

UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN CRISTÓBAL DE HUAMANGA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA



Comparación de la eficiencia de los marcadores moleculares empleados en la identificación de *Leishmania* spp mediante análisis de las curvas de disociación, a partir de muestras de pacientes derivados al Instituto Nacional de Salud, 2021.

TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE BIÓLOGA, EN LA ESPECIALIDAD DE MICROBIOLOGÍA

PRESENTADO POR:

Bach. MALDONADO ARONI, Mayra Marisol

ASESOR:

Dr. José Alarcón Guerrero

AYACUCHO – PERÚ

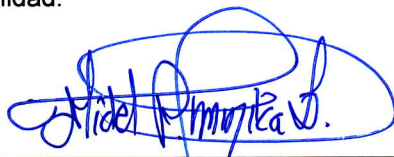
2022

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS
Bach. Mayra Marisol MALDONADO ARONI
R.D. N° 192-2022-UNSCH-FCB-D

En la ciudad de Ayacucho, siendo las cuatro de la tarde del veintitrés de setiembre del año dos mil veintidós; se reunieron los miembros del Jurado Evaluador en el Auditorio de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, presidido por el Dr. Fidel RODOLFO MUJICA LENGUA encargado con memorando N° 147-2022-UNSCH-FCB, quien a su vez es miembro jurado; Dr. Gilmar PEÑA ROJAS (Miembro-Jurado); Dr. José ALARCON GUERRERO (Miembro-Asesor), Mg. Jime Jack RIVERA VILLAR (Miembro-4to Jurado), actuando como secretaria docente la Dra. Nilda Aurea APAYCO ESPINOZA; para presenciar la sustentación de tesis titulada: **"Comparación de la eficiencia de los marcadores moleculares empleados en la identificación de *Leishmania* spp mediante análisis de las curvas de disociación, a partir de muestras de pacientes derivados al Instituto Nacional de Salud, 2021"**; presentado por la Bach. **Mayra Marisol MALDONADO ARONI**; el presidente luego de verificar la documentación presentada, indico a la secretaria docente dar lectura a la documentación generada que refrenda el presente acto académico, luego de ello dispuso el inicio al acto de sustentación, indicando a la sustentante que dispone de cuarenta y cinco minutos para exponer su trabajo de investigación tal como establece el Reglamento de Grados y Títulos de la Escuela Profesional de Biología. Concluida la exposición, el Presidente invito a cada uno de los Miembros del Jurado, a participar con sus observaciones, sugerencia y preguntas a la sustentante. Culminada esta etapa, el presidente invito a la sustentante y al público asistente a abandonar momentáneamente el Auditorio para que los miembros del jurado evaluador puedan realizar las deliberaciones y calificaciones, cuyos resultados son los que se consigan a continuación:

Miembros del jurado evaluador	Exposición	Respuesta a preguntas	Promedio
Dr. Fidel Rodolfo MUJICA LENGUA	18	18	18
Dr. Gilmar PEÑA ROJAS	18	17	18
Mg. Jime Jack RIVERA VILLAR	18	18	18
		PROMEDIO	18

La sustentante alcanzo el promedio de 18 (dieciocho) aprobado con mención honrosa. Acto seguido, el presidente autorizo en ingreso de la sustentante y el público al Auditorio dando a conocer los resultados, e indicando que de este modo se da por finalizado el presente acto académico, siendo las 6:45 p.m.; firmando al pie del presente en señal de conformidad.



Dr. Fidel Rodolfo MUJICA LENGUA
Presidente (e) Miembro – Jurado



Dr. Gilmar PEÑA ROJAS
Miembro – Jurado



Dr. José ALARCON GUERRERO
Miembro – Asesor



Mg. Jime Jack RIVERA VILLAR
Miembro – 4to jurado



Mg. Nilda Aurea APAYCO ESPINOZA
Secretaria – Docente



FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA

DECANATURA

CONSTANCIA DE ORIGINALIDAD DE TRABAJO DE TESIS N° 027-
2022-FCB-D

Yo, SAÚL ALONSO CHUCHÓN MARTÍNEZ, Decano de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional De San Cristóbal De Huamanga; autoridad encargada de verificar la tesis titulada: **“Comparación de la eficiencia de los marcadores moleculares empleados en la identificación de *Leishmania* spp mediante análisis de las curvas de disociación, a partir de muestras de pacientes derivados al Instituto Nacional de Salud, 2021”**, presentado por la Bach. MAYRA MARISOL MALDONADO ARONI; he constatado por medio del uso de la herramienta TURNITIN, procesado CON DEPÓSITO, una similitud de 16%, grado de coincidencia, menor a lo que determina la ausencia de plagio definido por el Reglamento de Originalidad de Trabajos de Investigación de la UNSCH, aprobado con Resolución del Consejo Universitario N° 039-2021-UNSCH-C.

En tal sentido, la tesis cumple con las normas para el uso de citas y referencias establecidas por la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga. Se acompaña el INFORME FINAL DE TURNITIN correspondiente.

Ayacucho, 12 de diciembre de 2022.



UNIVERSIDAD NACIONAL DE
SAN CRISTÓBAL DE HUAMANGA
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS


Dr. Saúl Alonso Chuchón Martínez
DECANO

Comparación de la eficiencia de los marcadores moleculares empleados en la identificación de *Leishmania* spp mediante análisis de las curvas de disociación, a partir de muestras de pacientes derivados al Instituto Nacional de Salud, 2021.

por Mayra Marisol Maldonado Aroni

Fecha de entrega: 13-dic-2022 06:01p.m. (UTC-0500)

Identificador de la entrega: 1980572821

Nombre del archivo: 1A_Maldonado_Aroni_Mayra_Marisol_Pregrado_2022_TURNITIN.docx (4.72M)

Total de palabras: 11626

Total de caracteres: 64154

Comparación de la eficiencia de los marcadores moleculares empleados en la identificación de Leishmania spp mediante análisis de las curvas de disociación, a partir de muestras de pacientes derivados al instituto Nacional de Salud, 2021.

INFORME DE ORIGINALIDAD

16%

INDICE DE SIMILITUD

16%

FUENTES DE INTERNET

3%

PUBLICACIONES

2%

TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

FUENTES PRIMARIAS

1	hdl.handle.net Fuente de Internet	6%
2	dspace.unl.edu.ec Fuente de Internet	3%
3	repositorio.lamolina.edu.pe Fuente de Internet	1%
4	scielosp.org Fuente de Internet	1%
5	www.dspace.uce.edu.ec Fuente de Internet	1%
6	www.scielo.org.pe Fuente de Internet	1%
7	cybertesis.urp.edu.pe Fuente de Internet	1%
8	www.elsevier.es Fuente de Internet	1%

9	Submitted to UNIV DE LAS AMERICAS Trabajo del estudiante	1 %
10	en.wikipedia.org Fuente de Internet	1 %
11	Jonathan Berman. "Recent developments in Leishmaniasis: Epidemiology, diagnosis, and treatment", Current Infectious Disease Reports, 2005 Publicación	<1 %
12	cybertesis.unmsm.edu.pe Fuente de Internet	<1 %
13	ddd.uab.cat Fuente de Internet	<1 %
14	Submitted to Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga Trabajo del estudiante	<1 %
15	repositorio.unan.edu.ni Fuente de Internet	<1 %

Excluir citas

Activo

Excluir coincidencias < 30 words

Excluir bibliografía

Activo

A mi madre Yolita por su apoyo incondicional y estar conmigo desde siempre, ayudándome a cumplir mis sueños.

A mis tíos José Carlos y Ruth que cumplieron el rol de padres y buenos consejeros de vida.

A mi hermana Camila que es el motor de mis días y mi orgullo.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, mi *Alma Mater*.

A la Facultad de Ciencias Biológicas y cada uno de los docentes, por sus enseñanzas y orientaciones para ser buenos profesionales.

Al Instituto Nacional de Salud por abrirme las puertas y dejar que se ejecute y culmine el proyecto, al Laboratorio de Referencia Nacional de Leishmaniasis a la Blga. Mg. Aide Sandoval Juarez por el apoyo brindado.

Al Blgo. Mg. Nyshon Rojas Palomino, quien me brindó incondicionalmente su asesoramiento, paciencia, dedicación y motivación para la ejecución, elaboración culminación del presente trabajo de tesis y empeño para hacer posible la redacción de este informe.

A mi asesor interno, Mg. José Alarcón Guerrero, docente de Área Académica de Microbiología de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga por su constante apoyo en la realización de este trabajo.

A todas las amistades que me brindaron su, disponibilidad y apoyo desinteresado en todo el proceso de realización del presente trabajo.

Al proyecto FOCAM titulado "Identificación molecular de especies de *Leishmania*"

ÍNDICE GENERAL

	Pág.
DEDICATORIA	iii
AGRADECIMIENTO	v
ÍNDICE GENERAL	vii
ÍNDICE DE TABLAS	ix
ÍNDICE DE FIGURAS	xi
ÍNDICE DE ANEXOS	xiii
RESUMEN	xv
I. INTRODUCCIÓN	1
II. MARCO TEÓRICO	3
2.1. Antecedentes	3
2.2. Marco conceptual	6
2.2.1. Enfermedades metaxénicas	6
2.2.2. <i>Leishmaniasis</i>	6
2.2.3. Métodos de diagnóstico de laboratorio	11
2.2.4. Métodos para la identificación de <i>Leishmania</i>	12
2.2.5. Biomarcadores	15
2.2.6. Marcadores nucleares	15
2.2.7. Marcadores mitocondriales	15
III. MATERIALES Y METODOS	17
3.1. Ubicación	17
3.2. Población y muestra	17
3.3. Metodología	17
3.3.1. Extracción	17
3.3.2. Cuantificación	19
3.3.3. Estandarización de PCR en tiempo real dirigido a Hsp20 y RNAsaP	20
3.4. Detección de control endógeno	21
3.4.1. PCR en tiempo real dirigido a Hsp70, AAP3-Amp1 y Kadn	21
3.4.2. Límite de detección y eficiencia de la amplificación de la PCR en tiempo real	24
3.4.3. Identificación de las especies de <i>Leishmania</i>	24
3.5. Análisis estadístico	26
IV. RESULTADOS	27
V. DISCUSIÓN	53

VI.	CONCLUSIONES	59
VII.	RECOMENDACIONES	61
VIII.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63
	ANEXOS	69

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Clasificación taxonómica de <i>Leishmania</i> .	7
Tabla 2. Cepas referenciales OMS de <i>Leishmania</i> .	18
Tabla 3. Criterio de selección de muestras referido al valor de Ct del marcador Hsp20 y RNasa P.	20
Tabla 4. Descripción de los componentes de la reacción del marcador Hsp20.	21
Tabla 5. Condiciones de Amplificación del Marcador Hsp20.	21
Tabla 6. Descripción de los componentes de la reacción de PCR del RNasa P.	21
Tabla 7. Condiciones de Amplificación del RNasaP.	21
Tabla 8. Descripción de los componentes de la reacción del marcador Hsp70.	22
Tabla 9. Condiciones de amplificación y HRM del marcador Hsp70.	22
Tabla 10. Descripción de los componentes de la reacción del marcador AAP3-Amp.	22
Tabla 11. Condiciones de amplificación y HRM del marcador AAP3- Amp1.	23
Tabla 12. Descripción de los componentes de la reacción del marcador kADN.	23
Tabla 13. Condiciones de amplificación y HRM del marcador kADN.	23
Tabla 14. Descripción de los componentes de la reacción de PCR del Hsp70.	25
Tabla 15. Condiciones de Amplificación de PCR RFLP Hsp70.	25
Tabla 16. Frecuencia del RNase P mediante el CT mayor o menor a 36.	29
Tabla 17. Estandarización del marcador Hsp20 PCR tiempo real.	29
Tabla 18. Especies del género <i>Leishmania</i> identificadas con el marcador kADN.	34
Tabla 19. Especies del Género <i>Leishmania</i> identificadas con el marcador AAP3- Amp1.	38
Tabla 20. Especies del género <i>Leishmania</i> identificadas con el marcador Hsp70.	42
Tabla 21. Especies identificadas mediante la prueba de referencia PCR RFLP-Hsp70.	45
Tabla 22. Gold estándar PCR RFLP frente al marcador KDNA con 70 muestras de estudio.	49

Tabla 23. Gold standar RFLP PCR frente al marcador AAP3-Amp1 con 70 muestras de estudio.	49
Tabla 24. RFLP PCR Gold Standar frente al marcador Hsp70 con 70 muestras de estudio.	49
Tabla 25. Índice de kappa de los marcadores empleados en la PCR (HRM) considerando el PCR RFLP como método de referencia.	49
Tabla 26. Índice de kappa en la identificación de <i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i> empleando PCR (HRM).	51
Tabla 27. Índice de kappa en la identificación de <i>Leishmania (Viannia) guyanensis</i> empleando PCR (HRM).	51
Tabla 28. Índice de kappa en la identificación de <i>Leishmania (Viannia) peruviana</i> empleando PCR (HRM).	51
Tabla 29. Sensibilidad y Especificidad de los marcadores kADN, AAP3-Amp1, Hsp70.	51
Tabla 30. Sensibilidad, especificidad y curvas ROC a un Intervalo de confianza del 95% de los marcadores KADN, AAP3-Amp1, Hsp70 en la identificación de las especies <i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i> , <i>Leishmania(Viannia) guyanensis</i> y <i>Leishmania (Viannia) peruviana</i> .	52

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Eficiencia del PCR tiempo real Hsp20 para la detección de <i>Leishmania</i> .	30
Figura 2. Eficiencia del PCR tiempo real Hsp20 de cepas de controles con diferentes diluciones.	31
Figura 3. Muestras analizadas con el marcador Hsp20 para la detección de <i>Leishmania</i> .	32
Figura 4. Eficiencia del PCR HRM marcador kADN, con diferentes diluciones.	33
Figura 5. PCR tiempo real HRM de muestras de ADN genómico frente al marcador KADN grupo I.	35
Figura 6. PCR tiempo real HRM de muestras de ADN genómico frente al marcador kADN grupo II.	36
Figura 7. Eficiencia del PCR HRM con el marcador AAP3-Amp1, con diferentes diluciones.	37
Figura 8. PCR tiempo real HRM de muestras de ADN genómico frente al marcador AAP3- Amp1 grupo I.	39
Figura 9. PCR tiempo real HRM de muestras de ADN genómico frente al marcador AAP3- Amp1 grupo II.	40
Figura 10. Eficiencia del PCR HRM marcador Hsp70, con diferentes diluciones.	41
Figura 11. PCR tiempo real HRM de muestras de ADN genómico frente al marcador Hsp70 grupo I.	43
Figura 12. PCR tiempo real HRM de muestras de ADN genómico frente al marcador Hsp70 grupo II.	44
Figura 13. PCR RFLP del fragmento del gen Hsp70 para el diagnóstico de <i>Leishmania</i> grupo I.	6
Figura 14. PCR-RFLP patrones de amplificación posterior a la digestión con la enzima HaeIII Grupo I.	47
Figura 15. PCR-RFLP patrones de amplificación posterior a la digestión con la enzima RsaI grupo I.	48
Figura 16. Consolidado del índice de kappa de especies frente a marcador/ Gold Standar PCR RFLP.	50

ÍNDICE DE ANEXOS

	Pág.
Anexo 1. Numero de Muestras de Lancetas de pacientes derivados al INS del 2010 hasta el 2019.	71
Anexo 2. Año de ingreso de muestras de lancetas de pacientes derivados del INS del 2010 hasta el 2019.	72
Anexo 3. Cuantificación de 129 muestras de ADN para la determinación de concentración y pureza del ADN Comparación de la eficiencia de marcadores moleculares kADN, Hsp70 y AAP3-Amp1, en la identificación de <i>Leishmania spp.</i>	73
Anexo 4. Categoría de ADN cuantificado por espectrofometría.	74
Anexo 5. ADN genómico purificados y no purificados de muestras de ADN cuantificados.	75
Anexo 6. Comparación de muestras de ADN no purificado y ADN purificados.	76
Anexo 7. Análisis de identificación PCR tiempo real HRM con el marcador kADN grupo I.	77
Anexo 8. Análisis de identificación PCR tiempo real HRM con el marcador kADN grupo II.	78
Anexo 9. Análisis de identificación PCR tiempo real HRM con el marcador AAP3- Amp1 grupo I.	79
Anexo 10. Análisis de identificación PCR tiempo real HRM con el marcador AAP3- Amp1 grupo II.	80
Anexo 11. Análisis de identificación PCR tiempo real HRM con el marcador Hsp70 grupo I.	81
Anexo 12. Análisis de identificación PCR tiempo real HRM con el marcador Hsp70 grupo II.	82
Anexo 13. Autorización del uso del material Biológico para la investigación en el centro Nacional de Salud Pública	83
Anexo 14. Criviales y criobox con ADN genómico extraídos de lancetas.	84
Anexo 15. Proceso de preparación del Master mix para PCR tiempo real.	85
Anexo 16. Carga de los tubos al termociclador y programación para su amplificación en PCR tiempo real.	86
Anexo 17. Lectura de los resultados de amplificación de PCR tiempo real HRM.	87
Anexo 18. Características de la microcentrífuga.	88
Anexo 19. Matriz de consistencia.	89

RESUMEN

El presente trabajo de investigación tuvo como objetivo principal comparar la eficiencia de marcadores moleculares dirigidos a la región conservada del kADN Hsp70 y AAP3-Amp1, en la identificación de *Leishmania spp* mediante análisis de las curvas de disociación, a partir de muestras de pacientes derivados al Instituto Nacional de Salud, 2021. La metodología, se enmarca en la comparación de la eficiencia de los marcadores moleculares ampliamente empleados en la identificación molecular de las diferentes especies de *Leishmania* mediante PCR (HRM) con un Gold standar RFLP para 104 muestras de ADN genómico de lancetas procedentes de pacientes del INS de los años 2010-2019 lo cual nos permita desarrollar una metodología más eficiente y reproducible en un tiempo más corto. Al utilizar los tres marcadores mediante HRM se logró identificar especies de *Leishmania L. braziliensis*, *L. guyanensis*, *L. peruviana*, *L. amazonensis*, *L. panamensis*, *L. lainsoni*. El análisis de datos se procesó con el paquete estadístico Stata 17 el coeficiente kappa y el IC 95% entre la especie *Leishmania braziliensis* y kADN/RFLP mostraron concordancia “casi perfecto” $K= 1.00$. Mediante PCR HRM se identificó y diferenció estos tres marcadores para identificar distintas especies causantes de leishmaniasis. La facilidad de almacenamiento y transporte de muestras de raspado en lancetas desde los lugares más remotos del país resulta ser muy conveniente para desarrollar la técnica posterior, mediante PCR HRM y lograr la identificación de especies de *Leishmania* presentes el Perú.

Palabras clave: *Leishmania*, PCR tiempo real, HRM, marcadores moleculares, kADN, AAP3, Hsp70

I. INTRODUCCIÓN

La leishmaniasis es un problema importante de salud pública a nivel mundial, según la Organización Mundial de la Salud, esta enfermedad es endémica en 98 países, y forma parte de las diez enfermedades tropicales desatendidas con más de 12 millones de personas infectadas Marin et al. (2017). En América, anualmente se reportan casos nuevos de leishmaniasis tanto de la forma cutánea y mucocutánea; es transmitida por la picadura de flebótomos hembras de la familia *Lutzomyia* infectadas.

De acuerdo a la especie de *Leishmania* involucrada en la infección y a los factores intrínsecos del hospedero como la genética, sistema inmune, entre otros, la infección puede presentar diferentes formas como la leishmaniasis cutánea, que afecta la piel, generalmente en el sitio de picazón; leishmaniasis mucosa, que daña a nivel de las mucosas nasales, oral, entre otros y la forma letal leishmaniasis visceral, que daña órganos internos; hasta la fecha esta forma clínica no ha sido reportada en nuestro país. En Perú, se presenta una diversidad de especies del género *Leishmania* siendo las principales *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *Leishmania (V.) peruviana*, *Leishmania (V.) guyanensis*, *Leishmania (V.) lainsoni*, *Leishmania (Leishmania) amazonensis* y *Leishmania (V.) shawi* (Rojas, 2021).

Por otro lado, en cuanto a los métodos empleados en la identificación de las especies de *Leishmania*, los métodos de referencia son el PCR-RFLP del gen Hsp70 Fraga et al. (2012), la Electroforesis Multilocus Enzimática (MLEE) y la técnica de Tipificación por Secuenciamiento de Multilocus (MLST), metodologías que requieren de equipamiento complejo e infraestructura adecuada.

En los últimos años, gracias al desarrollo de investigaciones orientadas a mejorar diferentes aspectos de los métodos moleculares y ha permitido alcanzar métodos más simples y efectivos Silva (2018), como es el caso de PCR-High Resolution Melting, el cual permite, dependiendo del marcador empleado, la

identificación del patógeno infectante de manera rápida y eficiente no sólo a nivel de género, sino también a nivel de especie Hernández et al. (2014); sin embargo, debido a la variedad de marcadores moleculares descritos para esta finalidad, es necesario el desarrollo en paralelo de estudios que permitan comparar su rendimiento.

Por lo que, el presente estudio se plantea como objetivo comparar la eficiencia de marcadores moleculares en la identificación de *Leishmania spp* mediante análisis de las curvas de disociación (HRM), a partir de muestras de pacientes derivados al Instituto Nacional de Salud, durante el año 2021.

Objetivo general

Comparar la eficiencia de marcadores moleculares dirigidos a la región conservada del kADN Hsp70 y AAP3-Amp1, en la identificación de *Leishmania spp* mediante análisis de las curvas de disociación (HRM), a partir de muestras de pacientes derivados al Instituto Nacional de Salud, 2021

Objetivo específico

1. Determinar la eficiencia de marcadores moleculares dirigidos a la región conservada del kADN, Hsp70 y AAP3-Amp1, en la identificación de *Leishmania spp*
2. Determinar el marcador molecular funcional en la identificación de las especies de *Leishmania* empleando análisis de las curvas de disociación.

II. MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes

En los últimos años, el avance de la tecnología ha permitido el desarrollo de nuevas metodologías como PCR (HRM), (análisis de las curvas de disociación, por sus siglas en inglés), no sólo para la detección, sino también orientado a la identificación de la especie infectante (Li et al., 2014).

Estudios desarrollados en *Leishmania* como el realizado por Derghal et al. (2022), quienes empleando el método PCR (HRM) lograron diferenciar hasta tres especies de *Leishmania* circulantes en Túnez, concluyendo que este método alternativo puede ser una herramienta confiable para la detección e identificación molecular de *Leishmania*, características que podrían facilitar su implementación en regiones endémicas.

Por otro lado, de acuerdo a la revisión realizada por (Tello, 2021), quien a partir de artículos publicados en los últimos 10 años relacionados a la detección e identificación de *Leishmania*, evidenció que los métodos moleculares más empleados fueron la PCR convencional (47,45%), y PCR tiempo real (18,64%), así mismo encontró que la PCR (HRM) cuenta con una sensibilidad de 98% por otro lado, la especificidad alcanzada por la PCR-RFLP fue de 90% mientras que, la PCR (HRM) alcanzó el 100%. Las dianas genómicas más relevantes son KADN (55,93%), ITS-1 (40,67%), gen Hsp70 (20,33%)

Por su parte, en el estudio realizado por Asfaram et al. (2020) con la finalidad de encontrar un método de diagnóstico de mayor precisión, evaluaron el Examen Microscópico Directo, la PCR convencional y PCR (HRM), empleando 105 muestras de frotis de raspado de piel, obteniendo una positividad en la PCR (HRM) del 89,5% del total de muestras procesadas siendo la más sensible en comparación con los otros métodos (IC95% 81-94%), por el contrario, fue el Examen Microscópico Directo el método que presentó menor sensibilidad (57%,

IC95% 47-66%), así mismo, la mayor concordancia encontrada entre las muestras positivas fue observada entre la PCR (HRM) y la PCR convencional. En Sao Paulo, Veasey et al. (2020), empleando PCR (HRM) 22 muestras procedentes de pacientes con sospecha de la enfermedad, lograron detectar la infección en 14 de ellas, e identificar la especie infectante determinando que 5 de los casos, fueron causados por *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (35,6%), 4 por *Leishmania (Viannia) braziliensis* (28,5%), 2 por *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* (14,4%), 2 por *Leishmania (Viannia) guyanensis* (14,4%) y 1 por *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* (7,1%). Estos resultados obtenidos por PCR (HRM) fueron procesados mediante otras metodologías y marcadores diferentes, tales como la secuenciación de un segmento del gen SSU ADN, kADN, y PCR-RFLP del gen Hsp70, sin embargo, la secuenciación del fragmento SSU sólo permitió la identificación comparable hasta el nivel de subgénero, no fue posible identificar hasta el nivel de la especie.

