REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

ESCUELA DE POST-GRADO

MAESTRÍA EN SALUD PÚBLICA

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LOS CASOS DE ENDEMIA DE LEISHMANIOSIS DE LA MICRO RED DE KITENI – LA CONVENCIÓN – CUSCO 2010-2011

TESIS PRESENTADO POR LA BACHILLER:

ELSA GLADYS AGUILAR ANCORI.

PARA OPTAR EL GRADO ACADÉMICO DE

MAGISTER EN SALUD PÚBLICA.

AREQUIPA – PERÚ

2014

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

DEDICATORIA

A Dios: por permitirme tener la fuerza suficiente para seguir adelante.

A mis padres, Valentina y Heráclides, mis hermanos Olivia Lourdes, Walter Heráclides, Katya Valentina y Rommel Ronald, personas maravillosas y llenas de amor, siempre han estado ahí velando por mí, creo que no hay palabras suficientes que pueda expresar todo el cariño y agradecimiento que les tengo.

A mi hijo Fernando por ser la luz de mi existencia, que me inspira, para seguir adelante en la carrera de la vida, sin temor a nuevos retos.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

AGRADECIMIENTO

Siempre es difícil pensar en los agradecimientos, ya que muchas personas han contribuido a que mi sueño se haga realidad y no quisiera obviar a alguno.

En primer lugar quisiera agradecer a la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco, a la Facultad de Ciencias Biológicas por la formación académica y la infraestructura brindada.

A la Dra. Rosa Luz Pacheco Venero por darme la oportunidad y confianza, gracias por abrir mi mente al mundo de la investigación, espero haber merecido esa confianza.

A mis amigos, mi pequeña familia, del Grupo de Investigación de *Leishmania* de la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco.

A los pacientes de la Microred Kiteni, por la confianza depositada en nosotros y el permitirnos tomarles las muestras, al Gerente de esta Microred por las facilidades que siempre nos brindó en los Puestos de Salud de Kiteni, Kepashiato e Ivochote.

Finalmente, esta tesis no habría podido ver la luz sin el apoyo recibido por el proyecto “Control de la leishmaniosis en el Departamento de Cusco, Perú” financiado por la Agencia Española de Cooperación Internacional para el Desarrollo (AECID); con el aval del Convenio Marco de Colaboración entre la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco y la Universidad de La Laguna de Tenerife, España; muchísimas gracias Dr. Basilio Valladares Hernández responsable del proyecto en Iberoamérica.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

“Recordarás algo de lo que leas, bastante de lo que oigas, mucho de lo que veas, y todo lo que hagas”

John Little B.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

RESUMEN

OBJETIVOS

Determinar las especies *Leishmania* por caracterización molecular por la técnica de RFLPs utilizando el gen Hsp70 de los casos endémicos de leishmaniosis de la Micro Red de Kiteni. Determinar las especies de *Leishmania* según el tipo, tiempo de lesión, y tratamiento de leishmaniosis y Determinar las especies de *Leishmania* según el lugar de contagio de la leishmaniosis.

MATERIALES Y MÉTODOS

En la presente investigación se valió de la tecnica de los RFLP, al utilizar la amplificación y posterior digestión del producto de los genes que codifican las proteínas de choque termico de *Leishmania* hsp70 Hae III, de cepas aisladas de pacientes provenientes de los establecimientos de salud de Kiteni, Kepashiato, Kamankiriato e Ivochote de la Microred de Salud de Kiteni, distrito de Echarate, provincia de La Convención, departamento de Cusco, para lo cual se utilizó el DNA de cepas de referencia correspondiente a *Leishmania* (V.) *braziliensis*, *Leishmania* (V.) *peruviana*, *Leishmania* (V.) *guyanensis*, y *Leishmania* (V.) *lainsoni*; los productos de amplificación se revelaron mediante el uso de geles de agarosa al 1.5%. Con ayuda del documentador de geles y el software *Quantity One*, se procedió a determinar el tamaño molecular de los productos de amplificación de cada una de las cepas problema y los patrones utilizados.

RESULTADOS

Se determinaron 3 especies de *Leishmania* de 27 pacientes de la Micro Red de Kiteni: 85.2% *Leishmania (V) braziliensis*, 11.1% *Leishmania (V) guyanensis* y 3.7% *Leishmania (V) lainsoni*, por caracterización molecular por la técnica de RFLPs utilizando el gen Hsp70.

