigaciones Tecnológicas,
Biomédicas y Medioambientales**

Lima, 03 de noviembre de 2023

CONSTANCIA

El que suscribe, Director Ejecutivo del Centro de Investigaciones Tecnológicas, Biomédicas y Medioambientales – CITBM, certifica que el:

Bach. Julio Jairzinho, Montoya Alvarado

del Área de Laboratorio Clínico y Anatomía Patológica de la Escuela Profesional de Tecnología Médica, ha realizado su tesis de Licenciatura titulada "PCR EN TIEMPO REAL Y ANÁLISIS DE FUSIÓN DE ALTA RESOLUCIÓN DE AMPLICONES OBTENIDOS DE CEBADORES DIRIGIDOS AL MINICIRCULO DEL KINETOPLASTO PARA LA DETECCIÓN DE *Leishmania*" en el Laboratorio de Epidemiología Molecular y Genética– LEMYG de la Sección Científica de Epidemiología del Instituto de Medicina Tropical "Daniel A. Carrión" de la Facultad de Medicina de la UNMSM - CITBM, bajo la asesoría y coordinación del Prof. Carlos Raúl Sevilla Andrade durante el periodo de octubre del 2020 a mayo del 2022.

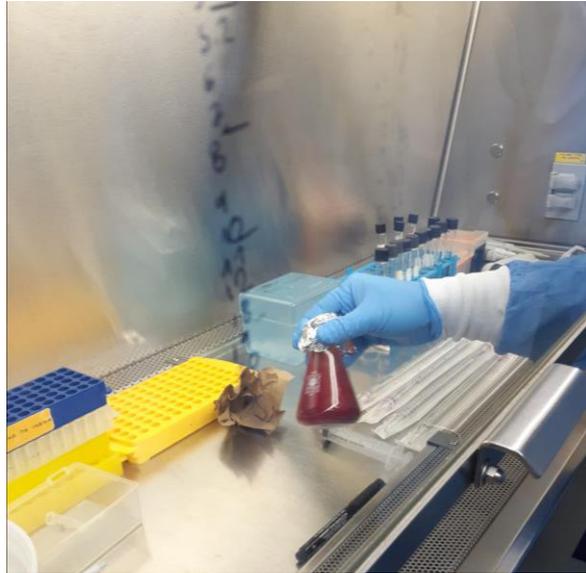
Se expide la presente constancia a solicitud del (a) interesado (a), para los fines que estime conveniente, en Lima a los tres días del mes de noviembre del año Dos Mil Veintitrés.

Date: 2023.11.05
09:58:09 -05'00'

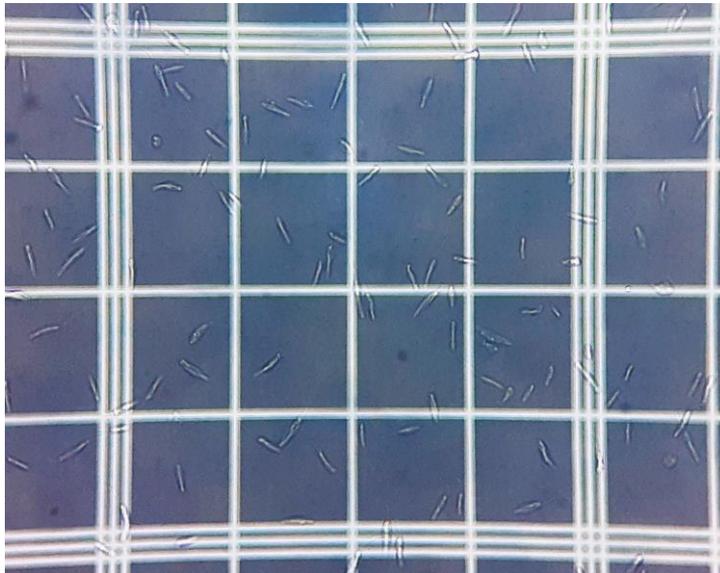
.....
Dr. Jorge O. Alarcón Villaverde
Director Ejecutivo
CITBM