Por otro lado la investigación desarrollada por Recalde et al. (2019) realizado en Paraguay, lograron identificar por primera vez *Leishmania (Viannia) guyanensis* en el departamento de San Pedro y *Leishmania (Leishmania) amazonensis* en los departamentos de Concepción y Canindeyú. Así mismo, de un total de 132 muestras evaluadas, 36 resultaron positivas y lograron, a partir de muestras obtenidas de lesiones cutáneas, identificar a *Leishmania (Viannia) braziliensis* en el 84% del total, *Leishmania (Leishmania) infantum* en el 13% y *Leishmania (Leishmania) amazonensis* en el 3%, por el contrario, a partir de lesiones mucocutáneas, se logró identificar *Leishmania (V.) braziliensis* en el 40% del total de casos mucocutáneos, *Leishmania (L.) infantum* en el 20%, *Leishmania (L.) amazonensis* en 20% y *Leishmania (V) guyanensis* en 20%.

En este sentido, el estudio realizado por Müller et al. (2018) en Noruega; se enfocó en identificar una estrategia relativamente económica, rápida y confiable para detectar y discriminar especies de *Leishmania*, mediante el empleo del gen aminoácido permeasa 3 (AAP3), este estudio permitió diferenciar las especies de *Leishmania (L) donovani*, *Leishmania (L.) infantum*, *Leishmania (L.) major*, *Leishmania (L.) tropica*, *Leishmania (L.) mexicana*, *Leishmania (L.) amazonensis*, *Leishmania (V) braziliensis*, *Leishmania (V.) guyanensis*, *Leishmania (V.) lainsoni*, *Leishmania (V.) naiffi*. Evidenciando que, el gen aminoácido permeasa 3 (AAP3) es un potencial marcador para la identificación y

diferenciación mediante PCR (HRM) de las diferentes especies de *Leishmania*. Por otro lado Galluzzi et al., (2018) en una revisión sobre los métodos empleados en el diagnóstico e identificación de *Leishmania* señala que, los métodos moleculares que se basan en la PCR tiempo real dependiendo el marcador empleado puede ser efectivo en la identificación de *Leishmania*.

Otros estudios como el reportado por Zampieri et al. (2016) de la Universidad de Sao Paulo, Brazil también evaluaron PCR (HRM) dirigidos a diversas regiones del Hsp70 como método para la detección y diferenciación de las especies de *Leishmania*, logrando su detección incluso a una concentración de hasta un parásito por reacción, por otro lado, Hernández et al., (2014) en Bogotá, Colombia, evaluaron el potencial de la PCR (HRM) dirigido a otra región del gen Hsp70 e ITS1 a partir de 35 aislados procedentes de casos humanos, insectos vectores y mamíferos, logrando diferenciar hasta seis especies de *Leishmania* del Nuevo Mundo, (*Leishmania mexicana*, *Leishmania infantum (chagasi)*, *Leishmania amazonensis*, *Leishmania panamensis*, *Leishmania guyanensis* y *Leishmania braziliensis*) y con una concordancia del índice de Kappa entre PCR (HRM) y PCR-RFLP/MLEE/MA de 1,0.

En el Perú, el Laboratorio de Referencia Nacional de Leishmaniasis (LRNL) del Instituto Nacional de Salud, mediante el análisis de las curvas de disociación empleando la región conservada del kADN, lograron identificar la especie de *Leishmania*, infectante a partir de muestra de pacientes derivados a esta institución, en marco del diagnóstico especializado de la enfermedad Sandoval et al., (2020), similar a lo reportado, el estudio realizado por Silva (2018) elaborado en el LRNL logró evaluar y estimar la eficiencia de cuatro marcadores moleculares Hsp70, ITS1, kDNA y Citocromo B, en la identificación de las especies de *Leishmania*, a partir de 243 láminas de pacientes coloreadas con Giemsa.

En este sentido, son amplios los reportes realizados empleando la PCR (HRM) y el análisis de las curvas de disociación que evidencian la capacidad del método en la identificación de las diferentes especies de *Leishmania*, a pesar ello, es necesario la evaluación y comparación de los diferentes marcadores moleculares a fin de determinar la sensibilidad, especificidad, eficiencia y concordancia en la identificación de *Leishmania* frente a métodos de referencia como el PCR-RFLP o el secuenciamiento.

2.2. Marco conceptual

2.2.1. Enfermedades metaxénicas

Las enfermedades metaxénicas en el Perú son un problema importante de salud, debido a que afectan a los segmentos más pobres de la población. Se encuentran catalogadas entre las enfermedades reemergentes que afectan a una gran magnitud de la población (*Organización Panamericana de La Salud OPS/OMS, 2012*).

La respuesta del Ministerio de Salud frente a las enfermedades metaxénicas parasitarias, ha permitido controlar de manera limitada la transmisión de la enfermedad, motivo por el cual es importante abordar estudios de investigación que permitan profundizar conocimientos relacionados al parásito, vector causal, el hospedero y medidas de control a fin de implementar medidas más eficientes que permitan un mejor manejo de las reemergencias a futuro (*OPS/OMS, 2012*).

2.2.2. Leishmaniasis

La leishmaniasis es una enfermedad que causa en el hombre una gama de síntomas clínicos que afectan a la piel, que, dependiendo a la especie infectante y el sistema inmune del hospedero, puede diseminarse a las mucosas y órganos internos. Esta enfermedad es causada por protozoos del género *Leishmania* que se transmiten a través de la picadura de insectos de la familia *Psychodidae*, Subfamilia *Phlebotominae* del género *Lutzomyia* (*OPS/OMS, 2012*).

a) Especies

Según Akhoundi et al. (2017), en la actualidad se conoce acerca de 54 especies de *Leishmania* excluidas las especies sinónimas y al menos 21 de estas especies son patógenas para humanos.

La taxonomía del género *Leishmania* se estructura a nivel de subgénero, complejo de especies y (sub) especie. Este género está subdividido en 3 subgéneros, *L. (Leishmania)* y *L. (Viannia)* y *L. (Sauroleishmania)*, este último subgénero está relacionado a la infección en reptiles motivo por el cual es conocido como “*Leishmania* de las lagartijas” así mismo, este subgénero tiene muy pocas investigaciones (Fernández et al., 2019).

Los complejos de especie que está categorizado por su taxonomía es *Leishmania donovani*, *Leishmania tropica*, *Leishmania major*, *Leishmania mexicana*, *Leishmania braziliensis*, *Leishmania guyanensis*, *Leishmania linderbergi*, *Leishmania naiffi*, *Leishmania lainsoni*, *Leishmania utingensis* (Fernández et al., 2019).

En nuestro país las especies más prevalentes son *Leishmania (Viannia) braziliensis* y *Leishmania (V.) guyanensis*, en la región de Madre de Dios, Ucayali y San Martín; *Leishmania (V.) peruviana* en Lima, Ancash, La Libertad y Cajamarca; *Leishmania (L.) amazonensis* es una especie que ha sido poco reportada, en Junín, Amazonas y Ucayali (Sandoval Juarez et al., 2019), Como se detalla en la tabla 1.

Tabla 1. Clasificación taxonómica de *Leishmania*.

Subgénero	Complejo de especie	Especies	Localización geográfica
<i>Leishmania (Leishmania)</i>	<i>Leishmania donovani</i>	<i>Leishmania donovani</i>	Viejo mundo
		<i>Leishmania archibaldi</i>	Viejo mundo
		<i>Leishmania infantum</i>	Viejo mundo
		<i>Leishmania chagasi</i>	América
	<i>Leishmania tropica</i>	<i>Leishmania tropica</i>	Viejo mundo
		<i>Leishmania aethiopica</i>	
		<i>Leishmania killicki</i>	
	<i>Leishmania major</i>	<i>Leishmania major</i>	Viejo mundo
		<i>Leishmania arabica</i>	
		<i>Leishmania gerbilli</i>	
<i>Leishmania turanica</i>			
<i>Leishmania mexicana</i>	<i>Leishmania mexicana</i>	América	
	<i>Leishmania amazonensis</i>		
	<i>Leishmania aristidesi</i>		
	<i>Leishmania gamhami</i>		
	<i>Leishmania forattinni</i>		
	<i>Leishmania pifanoi</i>		
	<i>Leishmania venezuelensis</i>		
<i>Leishmania waltoni</i>			
<i>Leishmania braziliensis</i>	<i>Leishmania braziliensis</i>	América	
	<i>Leishmania peruviana</i>		
<i>Leishmania (Viannia)</i>	<i>Leishmania guyanensis</i>	<i>Leishmania panamensis</i>	América
		<i>Leishmania guyanensis</i>	
	<i>Leishmania lindenbergi</i>		
	<i>Leishmania lainsoni</i>		
	<i>Leishmania shawi</i>		
	<i>Leishmania naiffi</i>		

Fuente: (Fernández et al., 2019).

b) Formas clínicas

Según Murray, et al. (2014) existen diferentes formas clínicas que la enfermedad puede presentar principalmente en función de la especie implicada, estas formas son cutánea, cutánea difusa, mucosa y visceral:

Leishmaniasis cutánea. Caracterizada por presentar lesiones ulcerosas en su forma clínica, en el lugar de la picadura del mosquito, el primer signo aparece entre 2 semanas y 2 meses después de la exposición como una pápula roja.

Son intensamente pruriginosas que aumentan de tamaño conforme transcurre el tiempo de evolución, el cual posteriormente endurece y recubre de una costra. Esta forma clínica es frecuente encontrar complicaciones, producto de una infección bacteriana secundaria (Botero, 2012).

En el Perú, las especies causantes de la forma cutánea son *Leishmania (Viannia) peruviana*, *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *Leishmania (Viannia) guyanensis*, *Leishmania (Viannia) lainsoni*, *Leishmania (Viannia) shawi*, *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (Botero, 2012).

Leishmaniasis mucosa. Está asociada principalmente a *Leishmania (Viannia) braziliensis*, otra especie reportada, pero en menor proporción es *Leishmania (Viannia) guyanensis*; esta forma clínica es la progresión de la forma cutánea debido principalmente a un proceso de metástasis, también puede darse el caso por un proceso de contigüidad (Botero, 2012).

Se caracteriza por afectar las mucosas y las estructuras tisulares asociadas a las fosas nasales (septum nasal, laringe, entre otros) y boca (lengua, labios, úvula, paladar, etc), los cuales pueden ocurrir años después de la aparición de las lesiones primarias, sin embargo, puede en casos excepcionales ocurrir de forma simultánea a la lesión primaria (Botero, 2012).

En esta forma clínica puede ocurrir un proceso de mutilación facial grave, con deformación de la cara e infección bacteriana secundaria (Botero, 2012).

Leishmaniasis visceral. Hasta la actualidad, esta forma clínica no ha sido detectada en el Perú. Es generalmente una enfermedad insidiosa y crónica que afectan el hígado y bazo, provocando esplenomegalia y hepatomegalia además de linfadenopatía generalizada, entre los habitantes de áreas endémicas (Salud, 2000).

Esta forma clínica es causada por la infección de *Leishmania (Leishmania) infantum*, o *Leishmania (Leishmania) chagasi* como es conocido en América, transmitido por *Lutzomyia longipalpis*. (Salud, 2000).

c) Agente etiológico

El agente etiológico de la Leishmaniasis es un protozooario parásito de la familia *Trypanosomatidae*, del género *Leishmania*. En su ciclo de vida se encuentran dos formas o estadios (Salud, 2000).

Promastigote. Forma infectante, extracelular, alargada, que se desarrolla y multiplica en el tracto digestivo de los insectos transmisores, presenta una longitud entre 20-30 μm , presenta un flagelo que le proporciona movilidad en el

intestino de los insectos vectores. De acuerdo al lugar donde se desarrolla el parásito en el tubo digestivo del vector, el género *Leishmania* puede ser clasificado en los subgéneros *Leishmania* y *Viannia*. El primero de los cuales se desarrolla en la parte anterior del píloro (desarrollo suprapilórico), en la unión del intestino medio y posterior, mientras que el subgénero *Viannia*, en el intestino medio como posterior (Salud, 2000).

Amastigote Es la forma replicativa, presenta una morfología redondeada u oval, carece de flagelo, es intracelular, se encuentra en los macrófagos donde se dividen, presenta un tamaño entre 2-5 μm (Salud, 2000).

d) Ciclo de vida

El género *Leishmania* presenta un ciclo de vida que incluye insectos de la Familia *Psychodidae*, en América, el vector involucrado en la transmisión de la enfermedad pertenece al género *Lutzomyia*, mientras que en Europa, Asia y África es el género *Phlebotomus* (Sandoval et al., 2020).

El ciclo inicia cuando un mosquito hembra se infecta durante el proceso de digestión de la sangre de un vertebrado que presenta la enfermedad, en donde las formas amastigotes libres o contenidos dentro de macrófagos infectados son digeridos y una vez en el tubo digestivo del mosquito, inician un proceso denominado metaciclogénesis, que corresponde a cambios morfológicos, fenotípicos y genotípicos, relacionada a su expresión que permiten el desarrollo, supervivencia, multiplicación por división binaria y colonización en el vector. Estos cambios inician con la aparición de un flagelo, el cual le otorga además de la motilidad propia del promastigote, la capacidad para adherirse a las microvellosidades del intestino en el vector (Botero, 2012).

Una vez alcanzado el desarrollo en el intestino, estos migran hacia las glándulas salivales del vector, donde concluye con su transformación a promastigotes infectivos, el cual toma lugar en aproximadamente 10 días (Botero, 2012). En la naturaleza, la infección de los vectores es baja, por lo que, para alcanzar la infección de un hospedero se requiere un proceso repetitivo de inoculación (Sandoval et al., 2020).

Una vez, alcanzado un mayor desarrollo, las formas promastigotes migran hacia las glándulas salivales del vector, donde los parásitos infectivos secretan un gel compuesto en mayor parte de polisacáridos que bloquea la probóscide e interfiere con la alimentación del insecto, cuando éste pica a un nuevo vertebrado, provoca un proceso de regurgitación y facilita la inoculación de

promastigotes metacíclicos en el hospedero (Sandoval et al., 2020).

Al penetrar la piel, los promastigotes son englobados dentro de los fagosomas por las células de langhehrans y macrófagos, se inicia un nuevo proceso de metaciclogénesis, esta vez transformándose de promastigotes a amastigotes (Botero, 2012).

Estas formas parasitarias se reproducen intracelularmente por división binaria, causando en algunos casos el rompimiento de los macrófagos que los contienen permitiendo su liberación, proliferación e infección a nuevas células, lo cual evidencia en el paciente en forma de lesiones ulcerativas por destrucción del tejido.

En especies del complejo donovani como *Leishmania (Leishmania) infantum* y *Leishmania (Leishmania) donovani*, los parásitos pueden diseminarse a las vísceras, lo cual no ocurre con otras especies del subgénero *Leishmania (Leishmania)* y *Leishmania (Viannia)*, que solo se localizan en la piel o mucosas (Montalvo et al., 2014).

Lutzomyia. Hasta la fecha se conocen hasta 500 especies de dípteros en América de sur, de los cuales 30 son reconocidas como vectores de la leishmaniasis Tsukayama et al., (2009), así mismo, en el Perú se han descrito 131 especies de *Lutzomyia*, de las que, cinco son vectores de Leishmaniasis tegumentaria (Zorrilla et al., 2017).

La asociación entre la leishmaniasis tegumentaria y los flebotomíneos como transmisores del agente etiológico de esta enfermedad, fue descrita inicialmente por Cosme Bueno en 1764, quien menciona que la picadura de un pequeño insecto al que los nativos llamaban "uta", producía lesiones ulcerativas en la piel de muy difícil tratamiento (Zorrilla et al., 2017).

En las primeras décadas del siglo XX, se realizaron numerosos estudios acerca de la epidemiología y clínica de la leishmaniasis en el Perú Montalvo et al. (2017), posteriormente se fue conociendo mejor la biología y el comportamiento de los flebotomíneos Zorrilla et al. (2017), así como el desarrollo del ciclo biológico de algunas especies bajo condiciones de laboratorio (Zorrilla et al., 2017).

La distribución geográfica del vector debe coincidir con la enfermedad que transmite, además de una fuerte asociación ecológica, incluyendo estacionalidad, densidad del vector, infección humana y de reservorios (Zorrilla et al., 2017).

2.2.3. Métodos de diagnóstico de laboratorio

a) Examen microscópico directo

Conocido también como frotis, este método parasitológico se basa en la detección por visualización microscópica de las formas amastigotes de *Leishmania* en las láminas con extendidos de tejido coloreados con Giemsa (Montalvo et al., 2012).

Es el método de diagnóstico más empleado debido a su sencillez, rapidez de los resultados y elevada especificidad que presenta, sin embargo, presenta una sensibilidad variable que depende de factores como la calidad en la obtención de muestra, coloración, tiempo de evolución de la enfermedad, presencia de contaminación bacteriana, experiencia del analista, entre otros, en este sentido, lesiones crónicas y aquellas que se presentan con infección sobre agregada, la sensibilidad es menor siendo más difícil el hallazgo del parásito (Montalvo et al., 2012).

b) Cultivo

Se basa en la detección de las formas promastigotes por visualización microscópica, los cuales son obtenidos asépticamente a partir del tejido ulcerado e inoculado en medio de cultivo adecuado como gar sangre, que es el medio más empleado, otros medios empleados son Novy-MacNeal-Nicolle, conocido comúnmente como medio NNN, Tobie modificado, los medios líquidos Seneckje, *Drosophila Schneider's*, entre otros Pourmohammadi et al. (2010), es posible, dependiendo de la carga parasitaria y la especie de *Leishmania* infectante visualizar formas promastigotes, con frecuencia aglomerados y entrelazados por sus flagelos, formando algunas rosetas características.

Al igual que el examen microscópico directo, presenta una elevada especificidad y una sensibilidad limitada debido a factores como la obtención de muestra, tiempo de evolución de la enfermedad, la carga parasitaria, la presencia de contaminación bacteriana, la experiencia del analista, entre otros. En caso de la obtención de muestras a partir de lesiones contaminadas, sin ninguna consideración de asepsia, el aislamiento de parásitos es ineficiente por el crecimiento de bacterias u hongos (Montalvo et al., 2012).

c) Diagnóstico molecular

Métodos moleculares presentan al igual que los métodos parasitológicos, una elevada especificidad y una sensibilidad que depende a la adecuada obtención de muestra, a su vez, del marcador empleado, etc. Puede llevarse a cabo a partir

de muestras obtenidas por biopsia, raspado de piel, de aspirados, de láminas con tinción Giemsa, papel de filtro impregnado en la lesión, así como aplicadores en la mucosa bucal, entre otros (Mérida y Moreno, 2015).

Se basa en la detección del ADN parasitario aún en concentraciones mínimas equivalente a fentogramos, además de ello, dependiendo el marcador empleado, permite la identificación de la especie de *Leishmania* involucrada; su implementación sin embargo es complejo debido a que requiere de una infraestructura adecuada, insumos, equipamiento y personal entrenado,

En relación a los marcadores moleculares, estos han sido diseñados para responder las necesidades de los países o regiones, a la detección del parásito, sin embargo, son pocos los estudios desarrollados con la finalidad de valorar su eficiencia que permita el diagnóstico (Mérida y Moreno, 2015).

d) Reacción de la cadena polimerasa

Esta técnica fue ideada por K. Mullis a mediados de la década de 1980, a quien posteriormente se otorgó en 1993, el premio Nobel de Química. Se caracteriza porque recurre a una polimerasa termorresistente (Dorado et al., 2019).

Es sin duda una de las técnicas más importantes en biología molecular que permite obtener *invitro* infinidad de copias de un fragmento de ácido dextrorribonucleico.

La PCR simula la replicación celular en la que intervienen proteínas específicas que permiten la formación de dos nuevas hebras de ADN a partir de una que su función es la de molde Serrato et al. (2014); por lo tanto la PCR se basa en la repetición de tres fases como son la desnaturalización térmica del ADN, hibridación de cebadores específicos de ADN de cadena sencilla y extensión de ADN estas fases son repetidos de manera cíclica donde cada ciclo se duplica la cantidad de ADN específico. En la PCR convencional los productos amplificados son llevados a un proceso de separación de electroforética en gel de agarosa y la tinción con colorante fluorescente con afinidad al ADN pueden ser visualizados en un transiluminador con luz ultravioleta (Miranda et al., 2016).

2.2.4. Métodos para la identificación de Leishmania

Los métodos empleados en la identificación de las especies de *Leishmania* son:

a) Electroforesis de izonenzimas (MLEE)

Por su denominación en inglés, Multilocus Enzyme Electrophoresis (MLEE), es la metodología considerada hasta la fecha como prueba patrón en la identificación de las especies de *Leishmania spp* (Van Der Auwera y Dujardin, 2015).

Esta metodología marcó un precedente en la taxonomía actual de *Leishmania*, debido a que la tipificación está relacionada a la variabilidad intraespecífica o la evolución convergente Van Der Auwera y Dujardin, (2015). Por otro lado, su implementación no ha sido masiva, limitándose a algunos laboratorios a nivel global, debido principalmente a las condiciones de reproductibilidad que requiere el método además de la infraestructura compleja, equipamiento sofisticado y a los requerimientos intrínsecos, como el elevado número de parásitos viables, el empleo de un conjunto de enzimas distintos dependiendo el sub género y más aun dependiendo la especie debido a los presencia en algunos casos de múltiples alelos para un determinado locus, factores que hacen laborioso el proceso de identificación, lo cual dificulta la comparabilidad entre los laboratorios (Lins Jennings et al., 2014) (Tsukayama et al., 2009) (Lauthier et al., 2020).

b) Tipificación mediante análisis de secuencias multilocus o MLST

Por sus siglas en inglés Multilocus Sequence Typing, esta técnica nos permite caracterizar de manera inequívoca regiones específicas o genes mediante el análisis de las secuencias (Losada et al., 2013).

El análisis de las secuencias multilocus nos proporciona un enfoque de alta resolución en la identificación de especies y cepas de patógenos que afectan la salud humana, la agricultura (plantas y animales) y la bioseguridad.

También nos brinda información genética de la población, sobre los niveles y la direccionalidad del flujo de genes Losada et al. (2013), mucho más exacta a diferencia de los métodos convencionales (Losada et al., 2013).

Sin embargo, para lograr la genotipificación mediante MLST, es importante una adecuada selección y evaluación de loci, siendo este factor una de las principales limitaciones debido a que requiere al menos un genoma de referencia completos o genes de interés del patógeno(Losada et al., 2013).

Actualmente, el desarrollo de métodos moleculares como el secuenciamiento de múltiples locus (MLST) ha permitido la identificación de las cepas de *Leishmania* comparable al MLEE (Herrera et al., 2017)(Van Der Auwera et al., 2014)(Boité et al., 2012).

c) PCR RFLP

El fragmento de restricción de longitud polimórfica (RFLP) es una técnica promulgada en 1984 por el científico inglés Alec Jeffreys durante su investigación en enfermedades hereditarias (Cheriyedath, 2018).