Presentaron lesiones cutáneas 88.9% y lesiones mucosas 11.1%. Lesiones menores de 3 meses presentaron 63%; refieren no haber recibido tratamiento antileishmaniasica 81.5% y provienen del Puesto de Salud de Ivochote 48.2%, del Centro de Salud de Kepashiato y Kiteni 22.2% respectivamente y del Puesto de Salud de Kamankiriato 7.4%.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

El lugar de mayor endemicidad y variabilidad de cepas es la comunidad de Ozonampiato de la jurisdicción del Centro de Salud de Kepashiato, aislándose las cepas de *Leishmania (V) braziliensis*, *Leishmania (V) guyanensis* y *Leishmania (V) lainsoni,* seguida por la comunidad de Ivochote de la jurisdicción del Puesto de Salud de Ivochote.

Palabra clave: Especies de *Leishmania, Leishmania* PCR-RFLP hsp70, Caracterización molecular de *Leishmania*, Endemia de leishmaniosis.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

SUMMARY

OBJECTIVES

Determine *Leishmania* species applying RFLPs molecular technique and the use of gene Hsp70.Results will be obtained from *Leishmania* endemic cases of Kiteni's Health Microred. Determine *Leishmania* species according to the type of lesion, lesion time and treatment of the disease and Determine the *Leishmania* species according to the acquiring place of the Leishmaniasis infection.

MATERIALS AND METHOD

The present research was performed using the RFLP technique. It was used the amplification and posterior digestion of the gene's product, which codify proteins of thermic chock of *Leishmania* hsp70 Hae III. The isolated strains came from patients, who came from health centers of Kiteni, Kepashiato, Kamankiriato and Ivochote . These centers belong to the health microred of Kiteni, which is located in the Echarati district, La convencion province, Department Cusco. This study used DNA from reference strains correspondent to Leishmania (V.) *braziliensis*, *Leishmania* (V.) *peruviana*, *Leishmania* (V.) *guyanensis*, y *Leishmania* (V.) *lainsoni*. The amplification products were revealed through the use of 1.5% agarose gels. The molecular size of the amplification products of the patient strains and reference strains were determined with the help of the documentation gel and the software Quantity One.

RESULTS

Through RFLP molecular characterization and the use of gen Hsp 70, there were found three species of *Leishmania*. The strains were obtained from 27 patients of the kiteni's microred and the results were: 85.2% *Leishmania (V) braziliensis*, 11.1% *Leishmania (V) guyanensis* and 3.7% *Leishmania (V) lainsoni*.

They had skin lesions 88.9% and mucosal lesions 11.1%. Injury under 3 months had 63% refer not received antileishmaniasica treatment 81.5% and are from

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

the Health Post Ivochote 48.2%, of the Health Center Kepashiato and Kiteni 22.2% respectively and Health Post Kamankiriato 7.4%.

The area with higher endemic rate and strain variability was the community of Ozonampiato which belongs to the jurisdiction of the Health center of Kepashiato. From this area were isolated *Leishmania (V) braziliensis*, *Leishmania (V) guyanensis* and *Leishmania (V) lainsoni strains.* This endemic rate was followed by the community of Ivochote which belongs to the jurisdiction of the health center of Ivochote.

Keyword: *Leishmania* species, *Leishmania* PCR-RFLP-hsp70 Molecular characterization of *Leishmania*, Leishmaniasis endemic.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN Pag. 1

CAPITULO UNICO

RESULTADOS

1.1. Características de la población de estudio 4

1.2. Caracterización molecular de las especies patrones de *Leishmania.* 16

1.3. Caracterización molecular de las especies según tipo, tiempo de lesión y tratamiento. 23

1.4. Ubicación geográfica de las especies de *Leishmania* caracterizados por PCR- RFLP Hsp 70 Hae III de pacientes con leishmaniosis de la Micro Red de Kiteni. 33

DISCUSIÓN

2.1. Características de la población de estudio 36

2.2. Caracterización molecular de las especies patrones de *Leishmania.* 42

2.3. Caracterización molecular de las especies según tipo, tiempo de lesión y tratamiento. 45

2.4. Ubicación geográfica de las especies de *Leishmania* caracterizados por PCR- RFLP Hsp 70 Hae III de pacientes con leishmaniosis de la Micro Red de Kiteni. Características de la población de estudio 47

CONCLUSIONES

RECOMENDACIONES

PROPUESTA

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

INTRODUCCIÓN

La leishmaniosis es un conjunto de enfermedades muy diferentes entre sí, producidas por distintas especies de un protozoario perteneciente al género *Leishmania*. Estas enfermedades de evolución crónica se caracterizan por comprometer piel, mucosas y vísceras dependientes de la especie de *Leishmania* causante y de la respuesta inmune del huésped. Entre ellas tienen en común el agente causal (*Leishmania*), el vector (insectos dípteros hematófagos), el reservorio (vertebrados) y el parasitismo de las células del sistema fagocítico mononuclear.