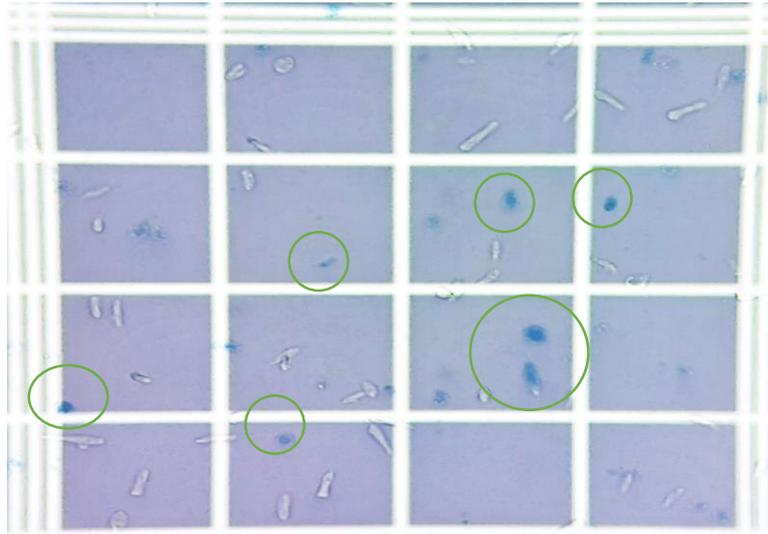
ANEXO 10
FOTOGRAFÍAS DE LA EJECUCIÓN DEL PROYECTO DE TESIS



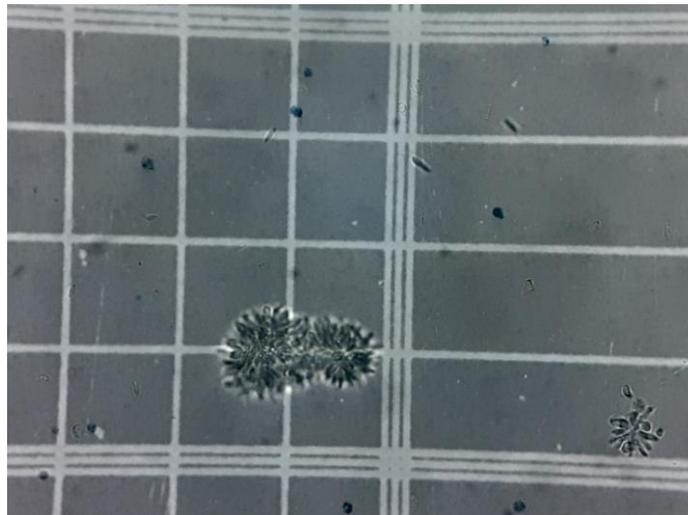
Fotografía N° 6. Preparación del medio bifásico NNN modificado para la reactivación de los cultivos almacenados en el IMT/DAC y el CITBM.