Se basa específicamente en la detección de fragmentos de ADN de distinto longitud, el cual permite identificar un perfil específico del ADN que se desea (Instituto Nacional de Investigación del Genoma Humano y Pavan, 2020), este método expresa diferencias específicas del ADN que son reconocidas por diferentes enzimas de restricción (endonucleasas). Cada una de ellas (de origen bacteriano), reconoce y corta una secuencia específica de bases nitrogenadas en el ADN, siempre en cuando no estén protegidas por presencia de metilación que inhibiría su reconocimiento y escisión en fragmentos de longitud definida; por lo tanto, cualquier evento de mutación dentro de los sitios específicos de reconocimiento de las enzimas podría cambiar el perfil del fragmento y permitir que se detecte un RFLP al comparar dos o más genomas (Alcántara, 2000).

La identificación de especies de *Leishmania* emplea la PCR-RFLP dirigido a la región del gen que codifica la proteína de choque térmico 70 (*Hsp70*), el cual es comparable a los métodos de referencia o patrón (Van Der Auwera & Dujardin, 2015)(Montalvo et al., 2010)(Fraga et al., 2012).

d) PCR HRM

Por sus siglas en inglés (High Resolution Melting), es un método que permite la detección e identificación del patógeno con una elevada sensibilidad, sin embargo, requiere condiciones como una cuidadosa y adecuada selección del marcador, un termociclador en tiempo real con la capacidad para adquirir datos en pequeños intervalos de tiempo en el cual el amplicón es sometido a un incremento progresivo de temperatura desde los 50 °C hasta aproximadamente 95 °C para permitir alcanzar la temperatura de fusión del amplicon de interés y posteriormente la separación de la hebra de ADN (Empresa, et al., 2015)

Al comenzar el proceso de análisis de HRM, se aprecia un elevado nivel de fluorescencia debido a la inmensa cantidad de copias del amplicon de interés, pero a medida que la temperatura va incrementando llegando a la temperatura de fusión, las dos hebras de ADN se separan, la presencia de la doble cadena se reduce al igual que la fluorescencia, Los datos de HRM a menudo se representan como curvas de diferencia para magnificar visualmente las diferencias entre los perfiles de fusión de diferentes grupos dentro del mismo genotipo (Garritano et al., 2009).

Así mismo la identificación de *leishmania* mediante métodos moleculares emplea una variedad de marcadores desde los nucleares hasta los mitocondriales, siendo los más importantes los que se detallan a continuación.

2.2.5. Biomarcadores

Cuando hablamos de biomarcadores básicamente nos referimos a una secuencia, organismo, molécula, material genético que conduce a ser un indicador específico, entonces, en la actualidad se conoce diferentes tipos de biomarcadores según su pronóstico diagnóstico o algún tipo de proyecto en específico que se desea evaluar Wettersten y Maisel, (2016). En este trabajo se desarrollará 2 tipos de marcadores los nucleares y mitocondriales.

2.2.6. Marcadores nucleares

a) Gen Hsp70

Está presente en todos los tipos de células y se conserva a lo largo de la evolución celular. Presentan entre especies, una alta relación en sus aminoácidos residuales, lo cual es apropiado debido a que las proteínas brindan respuesta celular al estrés. Fue descubierta mediante investigaciones realizadas en larvas de *Drosophila melanogaster* (mosca del vinagre) a principios de los años sesenta, tras someterlos a estrés térmico, de ahí su denominación (Residente, 2019).

Debido a su masa molecular las proteínas de choque térmico, se clasifican en diferentes grupos. De esta forma, pueden diferenciarse diversas proteínas en un rango de 8 a 110 kDa. La familia Hsp70 cuenta con las proteínas mejor conservadas y más sensibles al estrés térmico, los que pueden localizarse en el citosol, en el núcleo y en el retículo endoplasmático (Residente, 2019).

b) AAP3

El aminoácido permeasa3 (AAP3) es un transportador de aminoácidos involucrado en la captación de lisina, histidina, fenilalanina, citrulina y arginina, con mayor afinidad por la arginina, este marcador participa en la vía de las poliaminas necesaria para la multiplicación del parásito. La secuencia codificante de AAP3 es única entre los tripanosomastoides y se conserva entre *Leishmania spp.* lo cual nos indica su valor como diana de amplificación. (Erik Müller et al., 2018)

La secuencia de codificación para AAP3 presenta dos copias y organizada en tándem en la mayoría de las *Leishmania spp* sin embargo la especie de *Leishmania (Viannia) braziliensis* presenta solo una copia de este gen (Erik Müller et al., 2018).

2.2.7. Marcadores mitocondriales

Este compuesto por 2 estructuras maxicírculos y minicírculos con ADN de doble hebra circular.

a) Maxicirculo

Está constituidos por genes con funciones similares a las presentes en las mitocondrias, estos son ampliamente empleados como marcadores filogenéticos, se caracterizan por presentar un mayor tamaño en pares de bases a comparación de los minicírculos (Oscar, 1986).

b) Minicírculos

Constituyen aproximadamente el 90-95%del ADN mitocondrial. En cada kinetoplasto existen miles de minicírculos, con diferentes tamaños y complejidad entre los distintos géneros y especie (Oscar, 1986).

La secuencia de los minicírculos es muy heterogénea en muchas especies. Por lo cual, la organización de los minicírculos en una región conservada y una variable parece ser una característica general de los protozoarios del orden Kinetoplastida (Oscar, 1986). La región conservada consta de puntos muy conservados, se le denomina como CSB 1, CSB 2, CSB 3, para *Leishmania*, *Trypanosoma* e incluso *Crithidia*, se diferencia en algunos nucleótidos sin embargo regiones entre el (CSB1- CSB2) y entre (CSB2- CSB3) pueden ser dirigidas como objetivo de identificación para especies de Leishmaniasis.

En el presente proyecto se evaluará la comparación de los marcadores moleculares kDNA, Hsp70 y AAP3-Amp1, en la identificación de *Leishmania spp*, empleando análisis de las curvas de disociación.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Ubicación

El presente estudio se desarrolló en el Laboratorio de Referencia Nacional de Leishmaniasis del Centro Nacional de Salud Pública – Instituto Nacional de Salud, Lima - Perú

3.2. Población y muestra

La población en estudio estuvo conformada por las muestras contenidas en lancetas preservadas en alcohol al 70% procedentes de pacientes que acudieron al Instituto Nacional de Salud en marco del diagnóstico especializado de la Leishmaniasis entre 2010-2019, información que se encuentra contenida en el marco muestral. La selección y tamaño de la muestra, fue por conveniencia, considerando el resultado confirmatorio de la enfermedad mediante métodos parasitológicos como el examen Microscópico Directo y/o Cultivo *in vitro*, en ese sentido, el tamaño de la muestra estuvo conformado por 129 muestras de lancetas.

3.3. Metodología

El presente estudio, se enmarca en la comparación de la eficiencia de los marcadores moleculares ampliamente empleados en la identificación molecular de las diferentes especies de *Leishmania* mediante el PCR (HRM).

Con esta finalidad, se realizó los procedimientos que se describen a continuación:

3.3.1. Extracción

a) Extracción de ADN genómico de cepas referenciales OMS de *Leishmania* spp.

El proceso de extracción de ADN genómico se desarrolló empleando PureLink Genomic DNA Kits (Life Technologies - Invitrogen), siguiendo las recomendaciones del fabricante. Se empleó cepas referenciales OMS de

Leishmania, los cuales se detallan a continuación:

Tabla 2. Cepas referenciales OMS de *Leishmania*.

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

Para la obtención de ADN genómico de las cepas referenciales de *Leishmania*, se realizó la reactivación como describe Calvay-Sánchez et al.(2015), se empleó medio bifásico Agar Sangre Base con 15% con sangre de conejo y antibióticos. Los cultivos fueron monitorizados diariamente hasta alcanzar un crecimiento abundante, luego fue transferido a medio líquido Schneider enriquecido al 20% con suero fetal bovino inactivado por calor y antibióticos (Calvay-Sánchez et al., 2015).

Una vez alcanzado la concentración de parásitos mayor a 10^5 parásitos/ml, estos fueron cosechados por centrifugación a 8000 rpm (28621 RCF) por 10 minutos. Seguidamente se retiró el sobrenadante, y el sedimento fue resuspendido en 180 μ l de solución tampón de digestión y 20 μ L de proteinasa K, con ayuda de una micropipeta, la muestra fue homogenizada, luego incubada a 55°C durante 2 horas en baño maría con agitación constante para facilitar el proceso de digestión. Al término, se centrifugó a 13000 rpm a velocidad máxima por 3 minutos, el sobrenadante fue transferido a un tubo cónico estéril de 1,5 ml, se agregó 20 μ L de RNasa (Life technologies y Numbers, 2013).

La muestra fue homogenizada con ayuda del vortex, e incubada a temperatura ambiente por 2 minutos, se agregó 200 μ l de solución tampón de lisis y 200 μ L de etanol frío (96% - 100%). nuevamente se homogenizaron las muestras, para continuar con el proceso de purificación y elusión (Life technologies y Numbers, 2013).

b) Extracción de ADN genómico a partir de muestra procedentes de lancetas

La extracción se realizó de acuerdo a lo reportado por (Koarashi et al., 2016) con las modificaciones que se detallan a continuación:

Las lancetas con tejido de lesión embebidas en alcohol fueron centrifugadas a 10 000 rpm x 3 minutos, se descartó cuidadosamente el sobrenadante, se agregó 180 µL de solución tampón de digestión y 20 µL de proteinasa K, luego las muestras fueron incubadas a 55°C por 2 horas en baño maría en agitación constante a 150 rpm, al término, se retiró las lancetas de los tubos de polipropileno y centrifugadas a 14 000 rpm o a velocidad máxima por 3 minutos, luego el sobrenadante transferido a un tubo cónico estéril (Life technologies y Numbers, 2013).

Se agregó a la muestra 20 µl RNasa A, seguidamente se homogenizó e incubó a temperatura ambiente por 2 minutos, se adicionó 200 µl solución de lisis, y nuevamente se homogenizó las muestras, luego se agregó 200 µL etanol frío (96% - 100%), y homogenizadas con vortex durante 5 segundos (Life technologies y Numbers, 2013).

El volumen total de la muestra lisada, aproximadamente 620 µl fue transferida a una columna cromatográfica, donde se centrifugó a 10 000 rpm por 1 minuto a temperatura ambiente, se reemplazó el tubo colector por un nuevo tubo, luego se agregó 500 µL de solución de lavado 1 (previamente preparado con etanol), y centrifugada a 10 000 rpm por 1 minuto, se reemplazó nuevamente el tubo colector por uno nuevo. Se adicionó 500 µL de solución de lavado 2 (previamente preparado con etanol), se centrifugó a 14 000 rpm por 3 minutos o a velocidad máxima, luego se descartó el contenido del tubo colector (Life technologies y Numbers, 2013). Con la finalidad de eliminar residuos de alcohol, las muestras fueron centrifugadas a 14 000 rpm por 1 minutos o a velocidad máxima, se descartó el tubo colector y la columna dispuesta a en un tubo cónico estéril de 1,5 ml, se adicionó 50 µl de solución de elusión previamente atemperado a 55°C, se incubó por 1 minuto a temperatura ambiente y al término se centrifugó a 14 000 rpm o a velocidad máxima por 1 minuto (Life technologies y Numbers, 2013), este proceso fue repetido con la finalidad de recuperar otra alícuota de ADN genómico purificado, las muestras fueron rotuladas y llevadas a - 20°C para su conservación hasta el momento de su uso.

3.3.2. Cuantificación

a) ADN genómico a partir de muestra procedentes de lancetas

La cuantificación se realizó para determinar la concentración y pureza del ADN, para ello, se empleó el espectrofotómetro de microplacas Eon de Biotek, se utilizó 2ul de las muestras de ADN genómico por pocillo, mientras que, como

blanco o de referencia se empleó la solución tampón Tris-EDTA (TE), la lectura se desarrolló a una longitud de onda de 260 y 280 nm.

Para la cuantificación de ADN solo se tomó en consideración las muestras de ADN genómico extraídas procedentes de lancetas de ADN genómico.

El proceso de cuantificación en el espectrofotómetro permitió determinar la concentración de ADN genómico y la calidad de ADN, una absorbancia de la muestra a un rango entre 1,8 - 2 fue considerada de pureza óptima, de 1,6 – 1,8 aceptable y rangos menores de 1,6 y/o mayores a 2 se les consideró DNA contaminado por proteínas/alcoholes respectivamente.

3.3.3. Estandarización de PCR en tiempo real dirigido a Hsp20 y RNAsaP

La PCR en tiempo real dirigido a las Hsp20 y RNasa P fueron empleados como método de control de las muestras previo a la identificación de la especie infectante, para ello, se consideró los siguientes criterios:

Tabla 3. Criterio de selección de muestras referido al valor de Ct del marcador Hsp20 y RNasa P.

Valor	Hsp20	RNasa P	Resultado	Interpretación
Ct <36	Positivo	Positivo	Positivo	Se incluyó en estudio de identificación de la especie involucrada
Ct <36	Positivo	Negativo	Positivo	Se incluyó en estudio de identificación de la especie involucrada
Ct <36	Negativo	Positivo	Negativo	Se excluyó del estudio de identificación de la especie involucrada, debido a que no se detectó ADN del parásito
Ct <36	Negativo	Negativo	Inválido	Se excluyó del estudio de identificación de la especie involucrada, debido a que no hay presencia del ADN

En relación a la PCR en tiempo real dirigido a Hsp20, esta fue estandarizada empleando las cepas referenciales descritas en la tabla 2 en el termociclador MicPCR (Bio Molecular Systema) se evaluó la concentraciones óptimas de cloruro de magnesio, primers, así como la configuración del ciclaje, según lo reportado por (Montalvo et al., 2014) este proceso se llevó a cabo considerando un volumen de reacción de 10 µl y empleando los primer

Hsp20S Forward: 5'- GCCRGARGTGARRAAGGAGGAC-3' y

Hsp20S Reverse: 5'- GYAGCTGGYKYTCGTCCTGC-3'.

Mientras que la PCR en tiempo real dirigido a la detección del gen humano RNasa P fue realizado de acuerdo a las recomendaciones del fabricante.

Tabla 4. Descripción de los componentes de la reacción del marcador Hsp20.

Componente	Concentracion/Rx
Master Mix (Luminaris Color HiGreen qPCR, K0392, ThermoScientific)	1X
Primers Hsp20S Forward(10umol/ul)	0,3 µM
Primers Hsp20S Reverse(10umol/ul)	0,3 µM
H ₂ O PCR	1,4 µL

Tabla 5. Condiciones de Amplificación del Marcador Hsp20.

Etapas	Ciclos	Denaturación	Hibridización/Extensión
Activación de la polimerasa	1	5 min x 95 °C	
Pre ciclaje	5	15 seg x 95°C	30 seg x 62°C
Ciclaje	45	15 seg x 95°C	30 seg x 62°C

3.4. Detección de control endógeno

La detección del gen RNasa P que codifica la ribonucleasa P humana permitió confirmar la presencia de DNA genómico extraído, se usó el master mix de Applied Biosystems. Como muestra control se empleó ADN genómico humano. Se le consideró positivos a muestras amplificadas con un umbral o Cycle threshold (Ct) \leq 36. La amplificación del gen RNasa P se realizó mediante el protocolo que se detalla para un volumen máximo de 10 µl y empleando las siguientes condiciones.

Tabla 6. Descripción de los componentes de la reacción de PCR del RNasa P.

Componente	Concentracion/Rx
Master mix Applied Biosystems.	1X
RNase P Forward (10umol/ul)	0,4 µM
RNase P Reverse (10umol/ul)	0,4 µM
RNase P Probe (1 umol/ul)	0,05 µM
H ₂ O PCR	0,7 µL

Tabla 7. Condiciones de Amplificación del RNasaP.

Etapas	Ciclos	Denaturación	Hibridización/Extensión
Activación de la polimerasa	1	10min x 95 °C	
Ciclaje	40	10 seg x 95°C	30 seg x 58°C

3.4.1. PCR en tiempo real dirigido a Hsp70, AAP3-Amp1 y kADN

a) Marcador Hsp70.

Se realizó la PCR en tiempo real Hsp70 empleando el kit de amplificación

qPCRBIO HRM Mix Master (Cat PB20.31-5, PCRBIOSYSTEM) y los primers Hsp70S Forward: 5'- AGGTGAAGGCGACGAACG - 3' y Hsp70S Reverse: 5'- CGCTTGTCCATCTTTGCGTC - 3', de acuerdo a lo reportado por Zampieri et al., (2016), con algunas variaciones como es el volumen de reacción que fue a 10 µL, al igual que la PCR dirigido a Hsp20. La composición de la reacción y las condiciones de amplificación se describen a continuación:

Tabla 8. Descripción de los componentes de la reacción del marcador Hsp70.

Componente	Concentración/Rx
qPCRBIO HRM Mix Master	1X
Primers Hsp70S Forward(10umol/ul)	0,3 µM
Primers Hsp70S Reverse(10umol/ul)	0,3 µM
H2O PCR	1,4 µL

Tabla 9. Condiciones de amplificación y HRM del marcador Hsp70.

Etapas	Ciclos	Denaturación	Hibridización/Extensión
Activación de la polimerasa	1	5 min x 95°C	
Ciclaje	40	15 seg x 95°C	30 seg x 60°C
HRM		Rampa de temperatura	Intervalo de incremento
Hold		10 seg x 95 °C	
Hold		60 seg x 60°C	
Melt Form		60°C to 98 °C	1°C

b) Marcador AAP3-Amp1

Se realizó la PCR en tiempo real AAP3-Amp1 se empleó el kit de amplificación qPCRBIO HRMMix Master (Cat PB20.31-5, PCRBIOSYSTEM) y los primers AAP3-Amp1 Forward: 5' - CGTGGTGAAGTACTTCATGTCCG C - 3' y AAP3-Amp1 Reverse: 5' - ATCCGCTACGTCTCCGCCATCGG - 3' según lo reportado por Herrera et al.(2017), el volumen de reacción fue a 10 µl. La composición de la reacción y las condiciones de amplificación se describen a continuación:

Tabla 10. Descripción de los componentes de la reacción del marcador AAP3-Amp.

Componente	Concentración/Rx
qPCRBIO HRM Mix Master	1X
Primers AAP3-Amp1 Forward (10umol/ul)	0,5 uM
Primers AAP3-Amp1 Reverse (10umol/ul)	0,5uM
H2O PCR	1,0 uL

Tabla 11. Condiciones de amplificación y HRM del marcador AAP3- Amp1.

Etapas	Ciclos	Denaturación	Hibridización/Extensión
Activación de la polimerasa	1	5 min x 95°C	
Preciclaje	5	15 seg x 95°C	30 seg x 62°C
Ciclaje	40	15 seg x 95°C	30 seg x 60°C
HRM		Rampa de temperatura	Intervalo de incremento
Hold		10 seg x 95 °C	
Hold		60 seg x 60°C	
Melt Form		60°C to 98 °C	0,2; 0,5; 1°C

c) Marcador kADN

Se realizó la PCR en tiempo real kADN se empleó el kit de amplificación qPCR BIO HRM Mix Master (Cat PB20.31-5, PCRBIOSYSTEM) y los primers kADN Forward: 5' - 5'- GGG GAG GGG CGTTCT GCG AA -3' y kADN Reverse: 5' - 5'-CCG CCC CTA TTT TACACC AAC CCC -3' según lo reportado por (Sandoval et al., 2020), el volumen de reacción fue a 10 µl.

La composición de la reacción y las condiciones de amplificación se describen a continuación:

Tabla 12. Descripción de los componentes de la reacción del marcador kADN.

Componente	Concentración/Rx
qPCR BIO HRM Mix Master	1X
MgCl ₂	1,5mM/µL
Primers kADN Forward (10umol/ul)	0,7 uM
Primers kADN Reverse (10umol/ul)	0,7uM
H ₂ O PCR	0,3 uL

Tabla 13. Condiciones de amplificación y HRM del marcador kADN.

Etapas	Ciclos	Denaturación	Hibridización/Extensión
Activación de la polimerasa	1	5 min x 95°C	
Ciclaje	35	15 seg x 95°C	30 seg x 60°C
HRM		Rampa de temperatura	Intervalo de incremento
Hold		10 seg x 95 °C	
Hold		60 seg x 60°C	
Melt Form		60°C to 98 °C	1°C

3.4.2. Límite de detección y eficiencia de la amplificación de la PCR en tiempo real

Se determinó el límite de detección y eficiencia de la amplificación de la PCR en tiempo real de cada marcador molecular Hsp20, kADN, Hsp70 y AAP3-Amp1, empleando ADN genómico de *Leishmania (Viannia) guyanensis* a una concentración inicial equivalente de 10^5 parásitos/ml, al cual se realizó diluciones seriadas equivalentes a 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10, 1 y 0,1 parásitos/ml (León et al., 2018), esta valoración se realizó por triplicado.

3.4.3. Identificación de las especies de *Leishmania*

La Identificación de *Leishmania* se realizó a las muestras con resultado positivo en la PCR en tiempo real dirigido a Hsp20, se consideró además los valores de pureza del ADN de acuerdo a la relación 260/280 obtenidos durante la cuantificación de ácidos nucleicos, aquellas muestras con valores atípicos fueron considerando las muestras de ADN genómico extraído serán purificadas por precipitación de ácidos nucleicos, de acuerdo al protocolo estandarizado por el laboratorio de Referencia Nacional de Leishmaniasis, el cual se basa en la purificación del DNA por precipitación con sales seguido por lavados con Alcohol y el cual se detalla a continuación:

Las muestras de ADN fueron ajustadas a 0,3 M, pH 5,2, para ello, se agregó 90 μ l de acetato de sodio 1 M a las muestras, luego se completó con agua grado biología molecular hasta obtener un volumen final de 300 μ l, se adicionó 600 μ l de Isopropanol a temperatura ambiente, se homogenizó con ayuda de la micropipeta, luego se centrifugó a 14 000 rpm durante 30 minutos a 4°C.

Al término, se descartó cuidadosamente el sobrenadante evitando resuspender el pellet, luego se procedió a un proceso de lavado con la finalidad de remover el coprecipitado de sales mediante la adición de 1 ml de etanol grado reactivo al 70% (Etanol absoluto diluido al instante con agua Mili Q o agua de grado PCR), se centrifugó a 14 000 rpm durante 15 minutos a 4 °C, y se descartó cuidadosamente el sobrenadante sin resuspender el sedimento. Las muestras fueron dispuestas en gradillas con la tapa abierta e incubadas a temperatura ambiente por toda la noche cubierto con papel aluminio en un ambiente oscuro. Al término, para resuspender el ADN purificado, se adicionó a cada tubo 30 μ l buffer de elusión e incubadas a temperatura ambiente por 1 hora y en agitación a 120 rpm.

La identificación se realizó empleando los marcadores de Hsp70, AAP3 y

kADN y como muestras controles se empleó ADN genómico de las diferentes cepas referenciales OMS de *Leishmania* listadas en la tabla 1 a una concentración equivalente entre 10 y 103 parásitos/ml, como control negativo se empleó agua de PCR libre de ARNasa provisto en el Kit y ADN genómico de Humano. Identificación de las especies mediante PCR-RFLP del Hsp70 La PCR RFLP dirigido a Hsp70 fue desarrollado como prueba de referencia, y se desarrolló de acuerdo a la metodología reportada (A. M. Montalvo et al., 2010) (Fraga et al., 2012), se empleó los primers.

HSP70sen 5' - GACGGTGCCTGCCTACTTCAA - 3' y

HSP70ant 5' - CCGCCCATGCTCTGGTACATC - 3'

La PCR convencional para la amplificación fue realizado en un volumen de reacción de 30 µl, y a las condiciones que se detallan en la tabla 14 y 15

Tabla 14. Descripción de los componentes de la reacción de PCR del Hsp70.