Según la Organización Mundial de la Salud en 2010 (1), la leishmaniosis está considerada dentro de las seis enfermedades infecciosas de mayor importancia a nivel mundial, con una distribución en América, África, Asia, Europa y Oceanía, presentándose en 88 países del mundo, son enfermedades desatendidas, afectan principalmente a las poblaciones que viven en zonas rurales, en condiciones socioeconómicas bajas, viviendas precarias, condiciones ambientales desfavorables, en la mayoría de los casos no cuentan con servicios básicos de salubridad.

La leishmaniosis es considerada como un problema de salud pública en el Perú, debido al aumento en los últimos años del número de casos notificados, elevado costo del tratamiento y las pérdidas económicas que incrementa más la situación de pobreza de los que padecen esta enfermedad. El Departamento de Cusco para el año 2012, presento 940 casos, siendo el primer lugar en la casuística según RENACE 2013 (10).

El parásito *Leishmania,* muestra una considerable diversidad de especies y variación genética, complicando la clasificación taxonómica y la epidemiología. En Perú se ha observado una distribución muy heterogénea del parásito *Leishmania*, donde los ciclos de transmisión de las diferentes especies pueden superponerse y por lo tanto varias especies pueden encontrarse en un mismo foco endémico.

En las investigaciones realizadas por Llanos A *et al* 2008(28) y Sierra *et al* 2001(29), se determinó el fracaso en el tratamiento antimonial para la

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

leishmaniosis cutanea, comparando el tratamiento entre *L.* (V.) *braziliensis* y *L.* (V.) *guyanensis*, donde confirman la necesidad de tipificar las especies infectantes de esta enfermedad.

En estudios moleculares realizados para *Leishmania,* como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), seguida del estudio de los polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP), en los ultimos años ha sido descrita como una herramienta importante, no solo para la identificación, sino para la caracterización de especies de *Leishmania*, en distintas zonas geográficas.

En la presente investigación se utilizo la tecnica de PCR- RFLP para la amplificación y posterior digestión del producto de los genes que codifican las proteínas de choque termico de *Leishmania*: hsp70 de cepas aisladas, de pacientes provenientes de los establecimientos de salud de Kiteni, Kepashiato e Ivochote de la Microred de Salud de Kiteni, Distrito de Echarate, Provincia de La Convención del Departamento de Cusco, identificando las areas endemicas.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

CAPITULO I

RESULTADOS:

1.1. CARACTERÍSTICAS DE LA POBLACIÓN DE ESTUDIO

1.2. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LAS ESPECIES PATRONES DE *Leishmania*.

1.3. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LAS ESPECIES SEGÚN TIPO, TIEMPO DE LESIÓN Y TRATAMIENTO.

1.4. UBICACIÓN GEOGRAFICA DE LAS ESPECIES DE *Leishmania* CARACTERIZADOS POR PCR- RFLP hsp 70 Hae III DE PACIENTES CON LEISHMANIOSIS DE LA MICRO RED DE KITENI.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

1.1. CARACTERÍSTICAS DE LA POBLACIÓN DE ESTUDIO

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

TABLA N°1
DISTRIBUCIÓN DE PACIENTES CON DIAGNOSTICO CLÍNICO LEISHMANIOSIS SEGÚN SEXO Y GRUPO ETAREO

GRUPO ETAREO (Años)	SEXO				TOTAL	
	FEMENINO		MASCULINO			
	N°	%	N°	%	N°	%
1 a 5	3	1.7	5	2.9	8	4.6
6 a 14	10	5.8	17	9.9	27	15.7
15 a 45	27	15.7	59	34.3	86	50.0
46 a mas	11	6.4	40	23.3	51	29.7
TOTAL	51	29.6	121	70.4	172	100.0

FUENTE: Ficha de datos del investigador.

En la tabla N°1, se ha distribuido a los pacientes por grupos etareos clínicamente diagnosticados leishmaniosis, se observa que el grupo etareo de 15 a 45 años de edad, corresponde al 50% de los casos, sin embargo se puede observar que grupo etareo de menores de 15 años representan el 20% de los casos, debido a que son tempranamente incorporados en las actividades laboral como la agricultura, extracción, explotación de madera, hidrocarburos y otros. Por consiguiente se pude decir que la leishmaniosis es una enfermedad de impacto laboral, porque se observa que el sexo masculino es predominante con el 70% de casos clínicamente diagnosticados.