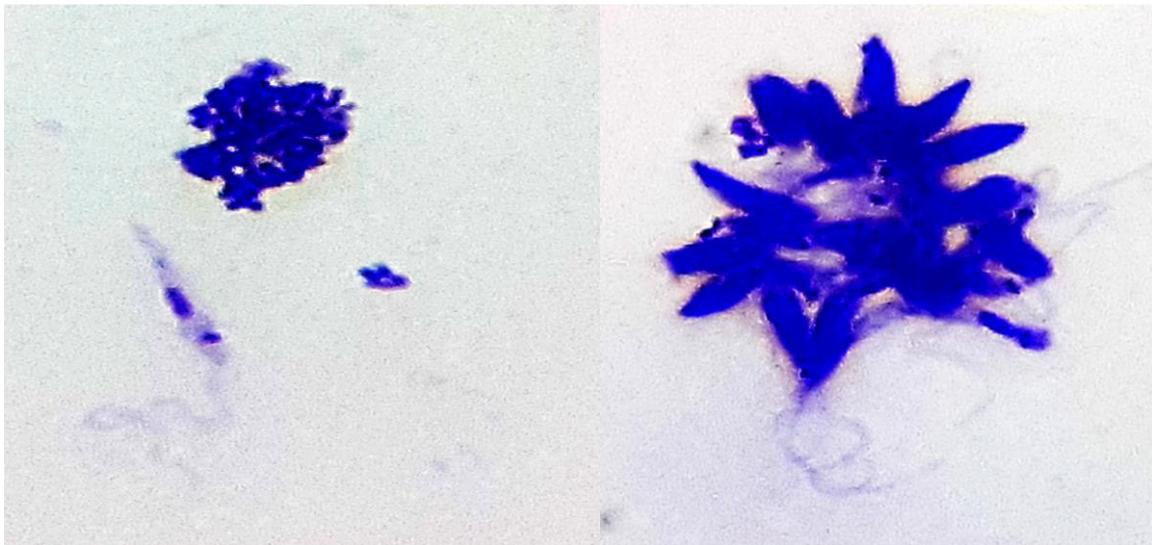
Fotografía N° 7. Cámara de Neubauer con promastigotes de *Leishmania* viables para el recuento parasitario. Los promastigotes no adquieren el color del azul de toluidina al 1 % indicando su viabilidad.



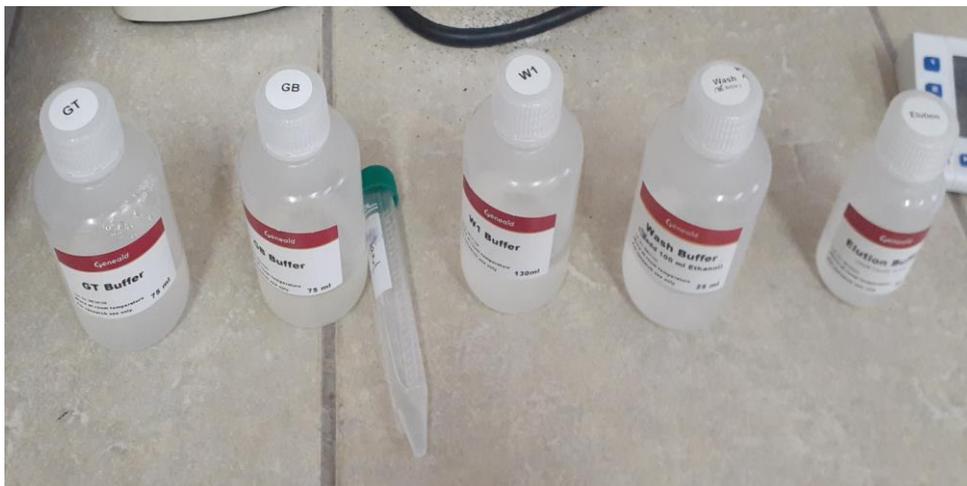
Fotografía N° 8. Cámara de Neubauer con promastigotes de *Leishmania* no viables para el recuento parasitario. Los promastigotes que adquieren el color del azul de toluidina al 1 % no son viables o están muertos (círculos verdes).



Fotografía N° 9. Cámara de Neubauer con presencia de rosetas de *Leishmania*. Las rosetas de *Leishmania* son estructuras muy difíciles de romper para realizar el recuento parasitario. Se usó varias veces el *vortex* para evitar su presencia al momento del recuento. 400X.



Fotografía N° 10. Promastigotes de *Leishmania* (izquierda) y roseta (derecha) coloreados con Giemsa.



Fotografía N° 11. Batería para la extracción de ADN genómico de *Leishmania* (Presto™ Mini gDNA Bacteria Kit).



Fotografía N° 12. Proceso de pre-PCR; preparación del MASTER MIX para la PCR HRM.