Componente	Concentración/rx
Buffer 10X	1X
MgCl ₂	1,5mM/µL
DNTP Mix (10mM 2.5mM/c.u.)	0,2mM/µL
Primer For (10 µmol/µl)	1µmol/µL
Primer Rev (10 µmol/µ)	1µmol/µL
DMSO	0,25%
Taq ADN polimerasa (5 U/µl)	1,5 U
H ₂ O PCR c.s.p.	
ADN	Variable

Tabla 15. Condiciones de Amplificación de PCR RFLP Hsp70.

Etapas	Ciclos	Denaturación	Hibridización	Extensión
Activación de la polimerasa	1	5 min x 95°C		
Ciclaje	35	40 seg x 94°C	60 seg x 61°C	3 min x 94°C
	1			10 min x 72°C

Los productos amplificados fueron llevados a electroforesis en gel de agarosa al 2%, y visualizados empleando transiluminador de luz azul (Cat MBE-200-BLU, Major Science) , luego sometidos a una digestión empleando las enzimas de restricción *HaeIII* y *RsaI*. (Ana M. Montalvo et al., 2017) (Fraga et al., 2012) Los productos digeridos fueron nuevamente visualizados empleando el procedimiento descrito anteriormente.

La identificación de la especie de *Leishmania* fue realizada por comparación del perfil de bandas específicas de las cepas referenciales OMS de *Leishmania* frente a las procedentes de lancetas.

3.5. Análisis estadístico

En el presente estudio, se asumió como “eficiencia”, a la capacidad del “método molecular-marcador específico” para alcanzar la correcta identificación de la especie de *Leishmania* (Patel, 2021).

Los resultados del PCR-RFLP del Hsp70 y de la PCR (HRM) fueron registradas en una base de datos de Excel (Microsoft Office XP).

El análisis estadístico fue realizado empleando el programa Stata, versión 17, se determinó el coeficiente kappa de Cohen a un el Intervalo de Confianza del 95% entre los resultados de PCR-RFLP y la PCR (HRM) empleando los marcadores kADN, Hsp70 y AAP3-Amp1, considerando a la PCR-RFLP del gen Hsp70 como prueba de referencia en la identificación de las especies de *Leishmania* (Lauthier et al., 2020) (Fraga et al., 2012)

Así mismo, se determinó si existen diferencias estadísticas significativas en la concordancia entre los diferentes marcadores propuestos.

Si el p-valor es mayor que 0,05 entonces se establece que el acuerdo se debe al azar, es decir que las metodologías no concuerdan para dar el mismo diagnóstico. Sin embargo, si el p-valor es menor que 0,05 entonces se establece que el acuerdo se debe a que las metodologías si permiten llegar al mismo diagnóstico o al menos a uno parecido.

IV. RESULTADOS

RNase P

Tabla 16. Frecuencia del RNase P mediante el CT mayor o menor a 36.

CT	Número de muestra	frecuencia	Porcentaje (%)
> 36	17	0,13	13
≤ 36	112	0,86	86,9
Total	129	1,00	100

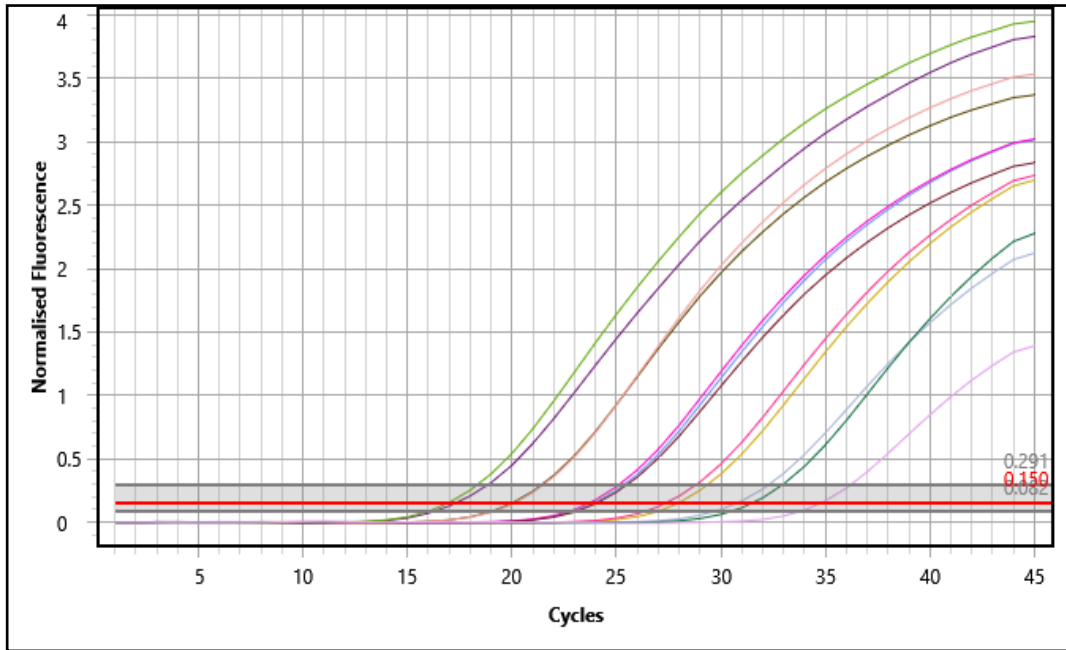
Leyenda

CT: Umbral de ciclos o Cycle threshold

Hsp20

Tabla 17. Estandarización del marcador Hsp20 PCR tiempo real.

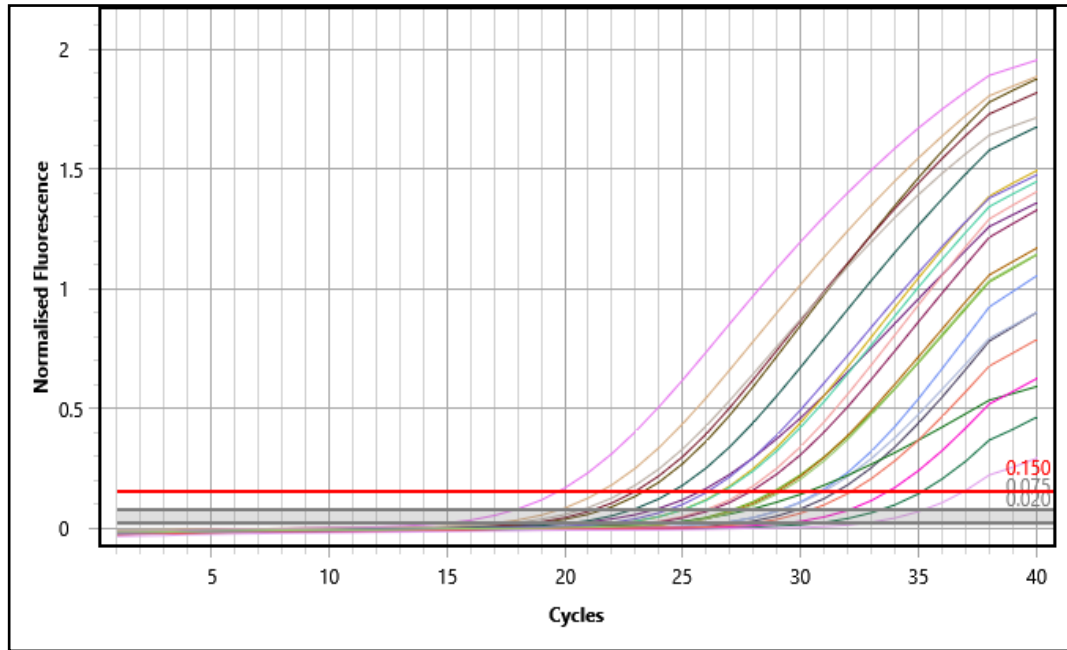
Etapas	Ciclos	Denaturación	Hibridización/Extensión
Activación de la polimerasa	1	5 min x 95 °C	
Pre ciclaje	5	15 seg x 95°C	30 seg x 62°C
Ciclaje	45	15 seg x 95°C	30 seg x 62°C



Leyenda

CT: Umbral de ciclos o Cycle threshold mayor a 0.150

Figura 1. Eficiencia del PCR tiempo real Hsp20 para la detección de *Leishmania*.



Leyenda

CT: Umbral de ciclos o Cycle threshold mayor a 0.150

Figura 2. Eficiencia del PCR tiempo real Hsp20 de cepas de controles con diferentes diluciones.

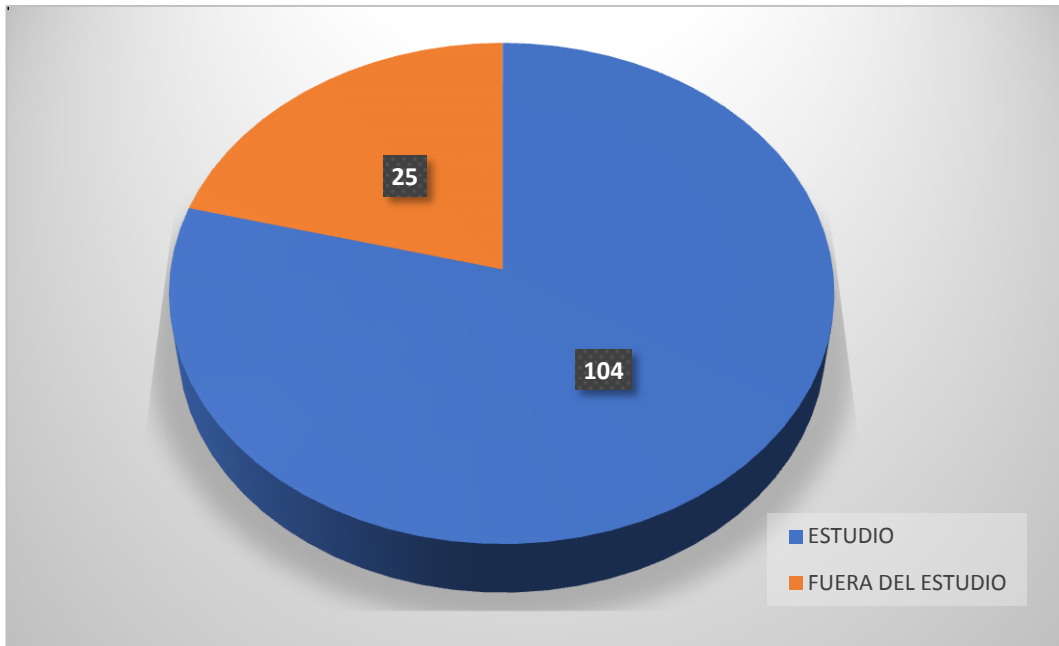
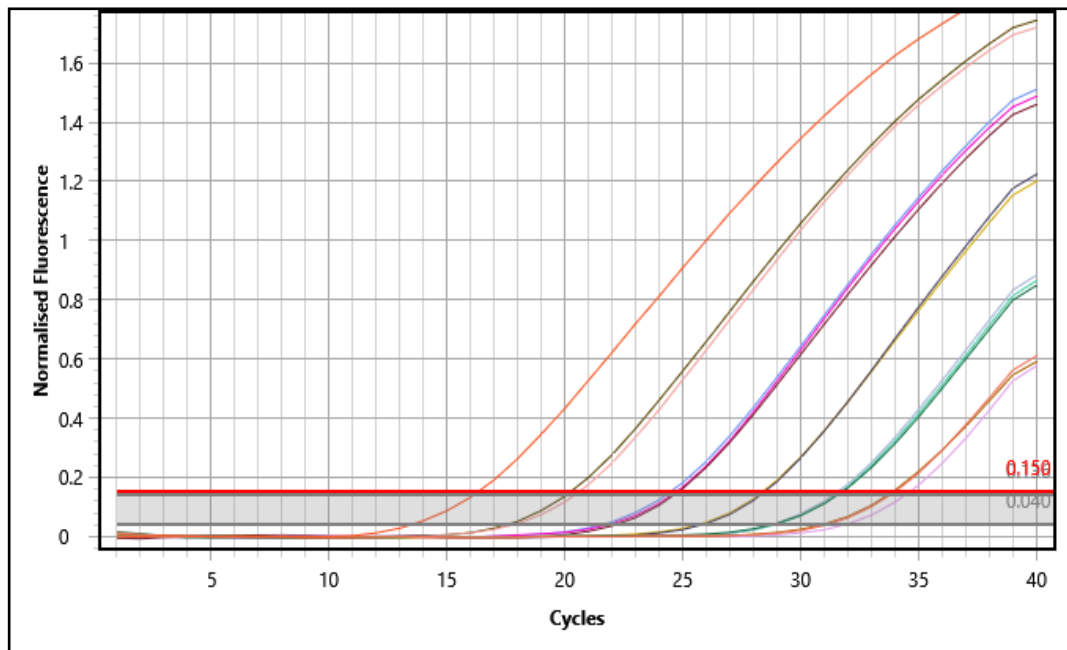


Figura 3. Muestras analizadas con el marcador Hsp20 para la detección de *Leishmania*.

Identificación de especie por PCR tiempo real HRM marcador kADN



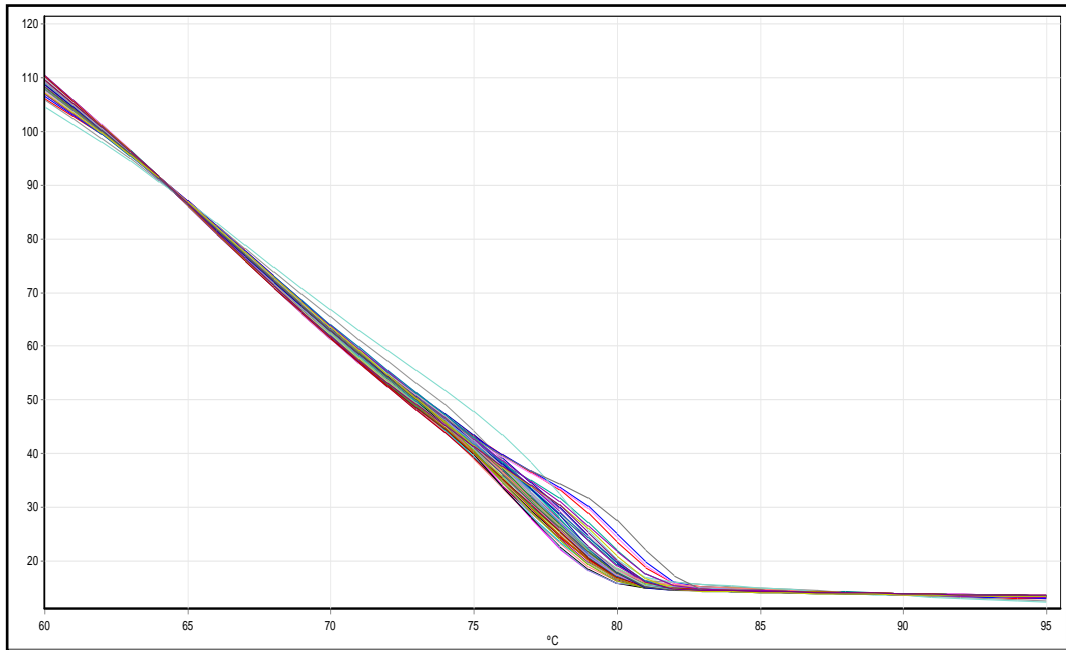
Leyenda

CT: Umbral de ciclos o Cycle threshold mayor a 0.150

Figura 4. Eficiencia del PCR HRM marcador kADN, con diferentes diluciones.

Tabla 18. Especies del género *Leishmania* identificadas con el marcador kADN.

Especie	Número de muestra	frecuencia	Porcentaje (%)
<i>L. braziliensis</i>	73	0,70	70,19
<i>Sin identificacion</i>	8	0,07	7,69
<i>L. guyanensis</i>	7	0,06	6,73
<i>L. panamensis</i>	7	0,06	6,73
<i>L. peruviana</i>	6	0,05	5,76
<i>L. amazonensis</i>	3	0,02	2,88
Total	104	1,00	100,00

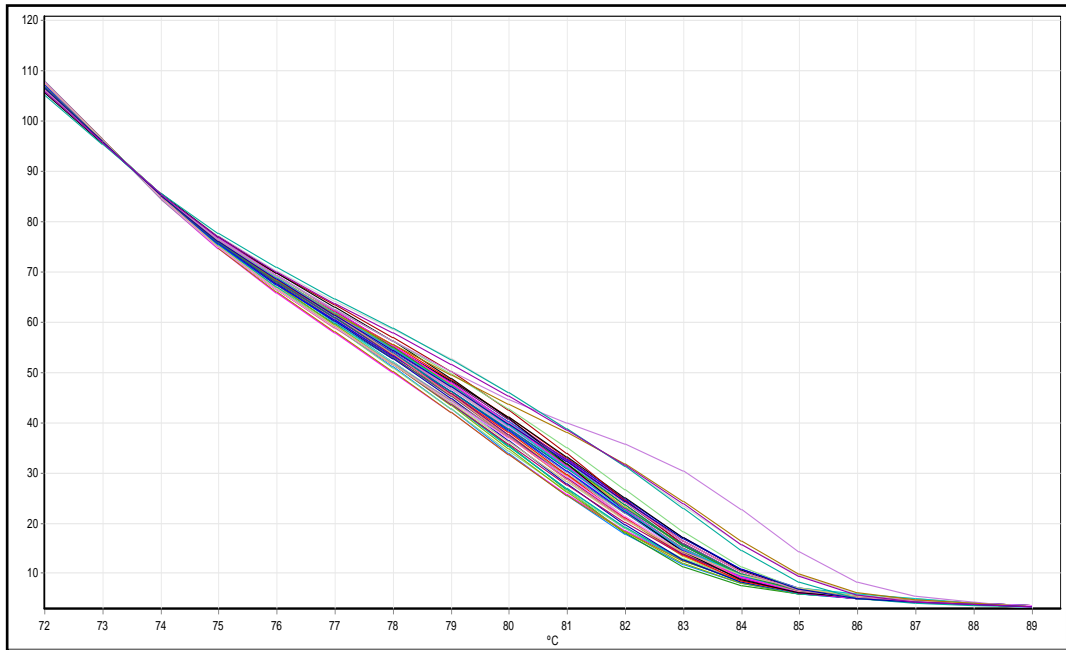


Leyenda

°C: Temperatura grados centígrados

Eje Y: Nivel de fluorescencia

Figura 5. PCR tiempo real HRM de muestras de ADN genómico frente al marcador KADN grupo I.



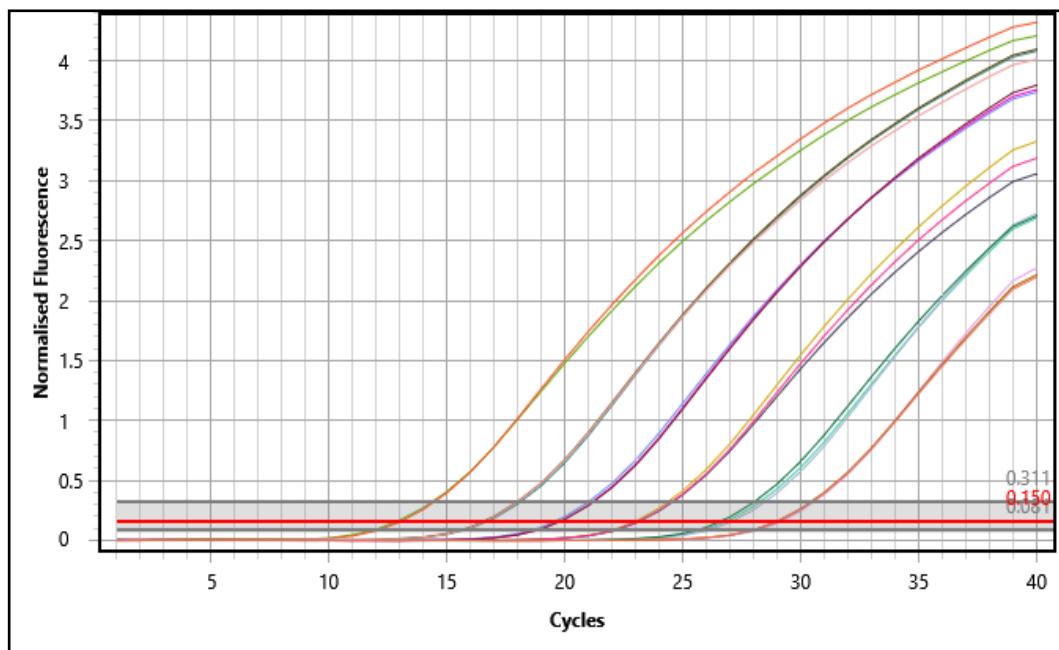
Leyenda

°C: Temperatura grados centígrados

Eje Y: Nivel de fluorescencia

Figura 6. PCR tiempo real HRM de muestras de ADN genómico frente al marcador kADN grupo II.

Marcador AAP3-Amp1



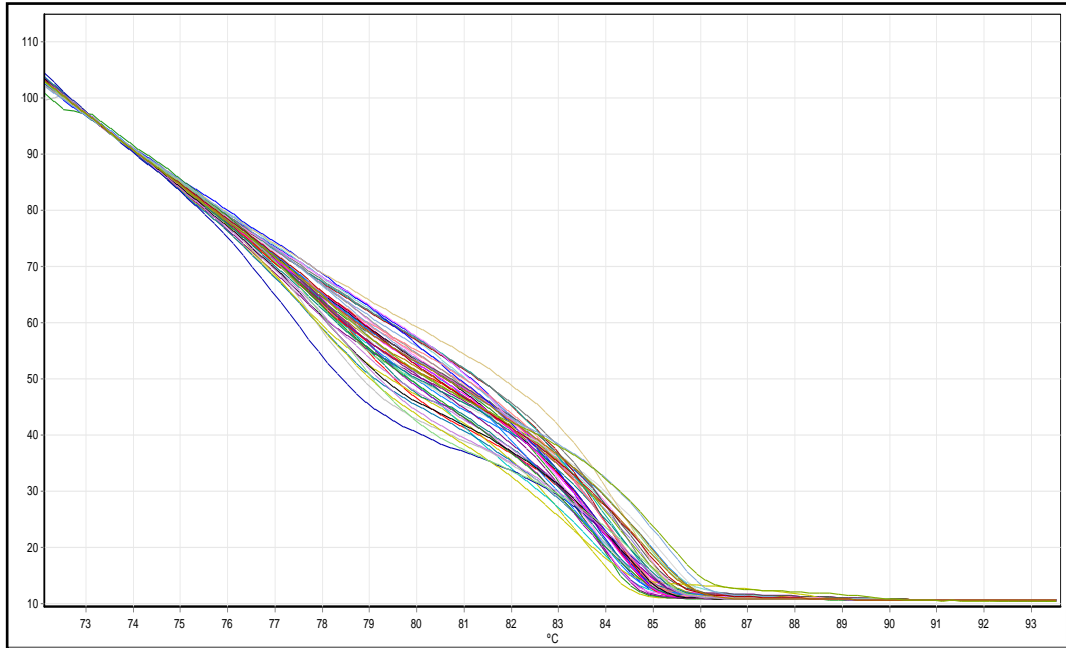
Leyenda

CT: Umbral de ciclos o Cycle threshold mayor a 0.150

Figura 7. Eficiencia del PCR HRM con el marcador AAP3-Amp1, con diferentes diluciones.

Tabla 19. Especies del Género *Leishmania* identificadas con el marcador AAP3- Amp1.