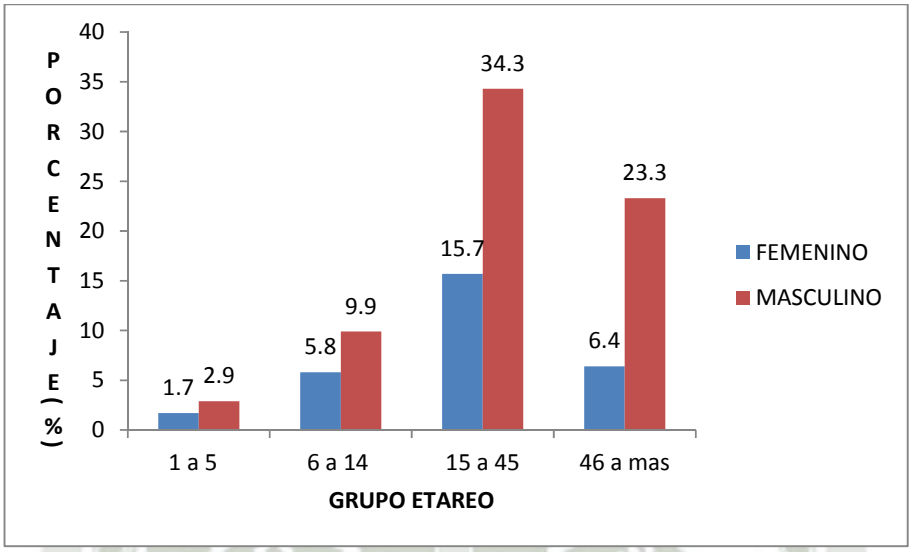
Para que la enfermedad se origine, debe existir varios componentes, primero la presencia del agente causal el parasito de *Leishmania*, en segundo lugar el insecto vector la *Lutzomyia* para la transmisión de la enfermedad, el reservorio mamífero, y los factores ambientales.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

GRAFICO N°1
DISTRIBUCIÓN DE PACIENTES CON DIAGNOSTICO CLÍNICO LEISHMANIOSIS SEGÚN SEXO Y GRUPO ETAREO



FUENTE: Ficha de datos del investigador.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

TABLA N° 2
DISTRIBUCIÓN DE PACIENTES CON DIAGNOSTICO CLÍNICO LEISHMANIOSIS SEGÚN TIPO Y TIEMPO DE LESIÓN

TIEMPO DE LESION (Meses)	TIPO DE LESION				TOTAL	
	CUTANEO		MUCOSA			
	N°	%	N°	%	N°	%
- a 3	70	40.7	12	7.0	82	47. 7
3 a 6	24	14.0	14	8.1	38	22.1
7 a 12	9	5.2	6	3.5	15	8.7
+ a 12	21	12.2	16	9.3	37	21.5
TOTAL	124	72.1	48	27.9	172	100.0

FUENTE: Ficha de datos del investigador.

La variabilidad de las manifestaciones clínicas de leishmaniosis, se debe a la existencia de varias especies de *Leishmania*, y estas manifestaciones clínicas no son características de cada especie, pueden ser variables.

En América, las manifestaciones clínicas más comunes es la leishmaniosis cutánea y la mucocutanea localizadas, diseminadas, difusas y atípicas.

La leishmaniosis cutánea puede aparecer en cualquier parte del cuerpo, generalmente se originan en los puntos de inoculación como una macula, seguida por una pápula, que se ulcera y se extiende para dar origen a una lesión crateriforme redondeada u ovalada como un sacabocado. Estas lesiones pueden aparecer semanas, meses o incluso años después de infección, es indolora por ello pacientes no priorizan su diagnóstico y tratamiento respectivo. Esta fase cutánea se presentó en el 72% que puede considerarse como una fase primaria de la mucocutánea.

En lesiones mucosas que son característicos de la leishmaniosis mucocutanea, pueden causar metástasis en las mucosas de la boca y las vías respiratorias altas como las fosas nasales, paladar blando, laringe y otras. En la tabla N°2 se observa que representa casi el 28% de la casuística reportada.

El tiempo de lesión o evolución de la enfermedad, tiene importancia clínica, observándose lesiones clásicas y/o sobreinfectadas con otros agentes microbianos, lo que define el éxito o fracaso en el diagnostico parasitológico de la enfermedad.