Fotografía N° 13. Colocación de los criotubos en el termociclador MiniOpticon *Real Time* PCR System para la PCR HRM.

ANEXO 11

MEDIOS DE CULTIVO PARA *Leishmania*

MEDIO BIFÁSICO NNN modificado

Obtención de la sangre humana desfibrinada:

- Colectar 20 mL de sangre humana con jeringa, con la asepsia pertinente.
- Verter la sangre inmediatamente a un matraz con perlas de vidrio en condiciones estériles y mover para desfibrinar por 10 min; conservar a 4 °C hasta su uso.

Preparación del Agar Base:

- Agregar 4.4 g Agar Columbia para 100 mL.
- Disolver en agua destilada, autoclavar a 121 °C a 1 atm de presión.

Preparación de solución salina:

- Pesar 0,85g de ClNa y adicionar en 100 mL de agua destilada.
- Autoclavar a 121 °C a 1 atm de presión.
- Adicionar 40 µL de Amikacina para 100ml.

Preparación del medio agar sangre:

- Mezclar Agar base con los 20 mL de sangre desfibrinada.
- Luego, repartir 5 mL de la mezcla en tubos tapa rosca estériles y colocarlos en un plano inclinado.
- Guardar todos los tubos con el medio a 37 °C para control de esterilidad por 24 horas.
- Al momento de usar adicionar 1 mL de solución salina.

MEDIO SCHNEIDER

La preparación se realizará según el inserto del fabricante SIGMA-ALDRICH Schneider *Insect Medium* código S9895.

ANEXO 12

PROCEDIMIENTO DE RECUESTO PARASITARIO DE *Leishmania*

El recuento de promastigotes de *Leishmania* se realiza en cámara de Neubauer con colorante supra vital Azul de toluidina al 1 %.

INMOVILIZACIÓN DE LA MUESTRA

Inmovilización de los promastigotes con 0.2 % de formol.

PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

- Muestra sin diluir.

Inmovilizar con 2 μ L de formol al 0.2 % con 20 μ L de cultivo, luego agregar 1 μ L de azul de toluidina.

- Muestra diluida 1 al 5.

Inmovilizar con 1 μ L de formol al 0.2 % con 10 μ L de cultivo, luego agregar 20 μ L de azul de toluidina más 19 μ L de solución salina.

- Muestra diluida 1 en 10.

Inmovilizar con 1 μ L de formol al 0.2 % con 10 μ L de cultivo, luego agregar 40 μ L de azul de toluidina más 49 μ L de solución salina.

FACTORES PARA EL RECUESTO DE CAMARA DE NUEBAUER

Cuando se empleó el área entera de la cámara se usó el factor 1111.

Cuando se empleó los 4 cuadrantes de los leucocitos se usó el factor 2500.

Cuando se empleó un solo cuadrante de los leucocitos se usó el factor 10 000.

Cuando se empleó los 5 cuadrantes de lo hematíes se usó el factor 50 000.

Estos factores se multiplicaron dependiendo de las diluciones usadas, según la concentración de parásitos presente en los cultivos evaluados para la curva parasitaria.

ANEXO 13

PROCEDIMIENTO DE EXTRACCION DE ADN DE *Leishmania*

Se extraerá ADN utilizando el kit comercial Presto Mini gDNA Bacteria kit GENE AID.

1. Preparación de la muestra

Con la concentración parasitaria total del volumen de cultivo de Schneider obtenido, se centrifugó en tubo Eppendorf durante 1 minuto a 16 000 gravedades y luego se descartó el sobrenadante. Al sedimento se agregó 180 µL de tampón GT y se resuspendió en vortex. Luego se agrega 20 µL de proteinasa K y se incuba a 60°C durante al menos 10 minutos e invirtiendo cada 3 minutos los tubos.