Especie	Número de muestra	Frecuencia	Porcentaje (%)
<i>L. braziliensis</i>	44	0,42	42,3
<i>L. lainsoni</i>	18	0,17	17,3
<i>L. amazonensis</i>	11	0,1	10,57
<i>L. guyanensis</i>	9	0,08	8,65
<i>L. peruviana</i>	8	0,07	7,69
<i>L. panamensis</i>	6	0,57	576
<i>L. donovani</i>	4	0,03	3,84
<i>L. chagasi</i>	3	0,02	2,88
<i>L. infantum</i>	1	0,009	0,96
Total	104	1,00	100,00

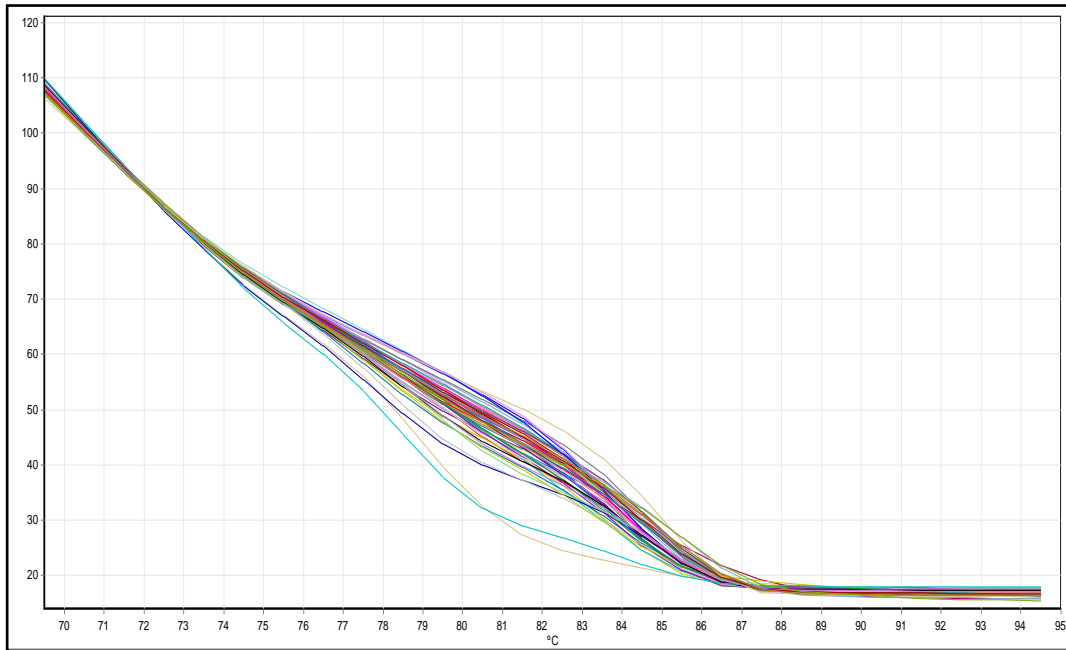


Leyenda

°C: Temperatura grados centígrados

Eje Y: Nivel de fluorescencia

Figura 8. PCR tiempo real HRM de muestras de ADN genómico frente al marcador AAP3- Amp1 grupo I.



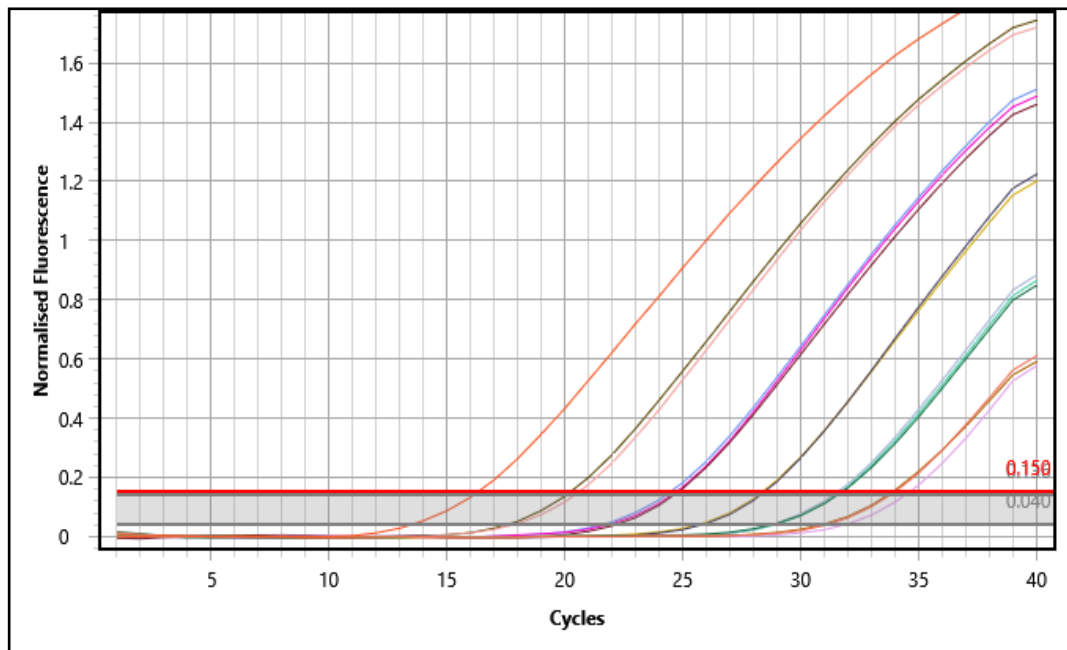
Leyenda

°C: Temperatura grados centígrados

Eje Y: Nivel de fluorescencia

Figura 9. PCR tiempo real HRM de muestras de ADN genómico frente al marcador AAP3- Amp1 grupo II.

Marcador Hsp70



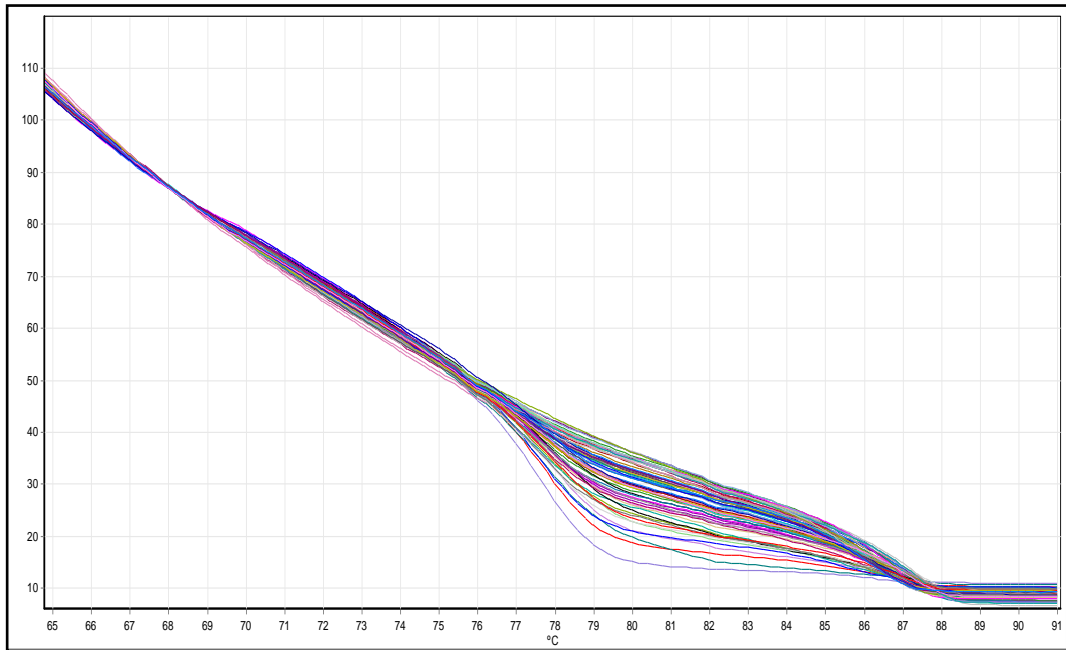
Leyenda

CT: Umbral de ciclos o Cycle threshold mayor a 0.150

Figura 10. Eficiencia del PCR HRM marcador Hsp70, con diferentes diluciones.

Tabla 20. Especies del género *Leishmania* identificadas con el marcador Hsp70.

Especie	Numero de muestra	Frecuencia	Porcentaje (%)
<i>L. lainsoni</i>	20	0,19	19,23
<i>L. guyanensis</i>	17	0,16	16,34
<i>L. braziliensis</i>	15	0,14	14,42
<i>L. peruviana</i>	15	0,14	14,42
<i>L. panamensis</i>	13	0,125	12,5
<i>L. donovani</i>	13	0,125	12,5
<i>L. amazonensis</i>	7	0,06	6,73
<i>L. chagasi</i>	2	0,019	1,92
sin identificar	1	0,009	0,96
<i>L. mexicana</i>	1	0,009	0,96
Total	104	1,00	100,00

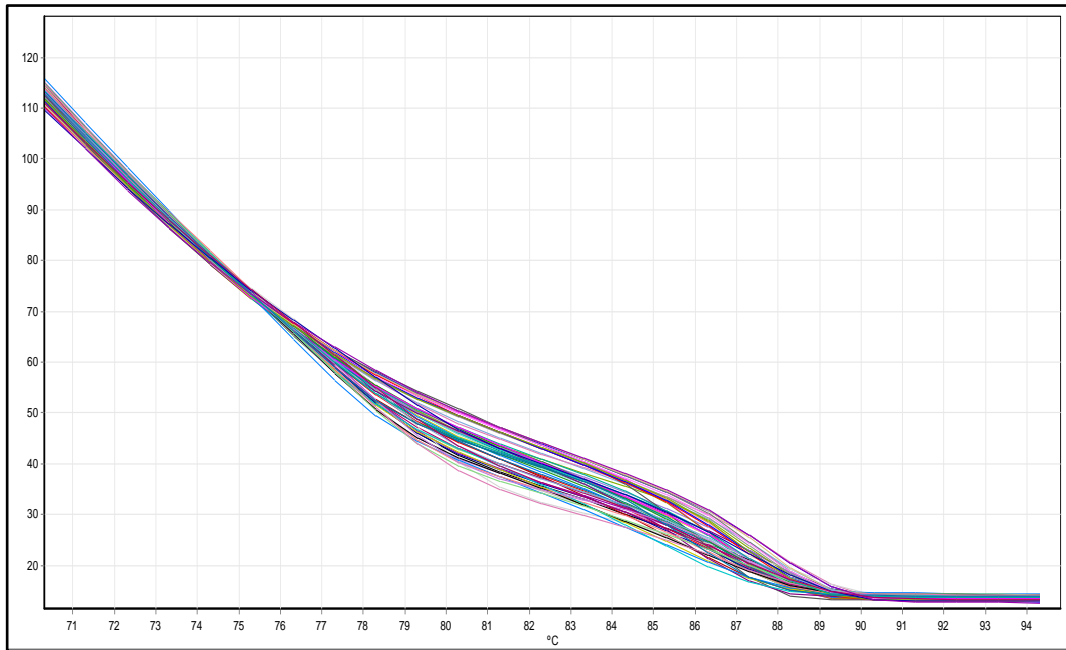


Leyenda

°C: Temperatura grados centígrados

Eje Y: Nivel de fluorescencia

Figura 11. PCR tiempo real HRM de muestras de ADN genómico frente al marcador Hsp70 grupo I.



Leyenda

°C: Temperatura grados centígrados

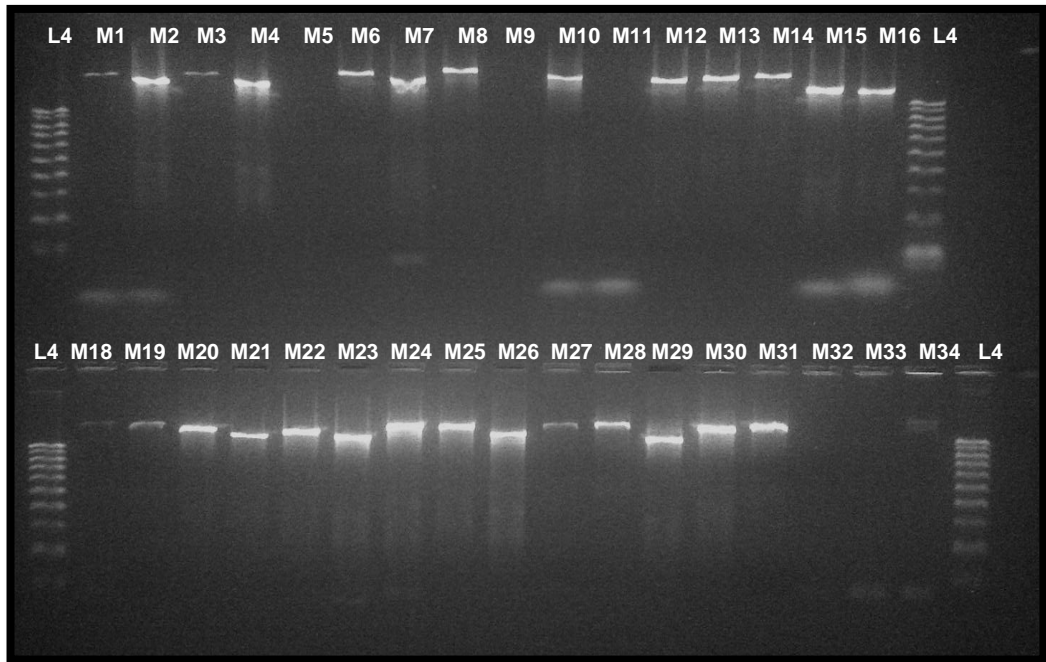
Eje Y: Nivel de fluorescencia

Figura 12. PCR tiempo real HRM de muestras de ADN genómico frente al marcador Hsp70 grupo II.

PCR RFLP Gold Standar

Tabla 21. Especies identificadas mediante la prueba de referencia PCR RFLP-Hsp70.

Especie	Numero de muestra	Frecuencia	Porcentaje (%)
<i>Leishmania(Viannia)</i> <i>braziliensis</i>	31	0,29	29,81
<i>Leishmania(Viannia)</i> <i>guyanensis</i>	20	0,19	19,23
<i>Leishmania(Viannia)</i> <i>peruviana</i>	19	0,18	18,26
No determinado	34	0,33	32,70
Total	104	1,00	100,00



Leyenda

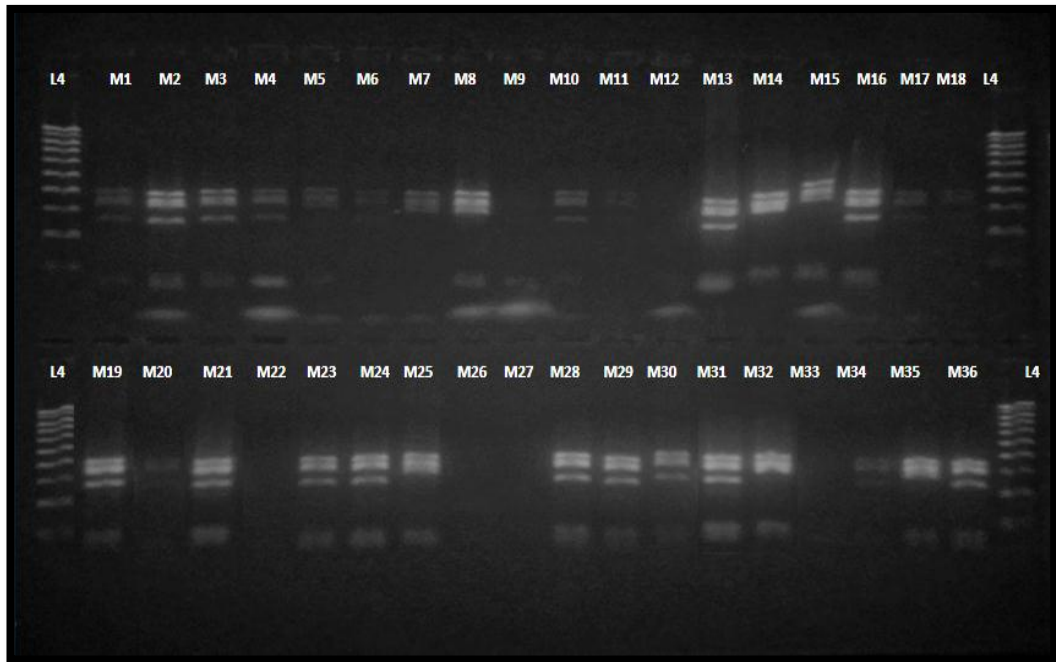
L4: Perfect ADN 100pb Novagen Merck

Loading dye buffer 6x (control)

M1 - M31: Muestras

M32 : Control negativo

Figura 13. PCR RFLP del fragmento del gen Hsp70 para el diagnóstico de *Leishmania* grupo I.



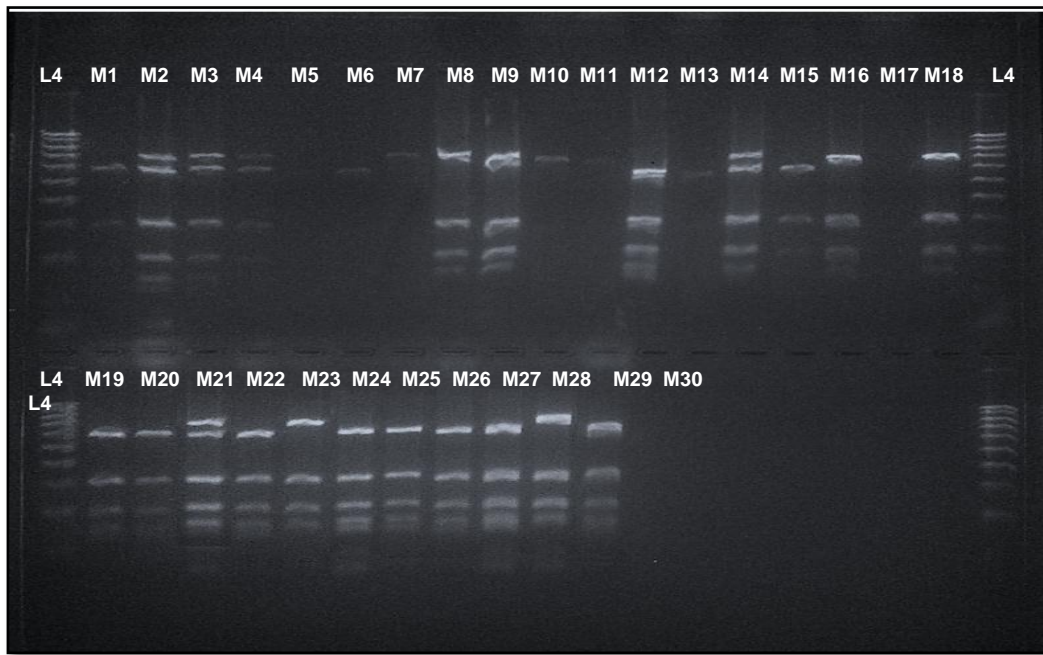
Leyenda

L4: Perfect ADN 100pb Novagen Merck

Loading dye buffer 6x (control)

M33 : Control negativo

Figura 14. PCR-RFLP patrones de amplificación posterior a la digestión con la enzima HaeIII Grupo I.



Leyenda

L4: Perfect ADN 100pb Novagen Merck

Loading dye buffer 6x (control)

M30 : Control negativo

Figura 15. PCR-RFLP patrones de amplificación posterior a la digestión con la enzima RsaI grupo I.

Eficiencia de marcadores

Eficiencia del marcador: Gold Standar PCR RFLP/ kADN

Tabla 22. Gold estándar PCR RFLP frente al marcador KDNA con 70 muestras de estudio.

Marcador	Agreement	Kappa	Intervalo de confianza al 95%	p-valor	N
KDNA	87,14%	0,7445	(0,594 – 0,895)	0,001	70

Eficiencia del marcador: Gold Standar PCR RFLP/ AAP3-Amp1

Tabla 23. Gold standar RFLP PCR frente al marcador AAP3-Amp1 con 70 muestras de estudio.

Marcador	Agreement	Kappa	Intervalo de confianza al 95%	p-valor	N
AAP3-Amp1	8,00%	0,6042	(0,434 – 0,774)	0,001	70

Eficiencia del marcador: Gold Standar PCR RFLP/ Hsp70

Tabla 24. RFLP PCR Gold Standar frente al marcador Hsp70 con 70 muestras de estudio.

Marcador	Agreement	Kappa	Intervalo de confianza al 95%	p-valor	N
Hsp70	61,43%	0,2446	(0,098 – 0,391)	0,001	70

Tabla 25. Índice de kappa de los marcadores empleados en la PCR (HRM) considerando el PCR RFLP como método de referencia.

Especie	Marcador empleado		
	kADN	AAP3	Hsp70
<i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i>	K= 1,00	K=0,445	K=0,072
<i>Leishmania (Viannia) guyanensis</i>	K=0,178	K=0,765	K=0,494
<i>Leishmania. (Viannia) peruviana</i>	K=0,578	K=0,578	K=0,578

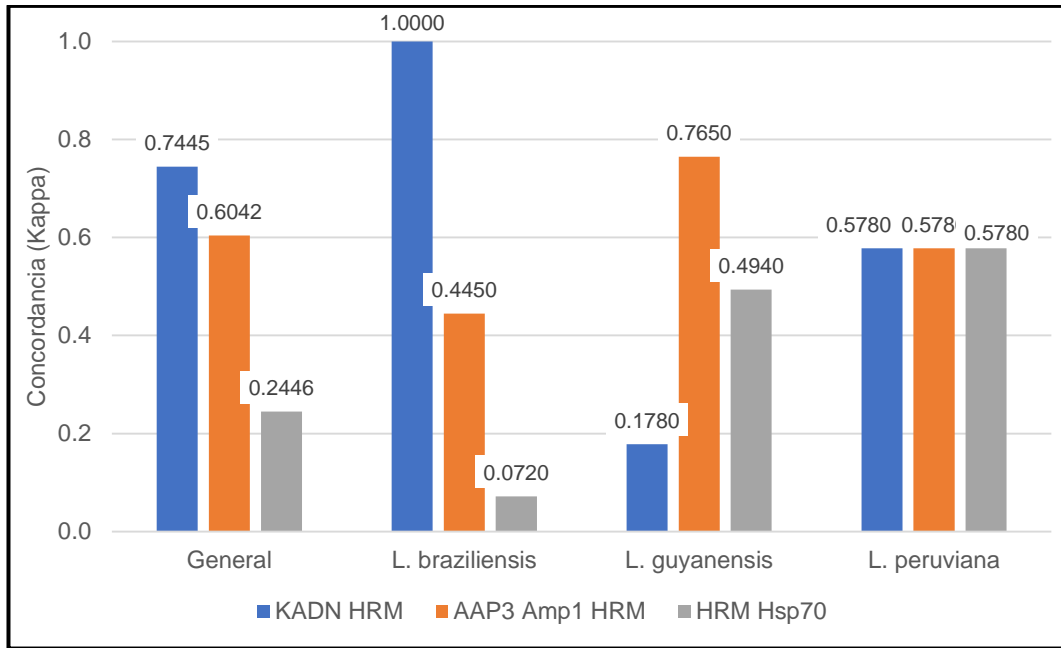


Figura 16. Consolidado del índice de kappa de especies frente a marcador/ Gold Standar PCR RFLP.

Tabla 26. Índice de kappa en la identificación de *Leishmania (Viannia) braziliensis* empleando PCR (HRM).

Marcador empleado en la PCR (HRM)	Kappa (IC95%)	Intervalo de confianza al 95%	N
kADN	1,00	(1,000 – 1,000)	31
AAP3 Amp1	0,445	(0,254 – 0,637)	31
Hsp70	0,072	(-0,080 – 0,224)	31

Tabla 27. Índice de kappa en la identificación de *Leishmania (Viannia) guyanensis* empleando PCR (HRM).

Marcador empleado en la PCR (HRM)	Kappa (IC95%)	Intervalo de Confianza al 95%	N
kADN	0,178	(-0,044 – 0,401)	20
AAP3- Amp1	0,765	(0,627 – 0,902)	20
Hsp70	0,494	(0,363 – 0,624)	20

Tabla 28. Índice de kappa en la identificación de *Leishmania (Viannia) peruviana* empleando PCR (HRM).