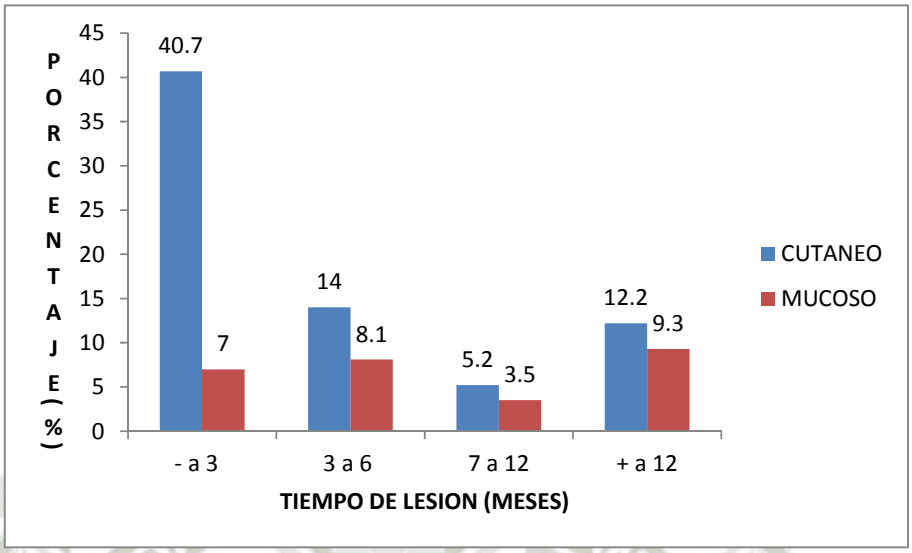
Se puede observar que acuden a los Establecimientos de Salud con lesiones menores de 6 meses con el 70% aproximadamente, En la jurisdicción de la Micro Red de Kiteni, desde hace más de 10 años, el Grupo de Investigación de Leishmania de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad de San Antonio Abad del Cusco, como proyección y extensión universitaria, viene realizando intervenciones de carácter permanente, en el diagnostico parasitológico y molecular de la enfermedad.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

GRAFICO N° 2
DISTRIBUCIÓN DE PACIENTES CON DIAGNOSTICO CLÍNICO LEISHMANIOSIS SEGÚN TIPO Y TIEMPO DE LESIÓN



FUENTE: Ficha de datos del investigador.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

TABLA N°3
UBICACIÓN DE LESIÓN CUTÁNEA Y MUCOSA DE PACIENTES CON DIAGNOSTICO CLÍNICO LEISHMANIOSIS

UBICACIÓN DE LESION	TIPO DE LESION			
	CUTANEO		MUCOSA	
	N°	%	N°	%
Cabeza y cuello	22	17.7		
Tronco	8	6.5		
Miembro superior	39	31.5		
Miembro inferior	55	44.3		
Úvula			21	43.8
Fosas nasales			22	45.8
Paladar			5	10.4
TOTAL	124	100.0	48	100.0

FUENTE: Ficha de datos del investigador.

Las lesiones cutáneas aparecen después de una pequeña lesión inicial, frecuentemente visibles en las partes descubiertas, que posteriormente se traducen a ulceraciones, en la Tabla N°3, se observa que el 75% de estas lesiones se encuentran entre los miembros inferiores y superiores, los pobladores de la zona usan generalmente pantalones cortos y polos, por el tipo de actividades laborales que desempeñan.

La característica de la leishmaniosis mucocutanea son manifestaciones clínicas por metástasis en la mucosa de la boca o vías respiratorias. Las lesiones de las fosas nasales son las predominantes con el 45% con nódulos e infiltraciones del septo cartilaginoso, que muchas veces puede causar la obstrucción del orificio nasal, posteriormente se puede observar la perforación o colapso del septo, produciendo deformaciones como el ensanchamiento de la nariz, produciendo la característica clínica de nariz de tapir.