2. Lisis

Se añade 200 µL de tampón GB a la muestra incubada y se mezcla mediante vortex durante 10 segundos. Luego se incuba a 70°C durante 10 minutos hasta que el lisado sea transparente, invirtiendo cada 3 min. Precalear a 70°C el tampón de elución.

3. Unión de ADN

Añadir 200 µl de etanol absoluto al lisado y mezclar vigorosamente. Romper algún precipitado con la pipeta si existiera. Colocar la columna GD en un tubo de recogida de 2 ml y transferir la mezcla para centrifugar a 16.000 gravedades durante 2 minutos. Desechar el tubo de recolección de 2 ml que contiene el flujo continuo y luego colocar la columna GD en un nuevo tubo de recolección de 2 mL.

4. Lavar

Agregar a 400 µL de tampón W1 a la columna GD. Centrifugar a 16 000 gravedades durante 30 segundos y luego desechar el flujo. Colocar la columna GD nuevamente en el tubo de recolección de 2 ml y agregar 600 µL de tampón de lavado a la columna GD. Centrifugar a 16 000 gravedades durante 30 segundos y luego desechar el flujo. Colocar la columna GD en el tubo de recolección de 2 ml y centrifugar durante 3 minutos a 16 000 gravedades para secar la matriz de la columna.

5. Elución

Añadir 100 µl de tampón de elución precalentado en el centro de la matriz de la columna. Dejar reposar durante al menos 3 minutos para que se absorban por completo y centrifugar a 16.000 gravedades durante 30 segundos para eluir el ADN purificado. Usar menor cantidad de tampón de elución si se necesita concentrar más el ADN.

Fuente: Procedimiento obtenido del inserto del fabricante.

ANEXO 14

PROTOCOLO PARA LAS PCR HRM

Protocolo para la PCR a tiempo real

Materiales:

- PowerUp™ SYBR™ Green *Master Mix* (2X).
- Cebadores: PASSOS F- PASSOS R, MP1L-MP3H, PASSOS F-MP3H.
- Agua PCR ultra pura.
- ADN a concentración de 100 ng.

Tabla 16. Condiciones de *q*PCR- HRM para la amplificación de los cebadores empleados.

		CEBADORES		
		PASSOS F- PASSOS R	MP1L- MP3H	PASSOS F- MP3H
CONCENTRACIÓN Green Master Mix (2X)		10 µL (1X)	10 µL (1X)	10 µL (1X)
CONCENTRACIÓN DE LOS CEBADORES		1.2 µL (0.6)	2 µL (1)	2 µL (1)
AGUA ULTRA PURA		7.6 µL	6 µL	6 µL
CONCENTRACIÓN DE ADN 100 ng		2 µL	2 µL	2 µL
VOLUMEN FINAL		20 µL	20 µL	20 µL
DENATURACIÓN INICIAL		TEMPERATURA	95°C	95°C
		TIEMPO	5 min	5 min
35 CICLOS	DENATURACIÓN	TEMPERATURA	95°C	95°C
		TIEMPO	30 seg	30 seg
	ANILLAMIENTO	TEMPERATURA	65°C	65°C
		TIEMPO	1 min	1 min
	EXTENSIÓN	TEMPERATURA	72°C	72°C
		TIEMPO	1 min	1 min
EXTENSIÓN FINAL		TEMPERATURA	72°C	72°C
		TIEMPO	5 min	5 min
CURVA DE FUSIÓN		Gradiente de temperatura de 60 °C a 95 °C Incremento de temperatura con una rampa de 0.1 °C cada 20 segundos.		

ANEXO 15

ELECTROFORESIS

- Realizar la electroforesis en gel de agarosa al 3 % utilizando buffer TAE 1X a 65 V por 60 a 70 min para separar los productos de la PCR según su peso molecular.
- Colocar 60 mL de agarosa a 45 °C y luego colocar el peine para generar pocillos para cargar los productos amplificados.
- Mezclar 5-8 μ L de productos amplificados con 1 μ L de buffer de muestra y cargar en cada pocillo.