Marcador empleado en la PCR(HRM)	Kappa (IC95%)	Intervalo de Confianza al 95%	N
kADN	0,578	(0,394 – 0,762)	19
AAP3-Amp1	0,578	(0,403 – 0,752)	19
Hsp70	0,578	(0,456 – 0,700)	19

Tabla 29. Sensibilidad y Especificidad de los marcadores kADN, AAP3-Amp1, Hsp70.

Parámetro	Marcador (N=70)		
	kADN	AAP3-Amp1	Hsp70
Sensibilidad(IC95%)	75,0%	61,1%	25,0%
Especificidad(IC95%)	100,0%	100,0%	100,0%
ROC (IC95%)	0,88	0,81	0,63

Tabla 30. Sensibilidad, especificidad y curvas ROC a un Intervalo de confianza del 95% de los marcadores KADN, AAP3-Amp1, Hsp70 en la identificación de las especies *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *Leishmania (Viannia) guyanensis* y *Leishmania (Viannia) peruviana*.

	<i>Leishmania braziliensis</i> (N=31)			<i>Leishmania guyanensis</i> (N=20)			<i>Leishmania peruviana</i> (N=19)		
	kADN	AAP3-Amp1	Hsp70	kADN	AAP3-Amp1	Hsp70	kADN	AAP3-Amp1	Hsp70
Marcador	kADN	AAP3-Amp1	Hsp70	kADN	AAP3-Amp1	Hsp70	kADN	AAP3-Amp1	Hsp70
Sensibilidad	100,0%	60,0%	13,0%	14,0%	71,0%	42,0%	50,0%	50,0%	50,0%
Especificidad	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%
ROC	1,00	0,80	0,57	0,57	0,86	0,71	0,75	0,75	0,75

V. DISCUSIÓN

La leishmaniasis es una enfermedad que afecta principalmente a las personas de escasos recursos y que si no es diagnosticada oportunamente puede resultar en lesiones estigmatizantes e incluso la muerte si no es tratada de manera adecuada principalmente mediante el empleo de los antimoniales pentavalentes los cuales son útiles para todas las especies de *Leishmania*.

Por otro lado, a pesar de no contar con un tratamiento específico para las diferentes especies de *Leishmania*, la importancia de la identificación de la especie infectante no sólo se enfoca desde el punto de académico, epidemiológico y distribución, sino además porque puede aportar como valor pronóstico relacionada a la progresión de la enfermedad a formas clínicas más agresivas, así como a la respuesta terapéutica, como ocurre en casos donde *Leishmania (Viannia) braziliensis* y *Leishmania (Leishmania) amazonensis* se encuentra involucrada.

En la tabla 26 del presente estudio, se evaluó la eficiencia de la PCR en tiempo real empleando los marcadores moleculares dirigidos a la región conservada del kADN, Hsp70 y AAP3-Amp1, marcadores ampliamente utilizados en la identificación de *Leishmania spp*, los cuales presentaron una eficiencia en la amplificación de ácidos nucleicos entre $K=0,178$ a $K=1,00$, así mismo empleando ADN procedente de *Leishmania (Viannia) guyanensis*, se determinó como límite de detección para los marcadores kADN, AAP3-Amp1 y Hsp70 de 0,1 parasito/ul los cuales fueron detectados a un Ct de 31,49 , 29,10 y 32,72 respectivamente, en todos los marcadores, tanto la eficiencia de la amplificación de ácidos nucleicos como el límite de detección presentaron una variación estadísticamente no significativa.

De acuerdo a lo reportado por Silva Molina, (2018), el límite de detección y la eficiencia del marcador kADN en la identificación de la especie infectante fue

equivalente a 1 parásito/reacción tanto en el subgénero *Leishmania* (*Viannia*) como en *Leishmania* (*Leishmania*), además de ello, reportó que la eficiencia de identificación fue mayor al 95% a las concentraciones de 5×10^4 a >1 parásito/reacción, en cambio a concentraciones $>5 \times 10^4$ o caso contrario < 1 parásito, la eficiencia en la identificación mediante este marcador fue del 85%. Así mismo, en relación al gen de la proteína de shock térmico de 70kDa (Hsp 70), el límite de detección reportado fue similar al kADN, equivalente a 1 parásito/reacción para ambas especies, en este marcador presento una eficiencia en la identificación de las especies de *Leishmania* $>95\%$ a las concentraciones entre 2×10^4 y 2×10^3 , mientras que a las concentraciones de 2×10^5 y 2×10^2 la eficiencia reportada fue $>85\%$, por el contrario, este marcador no logró la identificación en muestras que presentaron una concentración del parásito menores a 20 parásitos/reacción.

En la tabla 18, se logró la identificación de las 104 muestras de ADN genómico amplificadas con el marcador kADN, 5 especies de *Leishmania*, *Leishmania* fueron identificados mediante PCR tiempo real HRM, se determinó que empleando este marcador el aproximadamente el 70% corresponde a *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis*, 7% a *Leishmania* (*Viannia*) *panamensis*, al igual que 7% para *Leishmania* (*Viannia*) *guyanensis*, 6% para *Leishmania* (*Viannia*) *peruviana*, mientras que con un porcentaje menor se identificó a la especie de *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* en alrededor del 3% del total de muestras, por el contrario, no se logró la identificación de aproximadamente 8% de las muestras evaluadas.

En la tabla 19 en cambio, empleando el marcador AAP3-Amp1, fueron identificado 9 especies de *Leishmania*, de los cuales, *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* fue encontrado en aproximadamente el 42% de total de las muestras, seguido por *Leishmania* (*Viannia*) *lainsoni* en el 17%, *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* en 11%, *Leishmania* (*Viannia*) *guyanensis* en 9%, *Leishmania* (*Viannia*) *peruviana* en ser a 8%, mientras que las especies de *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi*, *Leishmania* (*Leishmania*) *donovani* y *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum* en un porcentaje menor al 4%. Los estudios realizados por Erik Müller et al. (2018) nos señala que la secuencia de codificación para AAP3 presenta dos copias y organizada en tándem en la mayoría de las *Leishmania* spp sin embargo la especie de *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* presenta solo una copia de este gen, el autor evalúa tres amplicones de AAP3,

en lo que el amplicón 1 conduce a una identificación errónea de *L. (L.) mexicana* y *L. (L.) braziliensis* por la cantidad inicial de concentración de ADN pues se ha evidenciado casos en los cuales la concentración de ADN de la plantilla inicial influya en la Tm (temperatura de fusión) de algunas de las especies, el amplicón 1 pudo distinguir las especies *L. visceral* *L. donovani* y la *L. infantum*, cepas cutáneas de Eurasia y África *L. major* y *L. tropica*, y cepas cutáneas y mucocutáneas de las Américas *L. (L.) amazonensis*, *L. (L.) mexicana*, cepas del subgénero *L. (Viannia)*: *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) braziliensis*.

En la tabla 20 mediante el marcador Hsp70 fueron identificadas 9 especies de *Leishmania* de los cuales *Leishmania (Viannia) lainsoni* fue encontrado en aproximadamente 19 % del total de las muestras, seguido por *Leishmania (Viannia) guyanensis* en 16%, *Leishmania (Viannia) peruviana* 14%, *Leishmania (Leishmania) donovani* aproximadamente 13%, *Leishmania (Viannia) panamensis* 13%, en *Leishmania (Leishmania) amazonensis* 7%, en *Leishmania (Leishmania) chagasi* aproximadamente 2% y *Leishmania (Leishmania) mexicana* 1%, por el contrario, no se logró la identificación de aproximadamente 1% de las muestras evaluadas

En la figura 5, 6, 8, 9 11 y 12 se observa perfiles diferentes por la presencia de cepas de ADN genómico referencial y muestras genómicas de ADN posicionadas en cada perfil que se asemejan en cuestión de grupos de especies analizadas mediante PCR tiempo HRM por cada marcador.

En el trabajo desarrollado por Hernández et al. (2014) empleando los marcadores ITS 1 y HSP70 reportan que utilizando ambos marcadores en un algoritmo establecido permite la identificación de las principales especies que circulan en América, en tanto que el marcador Hsp70 permite la diferenciación eficiente de especies como *Leishmania (Leishmania) mexicana* de otras cercanas como *Leishmania (Leishmania) amazonensis* y *Leishmania (Leishmania) infantum*, de igual forma *Leishmania (Viannia) panamensis* de las especies estrechamente relacionadas como *Leishmania (Viannia) braziliensis* y *Leishmania (Viannia) guyanensis*, resultados que son comparables a lo encontrado por (Silva, 2018) y el presente estudio.

Mientras que Folgueira Fernández, (2006) nos señala que el locus Hsp70 se encuentra conservado en el género *Leishmania*, se ha demostrado la existencia de genes del tipo HSP70-I y HSP70-II en todas las especies estudiadas, con la excepción de *L. braziliensis* donde solamente se ha podido probar la existencia

de genes Hsp70-I. El polimorfismo asociado a la posición de las dianas BamHI en el locus Hsp70, permite distinguir entre las especies del subgénero *Leishmania* localizadas en el Nuevo y el Viejo Mundo Cuando se analizó la expresión de los genes HSP70 en las distintas especies del parásito, también se encontraron diferencias entre aquellas pertenecientes al subgénero *Leishmania* y *L. braziliensis*, poniendo en evidencia la existencia de diferentes mecanismos de regulación entre las especies de *Leishmania*. Así, nuestros datos muestran que los transcritos Hsp70-i de *L. major* y *L. amazonensis* aumentan sus niveles en respuesta al aumento de temperatura.

Por otro lado, para determinar la eficiencia en la identificación de las especies de *Leishmania* a partir de las muestras incluidas en el estudio, se desarrolló la identificación mediante la PCR-RFLP como método de referencia, a partir del cual se evaluó mediante el análisis de concordancia y el índice Kappa, los resultados del método de referencia y los encontrados de los diferentes marcadores utilizados en la PCR (HRM). Recordemos que la valoración del coeficiente de Kappa esta evidenciado mediante escalas expresando cualitativamente la fuerza de concordancia (Cerdeira y Villarreal, 2008).

En la tabla 21 mediante la prueba de referencia se logró la identificación de 70 muestras que representa al 67% del total, siendo las especies identificadas *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *Leishmania (Viannia) peruviana* y *Leishmania (Viannia) guyanensis*, no se logró la identificación en aproximadamente 33% de las muestras debido probablemente a la baja concentración de la carga parasitaria en las muestras.

En la tabla 23 observamos la verificación en la concordancia diagnóstica de Leishmaniasis por PCR RFLP (Gold Standards) y el marcador kDNA, se obtuvo un valor de acuerdo absoluto de 87,14%, correspondiente a un valor Kappa de 0,74 (IC 95%: 0,594 – 0,895); dicho acuerdo mostró ser estadísticamente significativo ($p < 0,001$) donde N es el número de muestra.

En la tabla 24 la concordancia diagnóstica de Leishmaniasis por PCR RFLP (Gold Standards) y el marcador AAP3-Amp1, se obtiene un valor de acuerdo absoluto de 80,00%, correspondiente a un valor Kappa de 0,60 (IC 95%: 0,434 – 0,774); dicho acuerdo mostró ser estadísticamente significativo ($p < 0,001$)

En la tabla 25 con el marcador Hsp70, se obtiene un valor de acuerdo absoluto del 61,43, correspondiente a un valor Kappa de 0,24 (IC 95%: 0,098 – 0,391); dicho acuerdo mostró ser estadísticamente significativo ($p < 0,001$).

En la la tabla 26 los resultados obtenidos de los diferentes marcadores empleados, la PCR (HRM) empleando el kDNA presenta en general una índice kappa de 1.0 que corresponde a la valorización “Casi perfecto” en la identificación de *Leishmania (Viannia) braziliensis*, además obtuvo una concordancia “moderada” cuando se identificó *Leishmania (Viannia) peruviana*, por el contrario, en *Leishmania (Viannia) guyanensis* la concordancia fue de “insignificante”. En cambio, el marcador AAP3 alcanzó una concordancia “sustancial” con un valor de 0.77 en *Leishmania (Viannia) guyanensis*, en cambio par *Leishmanai (Viannia) braziliensis* como para *Leishmania (Viannia) peruviana* la concordancia fue “moderada”. Finalmente, la concordancia al emplear el marcador Hsp70 en la PCR (HRM) fue “moderada” en *Leishmania (Viannia) guyanensis* y *Leishmania (Viannia) peruviana*, e “insignificante” en *Leishmania (Viannia) braziliensis*. En la figura 16 se observa el consolidado de los datos analizados.

Por el contrario, la investigación realizada por Hernández et al. (2014) determinaron una concordancia “casi perfecta” (índice Kappa = 1,00) entre los resultados obtenidos en el método de referencia PCR-RFLP/MLEE y el algoritmo del PCR (HRM) que emplea en conjunto los marcadores de Hsp70 e ITS-1.

En la tabla 30 se evidencia que empleando los resultados de las 70 muestras obtenidos mediante el método de referencia PCR-RFLP y la PCR (HRM) empleando los marcadores kADN, AAP3-Amp1 y Hsp70 para la identificación de las especies de *Leishmania*, se determinó la sensibilidad, especificidad y área bajo la curva (ROC), encontrando que los tres marcadores presentaron una especificidad del 100%, mientras que la sensibilidad del marcador kADN fue del 75%, y una área bajo la curva de 0,88. El marcador AAP3-Amp1 presentó una sensibilidad del 61% y una curva ROC del 0,81, mientras que el Hsp70 presentó una sensibilidad del 25.0% y una curva ROC del 0.63.

Por el contrario, en la tabla 31, se logró determinar que por especies la sensibilidad del kADN en la identificación de *Leishmania (Viannia) braziliensis* fue del 100%, para *Leishmania (Viannia) guyanensis* fue 14% y 50% para *Leishmania (Viannia) peruviana*.

Empleando el marcador AAP3-Amp1, se encontró una sensibilidad del 60% cuando se identifica *Leishmania (Viannia) braziliensis*, 71% para *Leishmania (Viannia) guyanensis* y 50% en *Leishmania (Viannia) peruviana*. En cambio, para el Hsp70, fue del 13%, 42% y 50% para *Leishmania (Viannia) braziliensis*,

Leishmania (Viannia) guyanensis y *Leishmania (Viannia) peruviana* respectivamente.

En cambio el estudio reportado por Tello Armijos (2021) nos indica en su estudio que los valores de sensibilidad de los distintos tipos de técnicas moleculares son PCR convencional (97,92%), tiempo real PCR (88,77%), n-PCR (84,42%), PCR-RFLP (72,80%) y PCR (HRM) (93,47%), observado que la técnica molecular PCR HRM tiene el mayor porcentaje de sensibilidad.

En ese sentido, considerando los reportes previos donde se evalúan los diferentes marcadores moleculares en la identificación de las diferentes especies de *Leishmania* y los resultados encontrados en el presente estudio, se refuerza el empleo de diferentes marcadores en conjunto de dos o más marcadores con la finalidad de incrementar el grado de concordancia y la sensibilidad del método.

A partir de los resultados del presente estudio, el marcador kADN presentó una mayor eficiencia en la identificación de las diferentes especies de *Leishmania* con una curva ROC del 0.88, seguido por el AAP3-Amp1 que presentó 0.81, Hsp70 que presentó un valor de 0.63, por lo que se sugiere continuar su estudio considerando estos marcadores en un algoritmo como lo desarrollado por (Hernández et al., 2014)

VI. CONCLUSIONES

1. Se logró comparar la eficiencia de la PCR en tiempo real empleando los marcadores kADN, AAP3 Amp1 y Hs70 en la identificación de las diferentes especies de *Leishmania*, empleando muestras de pacientes derivados al Instituto Nacional de Salud, 2021
2. Se determinó la eficiencia de los 3 marcadores kADN, Hsp70 y AAP3-Amp1 en la PCR (HRM) de manera general y por especie.
3. Se determinó que el marcador kADN presenta una mejor eficiencia de manera global y por especies la identificación de *Leishmania (Viannia) braziliensis* fue del 100%, por el contrario, presentó una baja eficiencia al identificar *Leishmania (Viannia) guyanensis*.
4. Se evidenció que, el marcador AAP3-Amp1 presentó una mejor eficiencia en la identificación de *Leishmania (Viannia) guyanensis* en comparación a kADN y Hsp70, pero fue menos eficiente cuando se analizaron muestras de *Leishmania (Viannia) braziliensis*,
5. Los tres marcadores mostraron igual eficiencia frente a la especie *Leishmania (Viannia) peruviana*.

VII. RECOMENDACIONES

1. Se recomienda continuar con el proceso de evaluación y validación del método PCR (HRM) empleando como métodos de referencia la PCR-RFLP del Hsp70 y al secuenciamiento mediante el método de Sanger del gen Citocromo B.
2. Evaluar el empleo de un algoritmo que emplee más de un marcador molecular a fin de incrementar el grado de concordancia y sensibilidad del método en la identificación de las especies de *Leishmania*.
3. Evaluar el método de PCR (HRM) en la identificación de especies de *Leishmania* en regiones de nuestro país a fin de continuar la evaluación en especies como *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, *Leishmania (Viannia) lainsoni*, entre otros.
4. Planificar, proponer y evaluar el método PCR (HRM) en la parte selva de la región de Ayacucho, debido a la limitada información sobre las especies circulantes, así mismo por las evidencias de circulación de *Leishmania (Leishmania) amazonensis*.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Akhoundi, M., Downing, T., Votýpka, J., Kuhls, K., Lukeš, J., Cannet, A., Ravel, C., Marty, P., Delaunay, P., Kasbari, M., Granouillac, B., Gradoni, L., & Sereno, D. (2017). Leishmania infections: Molecular targets and diagnosis. *Molecular Aspects of Medicine*, 57, 1–29. <https://doi.org/10.1016/J.MAM.2016.11.012>
- Armúa-Fernández, M. T., Venzal, J. M., Armúa-Fernández, M. T., & Venzal, J. M. (2019). Leishmaniosis: breve puesta al día. *Veterinaria (Montevideo)*, 55(211), 29–36. <https://doi.org/10.29155/VET.55.211.5>
- Asfaram, S., Fakhar, M., Mirani, N., Derakhshani-niya, M., Valadan, R., Ziaei Hezarjaribi, H., & Emadi, S. N. (2020). HRM–PCR is an accurate and sensitive technique for the diagnosis of cutaneous leishmaniasis as compared with conventional PCR. *Acta Parasitologica*, 65(2), 310–316. <https://doi.org/10.2478/s11686-019-00154-5>
- Boité, M. C., Mauricio, I. L., Miles, M. A., & Cupolillo, E. (2012). New Insights on Taxonomy, Phylogeny and Population Genetics of Leishmania (Viannia) Parasites Based on Multilocus Sequence Analysis. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 6(11), e1888. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PNTD.0001888>
- Botero, D. (2012). *Parasitosis Humana Botero*.
- Calvay-Sánchez, K. D., Rojas-Palomino, N. M., Sandoval-Juarez, A. C., Cisneros-Tarmeño, A., Obregón-Cahuaya, C., & Minaya-Gómez, G. S. (2015). Artículo Original CAPACIDAD INFECTIVA DE PROMASTIGOTES EN FASE ESTACIONARIA DE Leishmania (Viannia) braziliensis y Leishmania. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*, 32(1), 33–40.
- Cerda, J. L., & Villarroel Del, L. P. (2008). *Evaluación de la concordancia inter-observador en investigación pediátrica: Coeficiente de Kappa*.
- Cheriyedath, S. (2018). *Técnica del polimorfismo de largo de fragmento (RFLP) de restricción*. Afsaneh Khetrapal, BSc. [https://www.news-medical.net/life-sciences/Restriction-Fragment-Length-Polymorphism-\(RFLP\)-Technique-\(Spanish\).aspx](https://www.news-medical.net/life-sciences/Restriction-Fragment-Length-Polymorphism-(RFLP)-Technique-(Spanish).aspx)
- Derghal, M., Tebai, A., Balti, G., Souguir-Omrani, H., Chemkhi, J., Rhim, A., Bouattour, A., Guizani, I., M'Ghirbi, Y., & Guerbouj, S. (2022). High-resolution melting analysis identifies reservoir hosts of zoonotic Leishmania parasites in Tunisia. *Parasites & Vectors*, 15(1), 1–15. <https://doi.org/10.1186/s13071-021-05138-x>
- Dorado, G., Besnard, G., Unver, T., & Hernández, P. (2019). Polymerase Chain Reaction (PCR). *Encyclopedia of Biomedical Engineering*, 1–3, 473–492. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.08997-2>
- Empresa, H., Servicios, P., Pedidos, D., Referencias, S., Novedades, C., Fusión, RRHH, Análisis, M. (2015). *High Resolution Melting Analysis | HRM Overview | HRMA Primer Design*. http://www.premierbiosoft.com/tech_notes/high_resolution_melting_analyses.html
- Erik Müller, K., Andrade Zampieri, R., Ide Aoki, J., Marcia Muxel, S., Helge Nerland, A., & Maria Floeter-Winter, L. (2018). *Amino acid permease 3 (aap3) coding sequence as a target for Leishmania identification and diagnosis of leishmaniasis using high resolution melting analysis*. <https://doi.org/10.1186/s13071-018-2989-z>
- Folgueira Fernández, C. (2006). *Los genes HSP70 de Leishmania: importancia de la regulación traduccional y relevancia biológica del gen HSP70-II*. 150.
- Fraga, J., Veland, N., Montalvo, A. M., Praet, N., Boggild, A. K., Valencia, B. M.,

- Arévalo, J., Llanos-Cuentas, A., Dujardin, J. C., & Van der Auwera, G. (2012). Accurate and rapid species typing from cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis lesions of the New World. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 74(2), 142–150. <https://doi.org/10.1016/J.DIAGMICROBIO.2012.06.010>
- Galluzzi, L., Ceccarelli, M., Diotallevi, A., Menotta, M., & Magnani, M. (2018). *Real-time PCR applications for diagnosis of leishmaniasis*. <https://doi.org/10.1186/s13071-018-2859-8>
- Garritano, S., Gemignani, F., Voegelé, C., Nguyen-Dumont, T., Le Calvez-Kelm, F., De Silva, D., Lesueur, F., Landi, S., & Tavitigian, S. V. (2009). Determining the effectiveness of High Resolution Melting analysis for SNP genotyping and mutation scanning at the TP53 locus. *BMC Genetics*, 10. <https://doi.org/10.1186/1471-2156-10-5>
- Hernández, C., Alvarez, C., González, C., Ayala, M. S., León, C. M., & Ramírez, J. D. (2014). Identification of Six New World Leishmania species through the implementation of a High-Resolution Melting (HRM) genotyping assay. *Parasites and Vectors*, 7(1). <https://doi.org/10.1186/s13071-014-0501-y>
- Herrera, G., Hernández, C., Ayala, M. S., Flórez, C., Teherán, A. A., & Ramírez, J. D. (2017). Evaluation of a Multilocus Sequence Typing (MLST) scheme for Leishmania (Viannia) braziliensis and Leishmania (Viannia) panamensis in Colombia. *Parasites & Vectors*, 10(1), 236. <https://doi.org/10.1186/S13071-017-2175-8/FIGURES/5>
- Instituto Nacional de Investigación del Genoma Humano y Pavan, W. (2020). *Fragmentos de restricción de longitud polimórfica (RFLP)*. | NHGRI. <https://www.genome.gov/es/genetics-glossary/Fragmentos-de-restriccion-de-longitud-polimorfica>
- Koarashi, Y., Cáceres, A. G., Saca, F. M. Z., Flores, E. E. P., Trujillo, A. C., Alvares, J. L. A., Yoshimatsu, K., Arikawa, J., Katakura, K., Hashiguchi, Y., & Kato, H. (2016). Identification of causative Leishmania species in Giemsa-stained smears prepared from patients with cutaneous leishmaniasis in Peru using PCR-RFLP. *Acta Tropica*, 158, 83–87. <https://doi.org/10.1016/J.ACTATROPICA.2016.02.024>
- Lauthier, J. J., Ruybal, P., Barroso, P. A., Hashiguchi, Y., Marco, J. D., & Korenaga, M. (2020). Development of a Multilocus sequence typing (MLST) scheme for Pan-Leishmania. *Acta Tropica*, 201, 105189. <https://doi.org/10.1016/J.ACTATROPICA.2019.105189>
- León, C. M., Muñoz, M., Tabares, J. H., Hernandez, C., Florez, C., Ayala, M. S., & Ramírez, J. D. (2018). Analytical Performance of a Loop-Mediated Isothermal Amplification Assay for Leishmania DNA Detection in Sandflies and Direct Smears of Patients with Cutaneous Leishmaniasis. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 98(5), 1325–1331. <https://doi.org/10.4269/AJTMH.17-0808>
- Li, M., Zhou, L., Palais, R. A., & Wittwer, C. T. (2014). *Genotyping Accuracy of High-Resolution DNA Melting Instruments*. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2013.220160>
- Life technologies, & Numbers, C. (2013). PureLink® Genomic DNA Kits For purification of genomic DNA. *PureLink Genomic DNA Kits For Purification of Genomic DNA*, 25, 1–48.
- Lins Jennings, Y., Alcimar Almeida de Souza, A., Aoba Ishikawa, E., Shaw, J., Lainson, R., & Silveira, F. (2014). (No Title). 21. <https://doi.org/10.1051/parasite/2014039>
- Marin, J., Urrea, D., Muskus, C., Echeverry, M. C., Mejía, A. M., & Triana, O. (2017). Curvas de fusión de regiones genómicas específicas: Una