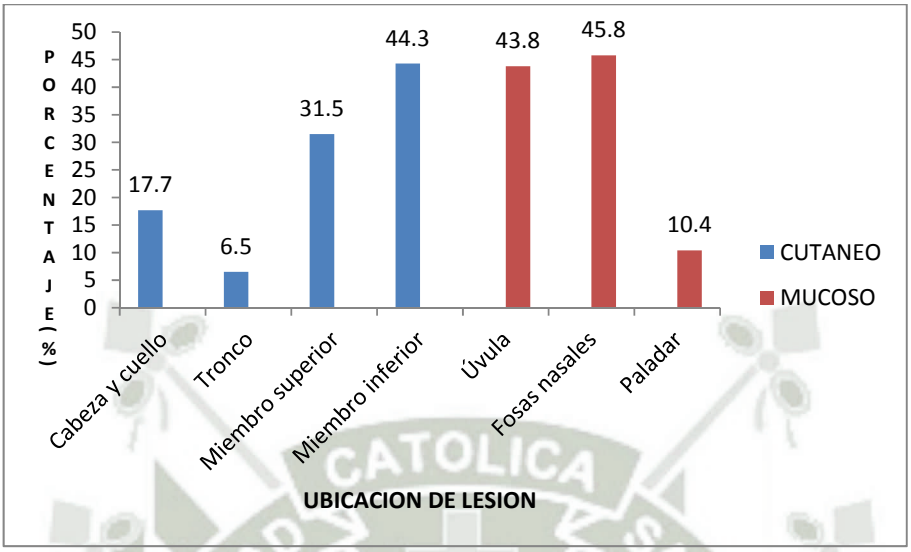
En el caso de las afecciones de la úvula y paladar blando sufren el 43 y 10% respectivamente linfadenopatia, que en casos graves conlleva a la perdida de úvula y destrucción del paladar, situación que puede agravarse y provocar al paciente la muerte por complicaciones como desnutrición y que pueden desencadenas otras patologías como la tuberculosis.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

GRAFICO N°3
UBICACIÓN DE LESIÓN CUTÁNEA Y MUCOSA DE PACIENTES CON DIAGNOSTICO CLÍNICO LEISHMANIOSIS



FUENTE: Ficha de datos del investigador.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

TABLA N° 4
DISTRIBUCION DE PACIENTES CON DIAGNOSTICO CLINICO LEISHMANIOSIS SEGÚN TIPO DE LESION Y TRATAMIENTO

TRATAMIENTO	TIPO DE LESION				TOTAL	
	CUTANEO		MUCOSA			
	N°	%	N°	%	N°	%
Sin tratamiento	96	77.4	25	51.1	121	70.3
Con tratamiento	28	22.6	23	47.9	51	29.7
TOTAL	124	100.0	48	100.0	172	100.0

FUENTE: Ficha de datos del investigador.

El estado peruano se responsabiliza con el tratamiento gratuito para las enfermedades metaxenicas en zonas endémicas, sin embargo no se logra cubrir la demanda de estas, el 70% de los pacientes refieren no haber recibido tratamiento, solo el 30% refiere haber sido beneficiados.

Según la norma técnica “Diagnóstico y tratamiento de la leishmaniosis en el Perú” (30). Como primera línea se administra un antimonial pentavalente tipo estibogluconato de sodio o antimoniato de meglumine a dosis de 20 miligramos de antimonio pentavalente base / kilogramo de peso / día, durante un ciclo de veinte días consecutivos. La dosis diaria máxima no debe exceder los 1,250 miligramos de antimonio pentavalente. Debe administrarse en una sola dosis diaria sin fraccionarla, por vía intravenosa, diluido en suero fisiológico de 20 a 50 ml, lento en 15 a 20 minutos.

Como segunda línea de tratamiento se administrará Anphoterecin-B a dosis de 0.5 mg a 1.0 mg /Kg /día hasta acumular una dosis máxima de 1.5 a 2.0 gramos por el periodo de tratamiento.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

TABLA N° 5
DISTRIBUCION DE PACIENTES CON DIAGNOSTICO CLINICO LEISHMANIOSIS SEGÚN ESTABLECIMIENTO DE SALUD DE ORIGEN

ESTABLECIMIENTO DE SALUD	TIPO DE LESION				TOTAL	
	CUTANEO		MUCOSA			
	N°	%	N°	%	N°	%
C.S. Kiteni	34	27.4	7	14.6	41	23.8
C.S: Kepashiato	32	25.8	17	35.4	49	28.5
P.S. Ivochote	48	38.7	15	31.2	63	36.6
P.S. Kamankiriato	10	8.1	9	18.8	19	11.0
TOTAL	124	100.0	48	100.0	172	100.0

FUENTE: Ficha de datos del investigador.

La DIRESA Cusco, tiene a su cargo 4 Redes de Servicios de Salud, entre ellas se encuentra la Red de Servicios de Salud La Convención, está conformada por seis Micro Redes de Salud: Santa Ana, Maranura, Quellouno, Pucyura, Kamisea y Kiteni; esta última tiene a su cargo 2 Centros de Salud (Kiteni y Kepashiato) con 9 Puestos de Salud (Chontabamba, Kamanquiriato, Materiato, Pachiri, Pangoa, Saniriato, Selva Alegre, Yuveni e Ivochote) (26).