- herramienta prometedor para el diagnóstico y tipificación de las especies causantes de la leishmaniasis cutánea en Colombia. *Biomedica*, 37(4), 1–35. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v37i4.3634>
- Mérida de la Torre, F. J., & Moreno Campoy, E. E. (2015). Manual para Técnico Superior de Laboratorio Clínico y Biomédico. *Angewandte Chemie International Edition*, 6(11), 951–952., 1162.
- Miranda Tomas, Valer Glendi,Rivera Jimi, M. M. (2016). *BIOLOGIA MOLECULAR*.
- Montalvo, A. M., Fraga, J., Monzote, L., Montano, I., De Doncker, S., Dujardin, J. C., & Van Der Auwera, G. (2010). Heat-shock protein 70 PCR-RFLP: A universal simple tool for Leishmania species discrimination in the New and Old World. *Parasitology*, 137(8), 1159–1168. <https://doi.org/10.1017/S0031182010000089>
- Montalvo, Ana M., Fraga, J., Tirado, D., Blandón, G., Alba, A., Van der Auwera, G., Vélez, I. D., & Muskus, C. (2017). Detection and identification of Leishmania spp.: application of two hsp70-based PCR-RFLP protocols to clinical samples from the New World. *Parasitology Research*, 116(7), 1843–1848. <https://doi.org/10.1007/s00436-017-5454-6>
- Montalvo, C. M., Fraga, J., Lianet Monzote, C., García, M., & Fonseca, L. (2012). Diagnóstico de la leishmaniasis: de la observación microscópica del parásito a la detección del ADN Leishmaniasis diagnosis: going from microscopic observation of parasite to DNA detection. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, 64(2), 108–131.
- Montalvo, Fraga, J., Rodríguez, O., Blanco, O., Llanos-Cuentas, A., García, A. L., Valencia, B. M., Muskus, C., Van der Auwera, G., & Requena, J. M. (2014). Detección de Leishmania spp. en base al gen que codifica la proteína HSP20. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 31(4), 635–643. <https://doi.org/10.17843/rpmpesp.2014.314.112>
- Müller, K. E., Zampieri, R. A., Aoki, J. I., Muxel, S. M., Nerland, A. H., & Floeter-Winter, L. M. (2018). Amino acid permease 3 (aap3) coding sequence as a target for Leishmania identification and diagnosis of leishmaniasis using high resolution melting analysis. *Parasites and Vectors*, 11(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/s13071-018-2989-z>
- Organización Panamericana de la Salud OPS/OMS. (2012). <https://www.paho.org/es/temas/leishmaniasis>
- Oscar, D. (1986). *Estructura y evolución de kinetoplástico de Trypanosoma Cruzi ¿ mas ¡ IQ ' ÓB*.
- Patel, P. (2021). Efficacy, Effectiveness, and Efficiency. *Natl J Community Med*, 12(2), 28–34.
- Patrick R. Murray, Ken S. Rosenthal, M. A. P. (2014). *Microbiología médica - Patrick R. Murray, Ken S. Rosenthal, Michael A. Pfaller - Google Libros*. [https://books.google.com.pe/books?hl=es&lr=&id=GOaVDgAAQBAJ&oi=fnd&pg=PP1&dq=6.+Murray,+P.,+Rosenthal,+K.,+%26+Pfaller,+M.+\(2016\).+Microbiología+Médica.+España:+Elsevier.&ots=hRIVJKLYpj&sig=ydceC0TxU_trrP-jmXV3jZCpi40#v=onepage&q&f=false](https://books.google.com.pe/books?hl=es&lr=&id=GOaVDgAAQBAJ&oi=fnd&pg=PP1&dq=6.+Murray,+P.,+Rosenthal,+K.,+%26+Pfaller,+M.+(2016).+Microbiología+Médica.+España:+Elsevier.&ots=hRIVJKLYpj&sig=ydceC0TxU_trrP-jmXV3jZCpi40#v=onepage&q&f=false)
- Pérez-Losada, M., Cabezas, P., Castro-Nallar, E., & Crandall, K. A. (2013). Pathogen typing in the genomics era: MLST and the future of molecular epidemiology. *Infection, Genetics and Evolution*, 16, 38–53. <https://doi.org/10.1016/J.MEEGID.2013.01.009>
- Pourmohammadi, B., Motazedian, M., Hatam, G., Kalantari, M., Habibi, P., & Sarkari, B. (2010). Comparison of Three Methods for Diagnosis of Cutaneous Leishmaniasis. *Iranian Journal of Parasitology*, 5(4), 1.
- Recalde, O. D. S., Brunelli, J. P., Rolon, M. S., De Arias, A. R., Aldama, O., &

- Gómez, C. V. (2019). First Molecular Report of Leishmania (Leishmania) amazonensis and Leishmania (Viannia) guyanensis in Paraguayan Inhabitants Using High-Resolution Melt-PCR. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 101(4), 780–788. <https://doi.org/10.4269/AJTMH.18-0880>
- Rentaría Alcántara, M. (2000). *Breve revisión de los marcadores moleculares*.
- Residente, R. (2019). Medicina del deporte. *Acta Médica Colombiana*, 43(2S), 176. <https://doi.org/10.36104/amc.2018.1400>
- Rojas-Palomino, N. M. (2021). *Universidad Nacional Mayor de San Marcos Facultad de Ciencias Biológicas Unidad de Posgrado Identificación de especies de Leishmania spp aisladas de pacientes procedentes de áreas endémicas mediante análisis de curvas de disociación de los minicírculos de*.
- Salud, M. de. (2000). *Leishmaniasis: Guía de Práctica Clínica.Pdf* (p. 83).
- Sandoval, Capac Yupanqui, J., María, J., Sandoval-Juárez, A., Minaya-Gómez, G., Rojas-Palomino, N., & Cáceres, O. (2020). Identificación de especies de Leishmania en pacientes derivados al Instituto Nacional de Salud del Perú. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica*, 37(1), 87–92. <https://doi.org/10.17843/RPMESP.2020.371.4514>
- Sandoval Juarez, A., Capac Yupanqui, J., María, J., Sandoval-Juárez, A., Minaya-Gómez, G., Rojas-Palomino, N., & Cáceres, O. (2019). IDENTIFICATION OF Leishmania SPECIES IN PATIENTS DERIVED TO THE NATIONAL INSTITUTE OF HEALTH, PERU. *Salud Publica*, 37(1), 87–92. <https://doi.org/10.17843/rpmesp.2020.371.4514>
- Serrato Díaz, A., Flores Rentería, L., Aportela Cortez, J., & Sierra Palacios, E. (2014). *PCR: reacción en cadena de la polimerasa*.
- Silva Molina Juana Iris. (2018a). 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. *BAN. Biblioteca Agrícola Nacional*.
- Silva Molina Juana Iris. (2018b). 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. In *BAN. Biblioteca Agrícola Nacional*. UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA MOLINA.
- Tello Armijos. (2021). *Universidad Central del Ecuador Universidad Central del Ecuador* (Issue Figura 1).
- Tsukayama, P., Lucas, C., & Bacon, D. J. (2009). Typing of four genetic loci discriminates among closely related species of New World Leishmania. *International Journal for Parasitology*, 39(3), 355–362. <https://doi.org/10.1016/J.IJPARA.2008.08.004>
- Van Der Auwera, G., & Dujardin, J.-C. (2015). *Species Typing in Dermal Leishmaniasis*. <https://doi.org/10.1128/CMR.00104-14>
- Van Der Auwera, G., Ravel, C., Verweij, J. J., Bart, A., Schoñian, G., & Felger, I. (2014). Evaluation of four single-locus markers for leishmania species discrimination by sequencing. *Journal of Clinical Microbiology*, 52(4), 1098–1104. https://doi.org/10.1128/JCM.02936-13/SUPPL_FILE/ZJM999093239SO1.PDF
- Veasey, J. V., Zampieri, R. A., Lellis, R. F., Freitas, T. H. P. de, & Winter, L. M. F. (2020). Identification of Leishmania species by high-resolution DNA dissociation in cases of American cutaneous leishmaniasis. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, 95(4), 459–468. <https://doi.org/10.1016/j.abd.2020.02.003>

- Wettersten, N., & Maisel, A. S. (2016). Biomarkers for Heart Failure: An Update for Practitioners of Internal Medicine. *American Journal of Medicine*, 129(6), 560–567. <https://doi.org/10.1016/J.AMJMED.2016.01.013>
- Zampieri, R. A., Laranjeira-Silva, M. F., Muxel, S. M., Stocco De Lima, A. C., Shaw, J. J., & Floeter-Winter, L. M. (2016). *High Resolution Melting Analysis Targeting hsp70 as a Fast and Efficient Method for the Discrimination of Leishmania Species*. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004485>
- Zorrilla, V., Vásquez, G., Espada, L., & Ramírez, P. (2017). Update on tegumentary leishmaniasis and carrion's disease vectors in Peru. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica*, 34(3), 485–496. <https://doi.org/10.17843/rpmesp.2017.343.2398>

ANEXOS

Anexo 1. Numero de Muestras de Lancetas de pacientes derivados al INS del 2010 hasta el 2019.

Categoría	Número de muestra	Frecuencia	Porcentaje (%)
Positivo	129	0,49	49,42
Negativo	88	0,34	33,72
Sin prueba/otro tipo de prueba(IFI,IDRM)	44	0,16	16,85
Total	261	1,00	100,00

Anexo 2. Año de ingreso de muestras de lancetas de pacientes derivados del INS del 2010 hasta el 2019.

Año	Número de muestra	Frecuencia	Porcentaje (%)
2010	39	0,15	14,94
2011	35	0,13	13,41
2012	6	0,02	2,30
2013	55	0,21	21,07
2014	31	0,12	11,88
2015	27	0,10	10,34
2016	24	0,09	9,20
2017	1	0,003	0,38
2018	40	0,15	15,33
2019	3	0,01	1,15
Total	261	1,00	100

Anexo 3. Cuantificación de 129 muestras de ADN para la determinación de concentración y pureza del ADN Comparación de la eficiencia de marcadores moleculares kADN, Hsp70 y AAP3-Amp1, en la identificación de *Leishmania spp.*

260/280	Número de muestra	Frecuencia	Porcentaje (%)
<1,6	8	0,06	6,20
1,6-2	112	0,86	86,82
>2	9	0,06	6,97
total	129	1,00	100

Anexo 4. Categoría de ADN cuantificado por espectrofometría.

Categoría	Número de muestra	Frecuencia	Porcentaje (%)
ADN optimo	81	0,62	62,79
ADN aceptable	31	0,24	24,03
ADN contaminado	17	0,13	13,17
Total	129	1,00	100

Anexo 5. ADN genómico purificados y no purificados de muestras de ADN cuantificados.

	Número de muestra	Frecuencia	Porcentaje (%)
Purificados	17	0,13	13,17
No purificados	112	0,86	86,82
Total	129	1,00	100

Anexo 6. Comparación de muestras de ADN no purificado y ADN purificados.

N°	CODIGO	DNA NO PURIFICADO		DNA PURIFICADO	
		260/280	ng/ μ L	260/281	ng/ μ L
1	14 FNJ 2013	2,310	6,598	1,831	7,697
2	4 LLJ 2010	2,980	10,977	1,861	10,856
3	17 FLJ 2016	2,611	6,959	1,873	5,989
4	49 GBK 2014	5,25	3,735	1,794	8,836
5	7 DMW 2018	2,257	7,191	2,078	5,437
6	47 AAA 2014	2,45	5,027	1,793	7,982
7	35 RNN 2011	2,227	2,487	1,6	7,777
8	22 MEM 2011	1,214	-0,863	2,034	6,09
9	22 CPA 2015	0,625	-0,256	1,922	7,516
10	2 FPG 2014	4,25	-0,863	1,882	4,908
11	13 PGN 2015	1,125	1,067	1,772	7,109
12	33 RRM 2016	1,387	11,103	1,81	9,651
13	27 SGJ 2015	1,563	1,278	1,823	7,268
14	49 ACM 2016	1,453	4,723	1,872	4,434
15	8 ISL 2010	1,250	-1,058	1,795	8,019
16	5 BGL 2013	2,423	3,146	1,86	5,293
17	6 CNA 2018	1,361	4,245	1,992	12,733

Anexo 7. Análisis de identificación PCR tiempo real HRM con el marcador kADN grupo I.

Nº.	Código	Genotipo	Confidence (%)
1	3 STR 2010	<i>L. amazonensis</i>	95,2
2	4 LLJ 2010	<i>L. braziliensis</i>	99,6
3	5 RSR 2010	<i>L. panamensis</i>	99,48
4	6 ESP 2010	<i>L. braziliensis</i>	94,86
5	8 ISL 2010	<i>L. braziliensis</i>	96,51
6	13 GML 2010	<i>L. braziliensis</i>	98,36
7	14 LCL 2010	<i>L. guyanensis</i>	98
8	17 AAI 2010	<i>L. braziliensis</i>	94
9	18 MRJ 2010	<i>L. braziliensis</i>	98,23
10	2 AMT 2011	<i>L. braziliensis</i>	98,55
11	9 TFM 2011	<i>L. braziliensis</i>	98,09
12	14 FVL 2011	<i>L. braziliensis</i>	96,18
13	21 FVH 2011	<i>L. braziliensis</i>	98,6
14	22 MEM 2011	<i>L. braziliensis</i>	98,48
15	35 RNN 2011	<i>L. braziliensis</i>	99,77
16	1PPM 2012	<i>L. braziliensis</i>	97,7
17	5 BBL 2013	<i>L. guyanensis</i>	98,51
18	9 MJM 2013	<i>L. guyanensis</i>	98,89
19	21 QVJ 2013	<i>L. braziliensis</i>	98,88
20	18 RNJ 2013	<i>L. braziliensis</i>	96,02
21	16 GTM 2013	<i>L. braziliensis</i>	99,73
22	14 FNJ 2013	<i>L. braziliensis</i>	99,75
23	11 BBL 2013	<i>L. guyanensis</i>	98,03
24	22 RCN 2013	<i>L. guyanensis</i>	83,58
25	29 MCE 2013	<i>L. peruviana</i>	97,89
26	30 CBM 2013	<i>L. peruviana</i>	99,15
27	31 FTJ 2013	<i>L. braziliensis</i>	99,23
28	32 RDM 2013	<i>L. guyanensis</i>	98,21
29	35 SAA 2013	<i>L. panamensis</i>	99,54
30	36 RGV 2013	<i>L. panamensis</i>	94,67
31	38 PRG 2013	<i>L. braziliensis</i>	99,2
32	40 SFH 2013	<i>L. braziliensis</i>	98,87
33	41 ZGE 2013	<i>L. braziliensis</i>	98,65
34	47 BCA 2013	<i>L. braziliensis</i>	98,98
35	50 FJA 2013	<i>L. mexicana</i>	96,57
36	51 MZJ 2013	<i>L. panamensis</i>	99,83
37	53 SSH 2013	<i>L. mexicana</i>	95,67
38	1EML 2014	<i>L. peruviana</i>	98,43
39	2 FTG 2014	<i>L. braziliensis</i>	98,57
40	6 CQM 2014	<i>L. braziliensis</i>	99,3
41	8 AGJ 2014	<i>L. panamensis</i>	99,57
42	18 PSM 2014	<i>L. braziliensis</i>	94,2
43	19 MY 2014	<i>L. braziliensis</i>	94,9
44	29 SFM 2014	<i>L. peruviana</i>	99,64
45	33 QYA 2014	<i>L. braziliensis</i>	97,26
46	38 ZAM 2014	<i>L. braziliensis</i>	99,56
47	42 VDPO 2014	<i>L. amazonensis</i>	76,85
48	46 RCJ 2014	<i>L. braziliensis</i>	94,19
49	2 GVM 2014	<i>L. peruviana</i>	99,3
50	7 CLJ 2015	<i>L. braziliensis</i>	99,69
51	17 MDS 2015	<i>L. braziliensis</i>	97,79
52	27 SGJ 2015	<i>L. braziliensis</i>	97,11
53	35 LTA 2015	<i>L. braziliensis</i>	97,54
54	36 RGJ 2015	<i>L. braziliensis</i>	97,54
55	cO 2015	<i>L. panamensis</i>	99,41
56	39 BSE 2013	<i>L. panamensis</i>	98,52
57	LCA DIL. 10	<i>L. peruviana</i>	100
58	LCA DIL. 1	<i>L. peruviana</i>	100
61	LS94 DIL. 10	<i>L. panamensis</i>	100
63	M379 DIL. 10	<i>L. mexicana</i>	100
64	M2904 DIL. 10	<i>L. braziliensis</i>	100
66	M2269 DIL.0.1	<i>L. amazonensis</i>	100
68	M1176 DIL.10	<i>L. guyanensis</i>	100

Anexo 8. Análisis de identificación PCR tiempo real HRM con el marcador kADN grupo II.

Nº.	Código	Genotipo	Confidence %
1	11 HGJ 2014	<i>L. braziliensis</i>	99,28
2	14 RHE 2014	<i>L. braziliensis</i>	95,75
3	30 RRM 2014	<i>L. braziliensis</i> 2da población	99,66
4	31 RRM 2014	<i>L. braziliensis</i>	99,72
5	32 RRM 2014	<i>L. braziliensis</i>	98,48
6	35 SQJ 2014	Variation	
7	36 RBA 2014	<i>L. braziliensis</i>	98,19
8	41 VRW 2014	<i>L. braziliensis</i>	93,46
9	47 AAA 2014	Variation	
10	49 GBK 2014	Variation	
11	60 LCA 2014	<i>L. braziliensis</i> 2da población	99,34
12	62 MBB 2014	Variation	
13	3 CDJ 2015	<i>L. braziliensis</i>	97,93
14	12 GBK 2015	Variation	
15	13 PGN 2015	<i>L. braziliensis</i>	92,5
16	14 MMJ 2015	<i>L. braziliensis</i>	99,12
17	18 CSS 2015	<i>L. braziliensis</i>	95,36
18	20 MAW 2015	<i>L. braziliensis</i>	99,48
19	21 MGR 2015	<i>L. braziliensis</i>	99,5
20	22 CPA 2015	<i>L. peruviana</i>	97,71
21	23 GCJ 2015	Variation	
22	25 CGJ 2015	Variation	
23	24 CGJ 2015	Variation	
24	29 VVW 2015	<i>L. braziliensis</i>	98,02
25	30 PRJ 2015	<i>L. braziliensis</i>	91,64
26	37 HMM 2015	<i>L. braziliensis</i>	99,95
27	43 CHE 2015	<i>L. braziliensis</i>	90,25
28	17 FLJ 2016	<i>L. guyanensis</i>	99,49
29	28 BAJ 2016	<i>L. braziliensis</i>	97,17
30	31 JGB 2016	<i>L. braziliensis</i>	94,77
31	33 RRM 2016	<i>L. braziliensis</i>	99,17
32	34 SSL 2016	<i>L. braziliensis</i>	95,12
33	35 SPJ 2016	<i>L. braziliensis</i>	96,4
34	36 SPJ 2016	<i>L. braziliensis</i>	99,55
35	45 VAJ 2016	<i>L. braziliensis</i>	97,89
36	46 MAJ 2016	<i>L. braziliensis</i>	95,81
37	49 ACM 2016	<i>L. braziliensis</i>	93,52
38	51 MCG 2016	<i>L. braziliensis</i>	99,65
39	52 JDCM 2016	<i>L. braziliensis</i>	99,25
40	1 TTY 2018	<i>L. braziliensis</i>	95,73
41	6 CNA 2018	<i>L. braziliensis</i>	99,48
42	7 DMW 2018	<i>L. braziliensis</i>	98,86
43	8 NJV 2018	<i>L. braziliensis</i>	97,45
44	9 NJV 2018	<i>L. braziliensis</i>	98,92
45	10 ORA 2018	<i>L. braziliensis</i>	92,05
46	LCA 10	<i>L. peruviana</i>	100
50	M379 10	<i>L. mexicana</i>	100
51	M2904 10	<i>L. braziliensis</i>	100
53	M2269 0.1	<i>L. amazonensis</i>	100
55	m1176	<i>L. guyanensis</i>	98,91
57	<i>L. braziliensis</i> 2da poblacion	<i>L. braziliensis</i> 2da población	100
58	M 1176	<i>L. guyanensis</i>	100

Anexo 9. Análisis de identificación PCR tiempo real HRM con el marcador AAP3- Amp1 grupo I.

Nº	Código	Genotipo	Confidence %
1	3 STR 2010	<i>L. donovani</i>	90,9
2	4 LLJ 2010	<i>L. braziliensis</i>	94,02
3	5 RS 2010	<i>L. panamensis</i>	95,37
4	6 ESP 2010	<i>L. braziliensis</i>	91,68
5	8 ISL 2010	<i>L. braziliensis</i>	93,68
6	13 GML 2010	<i>L. braziliensis</i>	96,29
7	14 LCL 2010	<i>L. guyanensis</i>	97,29
8	17 AAI 2010	<i>L. braziliensis</i>	93,11
9	18 MRJ 2010	<i>L. braziliensis</i>	91,39
10	2 AMT 2011	<i>L. braziliensis</i>	94,09
11	9 TFM 2011	<i>L. braziliensis</i>	95,1
12	14 FVL 2011	<i>L. braziliensis</i>	96,1
13	21 FVM 2011	<i>L. braziliensis</i>	93,7
14	22 MEM 2011	<i>L. braziliensis</i>	95,1
15	35 RNN 2011	<i>L. braziliensis</i>	93,8
16	1PPM 2012	<i>L. braziliensis</i>	92,01
17	5 BGL 2013	<i>L. chagasi</i>	91,9
18	9 MJM 2013	<i>L. chagasi</i>	90
19	21 QVJ 2013	<i>L. braziliensis</i>	94,23
20	18 RNJ 2013	<i>L. braziliensis</i>	98,23
21	16 GTM 2013	<i>L. braziliensis</i>	94,89
22	14 FNJ 2013	<i>L. braziliensis</i>	92,05
23	11 BBL 2013	<i>L. guyanensis</i>	95,01
24	22 RCN 2013	<i>L. peruviana</i>	94,78
25	29 MCE 2013	<i>L. infantum</i>	93,41
26	30 CM 2013	<i>L. peruviana</i>	95,73
27	31 FTJ 2013	<i>L. braziliensis</i>	93,9
28	32 RDM 2013	<i>L. guyanensis</i>	95,55
29	35 SAA 2013	<i>L. panamensis</i>	92,95
30	36 RGV 2013	<i>L. panamensis</i>	91,2
31	38 PRG 2013	<i>L. braziliensis</i>	96,69
32	40 SFH 2013	<i>L. braziliensis</i>	96,8
33	41 ZGE 2013	<i>L. braziliensis</i>	92,79
34	47 BCA 2013	<i>L. braziliensis</i>	92,9
35	50 FJA 2013	<i>L. donovani</i>	94,78
36	51 MZJ 2013	<i>L. panamensis</i>	92,26
37	53 SSH 2013	<i>L. donovani</i>	90,78
38	1 EML 2014	<i>L. peruviana</i>	96,89
39	2 FPG 2014	<i>L. braziliensis</i>	97,9
40	6 CQM 2014	<i>L. braziliensis</i>	93,01
41	8 AGJ 2014	<i>L. panamensis</i>	95,9
42	18 PSM 2014	<i>L. braziliensis</i>	96,45
43	19 MY 2014	<i>L. braziliensis</i>	91,97
44	29 SFM 2014	<i>L. peruviana</i>	91,7
45	33 QYA 2014	<i>L. braziliensis</i>	93,38
46	38 ZAM 2014	<i>L. braziliensis</i>	94,87
48	46 PCJ 2014	<i>L. braziliensis</i>	91,81
49	2 GVM 2015	<i>L. peruviana</i>	93,78
50	7 CLJ 2015	<i>L. braziliensis</i>	97,89
51	17 MDS 2015	<i>L. braziliensis</i>	96,51
52	27 SGJ 2015	<i>L. braziliensis</i>	90,84
53	35 LTA 2015	<i>L. braziliensis</i>	92,17
54	36 RGJ 2015	<i>L. braziliensis</i>	94,87
55	9 CO 2015	<i>L. panamensis</i>	95,08
56	39 BSE 2013	<i>L. chagasi</i>	90,07
57	15 FGJ 2011	<i>L. braziliensis</i>	97,08
58	19 TFM 2011	<i>L. peruviana</i>	95,7
59	20 FBJ 2011	<i>L. peruviana</i>	90,81
60	LCA DIL 10	<i>L. peruviana</i>	100
65	M2904 DIL 10	<i>L. braziliensis</i>	100
67	M2269 DIL 0.1	<i>L. amazonensis</i>	100
68	BAB DIL 0.1	<i>L. lainsoni</i>	100
69	M1176 DIL 10	<i>L. guyanensis</i>	100

Anexo 10. Análisis de identificación PCR tiempo real HRM con el marcador AAP3- Amp1 grupo II.

Nº.	Código	Genotipo	Confidence %
1	11 HGJ 2014	<i>L. amazonensis</i>	98,31
2	14 RHE 2014	<i>L. guyanensis</i>	98,37
3	30 RRM 2014	<i>L. amazonensis</i>	97,61
4	31 RRM 2014	<i>L. lainsoni</i>	98,71
5	32 RRM 2014	<i>L. amazonensis</i>	99,79
6	35 SQJ 2014	<i>L. guyanensis</i>	99,62
7	36 RBA 2014	<i>L. braziliensis</i>	98,01
8	41 VRW 2014	<i>L. lainsoni</i>	99,66
9	47 AAA 2014	<i>L. lainsoni</i>	99,46
10	49 GBK 2014	<i>L. guyanensis</i>	99,7
11	60 LCA 2014	<i>L. amazonensis</i>	99,54
12	62 MBB 2014	<i>L. amazonensis</i>	98,21
13	3 CDJ 2015	<i>L. peruviana</i>	97,88
14	12 GBK 2015	<i>L. lainsoni</i>	99,16
15	13 PGN 2015	<i>L. amazonensis</i>	97,76
16	14 MMJ 2015	<i>L. lainsoni</i>	99,21
17	18 CSS 2015	<i>L. amazonensis</i>	99,66
18	20 MAW 2015	<i>L. guyanensis</i>	99,47
19	21 MGR 2015	<i>L. lainsoni</i>	99,63
20	22 CPA 2015	<i>L. lainsoni</i>	99,83
21	23 GCJ 2015	<i>L. lainsoni</i>	99,94
22	24 CGJ 2015	<i>L. lainsoni</i>	99,74
23	25 CGJ 2015	<i>L. lainsoni</i>	99,26
24	29 VVW 2015	<i>L. braziliensis</i>	97,83
25	30 PRJ 2015	<i>L. lainsoni</i>	96,14
26	37 HMM 2015	<i>L. braziliensis</i>	99,12
27	43 CHE 2015	<i>L. amazonensis</i>	99,45
28	17 FLJ 2016	<i>L. braziliensis</i>	99,67
29	28 BAJ 2016	<i>L. braziliensis</i>	97,41
30	31 JGB 2016	<i>L. lainsoni</i>	98,4
31	33 RRM 2016	<i>L. lainsoni</i>	98,74
32	34 SSL 2016	<i>L. lainsoni</i>	99,72
33	35 SPJ 2016	<i>L. lainsoni</i>	99,23
34	36 SPJ 2016	<i>L. braziliensis</i>	99,36
35	45 VAJ 2016	<i>L. amazonensis</i>	98,68
36	46 MAJ 2016	<i>L. amazonensis</i>	99,53
37	49 ACM 2016	<i>L. lainsoni</i>	97,75
38	51 MCG 2016	<i>L. amazonensis</i>	99,53
39	52 JDCM 2016	<i>L. guyanensis</i>	99,4
40	1 TTY 2018	<i>L. guyanensis</i>	99,33
41	6 CNA 2018	<i>L. braziliensis</i>	99,06
42	7 DMW 2018	<i>L. lainsoni</i>	99,89
43	8 NJV 2018	<i>L. braziliensis</i>	98,92
44	9 NJV 2018	<i>L. braziliensis</i>	96,89
45	10 ORA 2018	<i>L. lainsoni</i>	99,14
46	LCA 10	<i>L. peruviana</i>	100
48	LS94 10	<i>L. lainsoni</i>	99,65
50	M2904 10	<i>L. braziliensis</i>	100
52	M2269 0.1	<i>L. amazonensis</i>	100
53	BAB	<i>L. lainsoni</i>	100
54	M1176 10	<i>L. guyanensis</i>	100


Anexo 11. Análisis de identificación PCR tiempo real HRM con el marcador Hsp70 grupo I.

Nº.	Código	Genotipo	Confidence %
1	3 STR 2010	<i>L. peruviana</i>	80,78
2	4 LLJ 2010	<i>L. amazonensis</i>	98,9
3	5 RS 2010	<i>L. donovani</i>	95,51
4	6 ESP 2010	<i>L. amazonensis</i>	98,55
5	8 ISL 2010	<i>L. braziliensis</i>	96,98
6	13 GML 2010	<i>L. guyanensis</i>	99,36
7	14 LCL 2010	<i>L. braziliensis</i>	96,13
8	17 AAI 2010	<i>L. guyanensis</i>	98,59
9	18 MRJ 2010	<i>L. panamensis</i>	98,24
10	2 AMT 2010	<i>L. peruviana</i>	96,81
11	9 TFM 2010	<i>L. braziliensis</i>	97,12
12	14 FVL 2010	<i>L. guyanensis</i>	97,01
13	21 FVH 2010	<i>L. panamensis</i>	97,68
14	22 MEML 2010	<i>L. braziliensis</i>	98,47
15	35 RNN 2010	<i>L. donovani</i>	94,68
16	1 PPM 2012	<i>L. guyanensis</i>	96,86
17	5 BGL 2013	<i>L. peruviana</i>	71,62
18	9 HJM 2013	<i>L. braziliensis</i>	88,03
19	21 QVJ 2013	<i>L. donovani</i>	93,36
20	18 RNJ 2013	<i>L. donovani</i>	97,18
21	16 GTM 2013	<i>L. lainsoni</i>	99,3
22	14 FNJ 2013	<i>L. peruviana</i>	98,31
23	11 BBL2013	<i>L. peruviana</i>	95,56
24	22 RCN 2013	<i>L. donovani</i>	97,59
25	29 MCE 2013	<i>L. amazonensis</i>	99,1
26	30 CM 2013	<i>L. peruviana</i>	96,24
27	31 FTJ 2013	<i>L. donovani</i>	93,36
28	32 RDM 2013	<i>L. guyanensis</i>	99,46
29	35 SAA 2013	<i>L. donovani</i>	88,96
30	36 RGV 2013	<i>L. amazonensis</i>	98,98
31	38 PRG 2013	<i>L. guyanensis</i>	98,8
32	40 SFH 2013	<i>L. lainsoni</i>	97,9
33	41 ZGE 2013	<i>L. lainsoni</i>	95,23
34	47 BCA 2013	<i>L. chagasi</i>	98,02
35	50 FJA 2013	<i>L. peruviana</i>	81,42
36	51 MZJ 2013	<i>L. donovani</i>	91,77
37	53 SSH 2013	<i>L. peruviana</i>	82,28
38	1 EML 2014	<i>L. chagasi</i>	97,07
39	2 FPG 2014	<i>L. lainsoni</i>	98,73
40	6 CQM 2014	<i>L. amazonensis</i>	99,45
41	8 AGJ 2014	<i>L. donovani</i>	96,89
42	18 PSM 2014	<i>L. donovani</i>	96,86
43	19 MY 2014	<i>L. braziliensis</i>	95,32
44	29 SFM 2014	<i>L. panamensis</i>	97,01
45	33 QYA 2014	<i>L. lainsoni</i>	97,52
46	38 ZAM 2014	<i>L. amazonensis</i>	95,39
47	42 VDPO 2014	<i>L. lainsoni</i>	94,79
48	46 RCJ 2014	<i>L. lainsoni</i>	94,54
49	2 GVM 2015	<i>L. donovani</i>	97,14
50	7 CLJ 2015	<i>L. donovani</i>	96,73
51	17 MDS 2015	<i>L. donovani</i>	93,15
52	27 SGJ 2015	<i>L. panamensis</i>	97,77
53	35 LTA 2015	<i>L. panamensis</i>	97,58
54	36 RGJ 2015	<i>L. lainsoni</i>	88
55	9 CO 2015	<i>L. donovani</i>	96,57
56	39 BSE 2013	<i>L. panamensis</i>	98,63
57	15 FGJ 2011	<i>L. braziliensis</i>	94,47
58	19 TFM 2011	<i>L. peruviana</i>	97,58
59	20 FBJ 2011	<i>L. peruviana</i>	97,23
60	LCA DIL 10	<i>L. peruviana</i>	100
61	DD8 DIL 10	<i>L. donovani</i>	100
62	LS94 DIL 10	<i>L. panamensis</i>	100
63	LS94 DIL 1	<i>L. peruviana</i>	99,16
64	M 379 DIL 10	<i>L. mexicana</i>	100
65	M2904 DIL 10	<i>L. braziliensis</i>	100
66	IPT 1 DIL 10	<i>L. infantum</i>	100
67	M 2269 DIL 0.1	<i>L. amazonensis</i>	100
68	BAB DIL 0.1	<i>L. lainsoni</i>	100
69	M1176 DIL 10	<i>L. guyanensis</i>	100
70	LV474 DIL 10	<i>L. chagasi</i>	100

Anexo 12. Análisis de identificación PCR tiempo real HRM con el marcador Hsp70 grupo II.

Nº.	Código	Genotipo	Confidence %
1	11 HGJ 2014	<i>L. guyanensis</i>	97,2
2	14 RHE 2014	<i>L. guyanensis</i>	97,94
3	30 RRM 2014	<i>L. lainsoni</i>	96,71
4	31 RRM 2014	<i>L. braziliensi 2da pob</i>	97,95
5	32 RRM 2014	<i>L. guyanensis</i>	96,48
6	35 SQJ 2014	<i>L. braziliensi 2da pob</i>	98,83
7	36 RBA 2014	<i>L. braziliensi 2da pob</i>	98,21
8	41 VRW 2014	<i>L. lainsoni</i>	99,65
9	47 AAA 2014	<i>L. guyanensis</i>	96,59
10	49 GBK 2014	<i>L. lainsoni</i>	91,82
11	60 LCA 2014	<i>L. peruviana</i>	98,17
12	62 MBB 2014	<i>L. lainsoni</i>	95,38
13	3 CDJ 2015	<i>L. lainsoni</i>	96,15
14	12 GBK 2015	<i>L. guyanensis</i>	97,55
15	13 PGN 2015	<i>L. braziliensi 2da pob</i>	98,17
16	14 MMJ 2015	<i>L. braziliensi 2da pob</i>	96,98
17	18 CSS 2015	<i>L. guyanensis</i>	98,78
18	20 MAW 2015	<i>L. peruviana</i>	98,21
19	21 MGR 2015	<i>L. guyanensis</i>	97,7
20	22 CPA 2015	<i>L. guyanensis</i>	95,29
21	23 GCJ 2015	<i>L. lainsoni</i>	95,31
22	24 CGJ 2015	<i>L. guyanensis</i>	98,89
23	25 CGJ 2015	<i>L. lainsoni</i>	98,1
24	29 VVW 2015	<i>L. panamensis</i>	98,15
25	30 PRJ 2015	<i>L. panamensis</i>	97,5
26	37 HMM 2015	<i>L. panamensis</i>	98,21
27	43 CHE 2015	<i>L. panamensis</i>	98,21
28	17 FLJ 2016	<i>L. braziliensis</i>	91,5
29	28 BAJ 2016	<i>L. peruviana</i>	97,56
30	31 JGB 2016	<i>L. lainsoni</i>	98,67
31	33 RRM 2016	<i>L. lainsoni</i>	99,67
32	34 SSL 2016	Variation	
33	35 SPJ 2016	<i>L. lainsoni</i>	99,25
34	36 SPJ 2016	<i>L. panamensis</i>	96,86
35	45 VAJ 2016	<i>L. lainsoni</i>	99,33
36	46 MAJ 2016	<i>L. lainsoni</i>	92,16
37	49 ACM 2016	<i>L. lainsoni</i>	99,36
38	51 MCG 2016	<i>L. peruviana</i>	94,58
39	52 JDCM 2016	<i>L. guyanensis</i>	98,53
40	1 TTY 2018	<i>L. mexicana</i>	96,62
41	6 CNA 2018	<i>L. braziliensi 2da pob</i>	96,49
42	7 DMW 2018	<i>L. braziliensi 2da pob</i>	96,38
43	8 NJV 2018	<i>L. peruviana</i>	95,63
44	9 NJV 2018	<i>L. panamensis</i>	93,6
45	10 ORA 2018	<i>L. lainsoni</i>	98,58
46	LCA	<i>L. peruviana</i>	100
48	LS94	<i>L. panamensis</i>	100
49	LS94 1	Variation	
50	M374	<i>L. mexicana</i>	100
51	M2904	<i>L. braziliensis</i>	100
54	BAB	<i>L. lainsoni</i>	100
55	M1176	<i>L. guyanensis</i>	100
56	LV474	<i>L. guyanensis</i>	93,56
57	L. braziliensis 2da pob	<i>L. braziliensi 2da pob</i>	100
58	41 VRW 2014 REP	<i>L. lainsoni</i>	97,61
59	6 CNA 2018 REP	<i>L. panamensis</i>	97,95

Anexo 13. Autorización del uso del material Biológico para la investigación en el centro Nacional de Salud Pública.

	FORMULARIO	FOR-CNSP-165
	AUTORIZACIÓN DE USO DEL MATERIAL BIOLÓGICO PARA LAS INVESTIGACIONES EN EL CENTRO NACIONAL DE SALUD PÚBLICA.	Edición N° 01

Mediante la presente se autoriza al investigador(a) principal (IP) el uso exclusivo del material biológico en las instalaciones del Centro Nacional de Salud Pública, según protocolo aprobado por el comité de investigación:

Nombre y Apellidos del IP: MAYRA MARISOL MALDONADO ARONI

Unidad o Laboratorio: Laboratorio de Leishmaniasis

Título de la investigación: Tesis de pregrado "Comparación de la eficiencia de los marcadores moleculares empleados en la identificación de *Leishmania spp* mediante análisis de las curvas de disociación, a partir de muestras de pacientes derivados al Instituto Nacional de Salud 2021"

Código AGISNET: OT-040-21

Periodo de ejecución (Fecha de inicio y fin de la investigación): febrero- septiembre 2022

El material biológico objeto de la presente investigación corresponde a las siguientes muestras:

Material biológico impregnadas en lancetas

Las cuales fueron obtenidas a partir de: (marcar según corresponda)

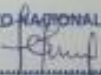
Vigilancia () Proyecto de Investigación () Brote () Control de Calidad ()

Especificar: obtenido en el marco del diagnóstico para Leishmaniasis.


Para uso exclusivo en el protocolo de investigación mencionado, con el compromiso de garantizar la confidencialidad de la información obtenida a partir de las mismas y asegurar la aplicación de las medidas de bioseguridad para reducir el riesgo de exposición y de biocustodia para evitar el uso indebido del material biológico.


Esta autorización entrará en vigencia a partir de la aprobación del protocolo mediante Resolución Directoral de la Oficina General de Investigación y Transferencia Tecnológica.

Lima, 24 de enero del 2022



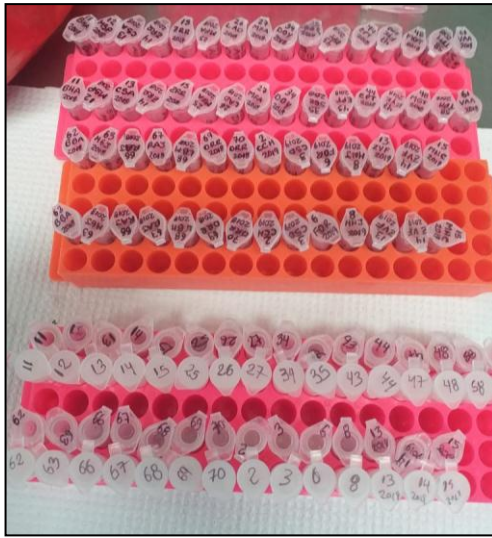
INSTITUTO NACIONAL DE SALUD
Med. Cruj. Luis Fernando Domínguez Izciano
Director General
Firma y Sello
Director General del CNSP



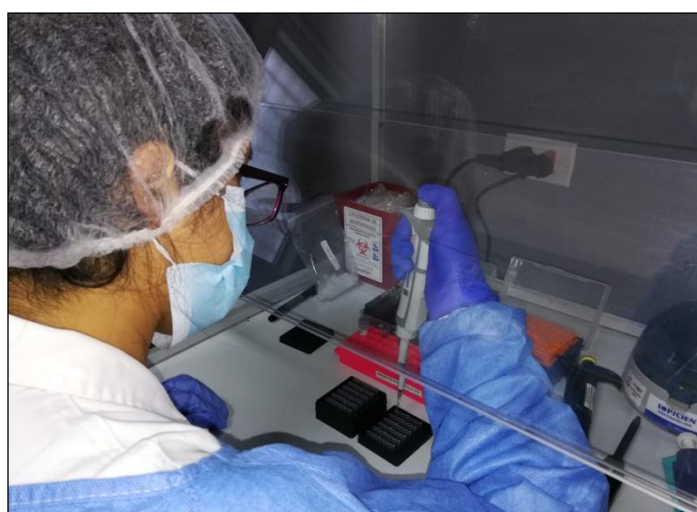
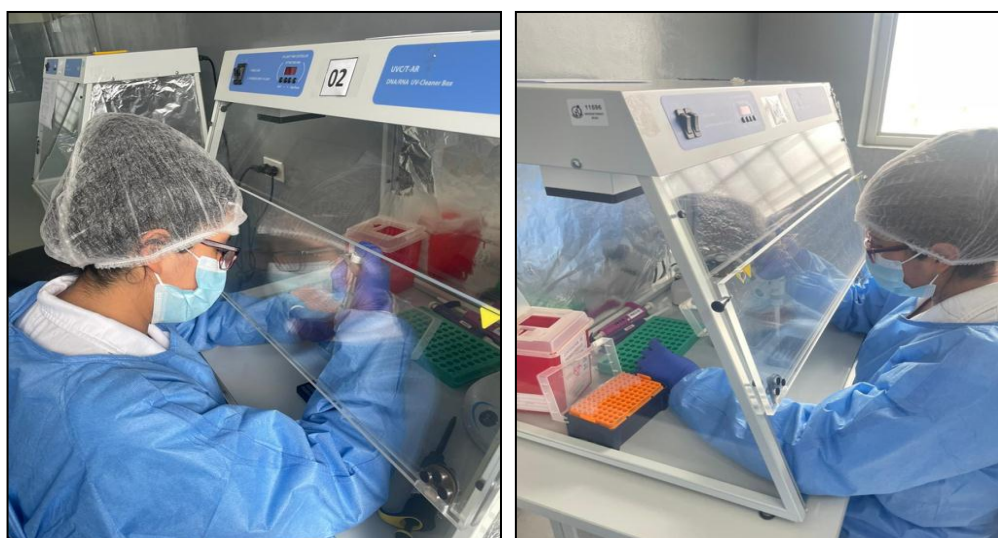


Firma
Investigador Principal

Anexo 14. Criviales y criobox con ADN genómico extraídos de lancetas.



Anexo 15. Proceso de preparación del Master mix para PCR tiempo real.



Anexo 16. Carga de los tubos al termociclador y programación para su amplificación en PCR tiempo real.



Anexo 17. Lectura de los resultados de amplificación de PCR tiempo real HRM.



Anexo 18. Características de la microcentrífuga.

Microcentrífugas	
Thermo Scientific	
RCF máx.	21890 x g
Refrigerado	sí
Anchura exterior (métrico)	58cm

Leyenda:

g: gravedad

Anexo 19. Matriz de consistencia.

PROBLEMA	OBJETIVOS	VARIABLES	MARCO TEÓRICO	METODOLOGÍA
<p>Problema general ¿La identificación eficiente de <i>Leishmania spp</i> se logra independientemente del marcador empleado?</p>	<p>Objetivo general Comparar la eficiencia de marcadores moleculares dirigidos a la región conservada del kADN Hsp70 y AAP3-Amp1, en la identificación de <i>Leishmania spp</i> mediante análisis de las curvas de disociación (HRM), a partir de muestras de pacientes derivados al Instituto Nacional de Salud, 2021</p> <p>Objetivo específico a. Determinar la eficiencia de marcadores moleculares dirigidos a la región conservada del kADN, Hsp70 y AAP3-Amp1, en la identificación de <i>Leishmania spp</i> b. Determinar el marcador molecular funcional en la identificación de las especies de <i>Leishmania</i> empleando análisis de las curvas de disociación.</p>	<p>Variable Independiente Especies de <i>Leishmania</i>. Marcadores moleculares (Región conservada del kADN Hsp70, AAP3)</p> <p>Variable Dependiente Curvas de disociación Límite de detección</p>	<p>a. Enfermedades metaxénica b. Leishmaniasis c. Método diagnóstico laboratorio d. Método para la identificación de <i>Leishmania</i> e. Marcadores nucleares f. Marcadores mitocondriales</p>	<p>Tipo de investigación Descriptivo</p> <p>Población: La población en estudio estuvo conformada por las 261 muestras contenidas en lancetas preservadas en alcohol 70% procedentes de pacientes que acudieron al Instituto Nacional de Salud en marco del diagnóstico especializado de la Leishmaniasis entre 2010-2019.</p> <p>Muestra La selección y tamaño de las muestras, fueron por conveniencia considerando el resultado confirmatorio de la enfermedad mediante métodos parasitológicos como el Examen Microscópico Directo y/o Cultivo <i>in vitro</i>, en ese sentido, el tamaño de la muestra estuvo conformado por 129 muestras de lancetas.</p>