Para realizar el presente estudio se eligieron 4 Establecimientos de Salud de la Micro Red de Kiteni, de los 172 pacientes el 36% proceden de la Jurisdicción del Puesto de Salud de Ivochote, seguida del Centro de Salud de Kepashiato.

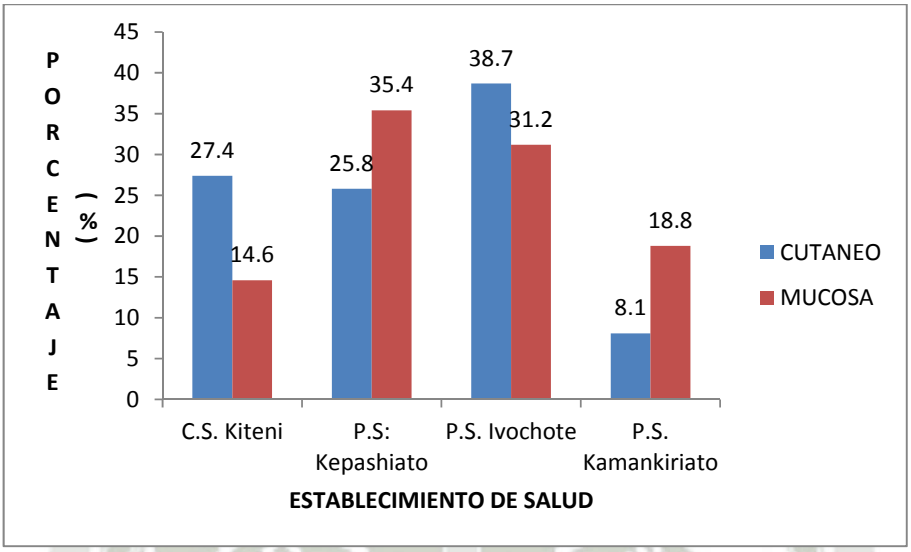
De acuerdo al tipo de lesión, pacientes con lesiones cutáneas el 39% provienen del Puesto de Salud de Ivochote y pacientes con lesiones mucosas, el 35% provienen del Centro de Salud de Kepashiato.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

GRAFICO N° 4
DISTRIBUCION DE PACIENTES CON DIAGNOSTICO CLINICO LEISHMANIOSIS SEGÚN ESTABLECIMIENTO DE SALUD DE ORIGEN



FUENTE: Ficha de datos del investigador.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

TABLA N°6
DIAGNÓSTICO POSITIVO *Leishmania* DE PACIENTES CON DIAGNOSTICO CLÍNICO LEISHMANIOSIS

METODO	TIPO DE LESION				TOTAL	
	CUTANEO		MUCOSA			
	N°	%	N°	%	N°	%
DIRECTO	15	12.1	1	2.1	16	9.3
CULTIVO	24	19.4	3	6.3	27	15.7
PCR	53	42.7	12	25.0	65	37.8

FUENTE: Ficha de datos del investigador.

El diagnóstico por exámenes de laboratorio para *Leishmania*, tiene la finalidad de demostrar que, el paciente alberga al parasito, para evidenciar se utilizó pruebas parasitológicas como el examen directo, usando la coloración Giemsa, para observar la forma amastigotes del parasito, lográndose obtener 9.3% de positividad. Mediante el cultivo se evidencia la forma de promastigote, mediante crecimiento in vitro, en medios de cultivo bifásico como el USAMRU el 15.7% de positividad. La sensibilidad de los métodos parasitológicos, están directamente relacionada con la destreza y habilidad del investigador, para elegir adecuadamente el lugar de toma de muestra de la lesión. Otro factor importante es el tipo de lesión y tiempo de lesión. Los parásitos aislados son de suma importancia para la determinación de especies de *Leishmania*, trabajos de investigación relacionadas con la biología molecular y farmacológica.

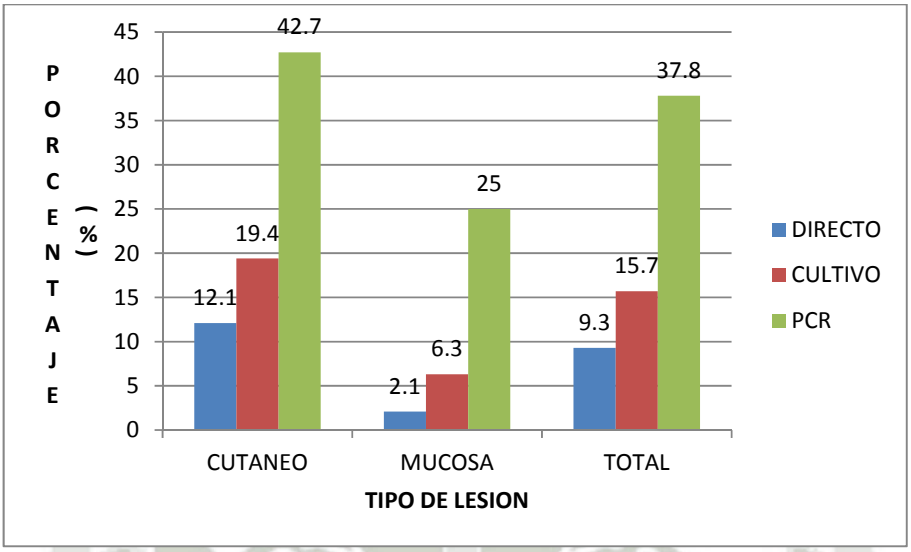
Para un diagnóstico molecular como la PCR, diversas zonas del genoma del parásito de *Leishmania* han sido útiles para el diseño de cebadores, la zona más utilizada para el diagnóstico de la enfermedad ha sido la de DNA del kinetoplasto (kDNA), su sensibilidad es idéntica o superior a la técnica de referencia (cultivo); esta sensibilidad está de acuerdo con la calidad y cantidad de muestra obtenida, respecto al frotis presenta mayor sensibilidad, y tiene la ventaja de tener los resultados de una forma rápida, actualmente esta técnica solo se usa en laboratorios especializados, en el estudio se logró una positividad del 37.8%, se utilizaron los primer para la identificación.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

GRAFICO N°5
DIAGNÓSTICO POSITIVO *Leishmania* DE PACIENTES CON DIAGNOSTICO CLÍNICO LEISHMANIOSIS



FUENTE: Ficha de datos del investigador.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

1.2. CARACTERIZACION MOLECULAR DE LAS ESPECIES PATRON DE ESPECIES DE *Leishmania*

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

TABLA N° 7
PCR-hsp 70: ANÁLISIS DEL PRODUCTO DE AMPLIFICACIÓN DE LAS CEPAS DE *Leishmania* DE REFERENCIA INTERNACIONAL

ESPECIE	CÓDIGO	AMPLIFICACIÓN	CUANTIFICACIÓN
L. (V.) *braziliensis*	M 2903	1431.81 pb	59.51 ηg/μL
L. (V.) *peruviana*	L 677	1441.35 pb	20.69 ηg/μL
L. (L.) *mexicana*	Bel 21	1422.32 pb	24.02 ηg/μL
L. (L.) *chagasi*	PP 75	1422.32 pb	23.67 ηg/μL
L. (V.) *braziliensis*	LQ 2	1394.24 pb	87.33 ηg/μL
L. (V.) *panamensis*	LS 94	1422.32 pb	35.96 ηg/μL
L. (V.) *guyanensis*	M 4147	1412.90 pb	72.72 ηg/μL
L. (V.) *lainsoni*	PAB 2891	1412.90 pb	86.88 ηg/μL

Las cepas patrón de *Leishmania* aisladas, entraron en fase de mantenimiento, en medio USAMRU, el cual consistió en repiques sucesivos cada tres días y mantenidos a una temperatura constante de 24 ºC, para obtener una población de 10^7 parásitos de *Leishmania* por mL. La cosecha de los parásitos se realizó a los 9 días de su crecimiento en masa y se procedió a la extracción del DNA, metodología descrita en el perfil en el apartado de Materiales y Métodos.

El DNA obtenido se resuspendió en 20 μL de agua ultra pura, se incubó en baño maría a 40ºC por un tiempo de 1 hora. La cuantificación de la concentración de DNA en ηg/μL, se realizó con el equipo espectrofotómetro - Nanodrop 2000c (Thermo).

Las reacciones de PCR-hsp70 se realizaron en el termociclador Perkin Elmer *Gene Amp PCR System 2400*. Las condiciones de amplificación fueron: 5 minutos a 94 ºC, 33 ciclos de: 30 segundos a 94 ºC, 1 minuto a 63 ºC, 1 minuto a 72 ºC finalizando con 5 minutos a 72 ºC.

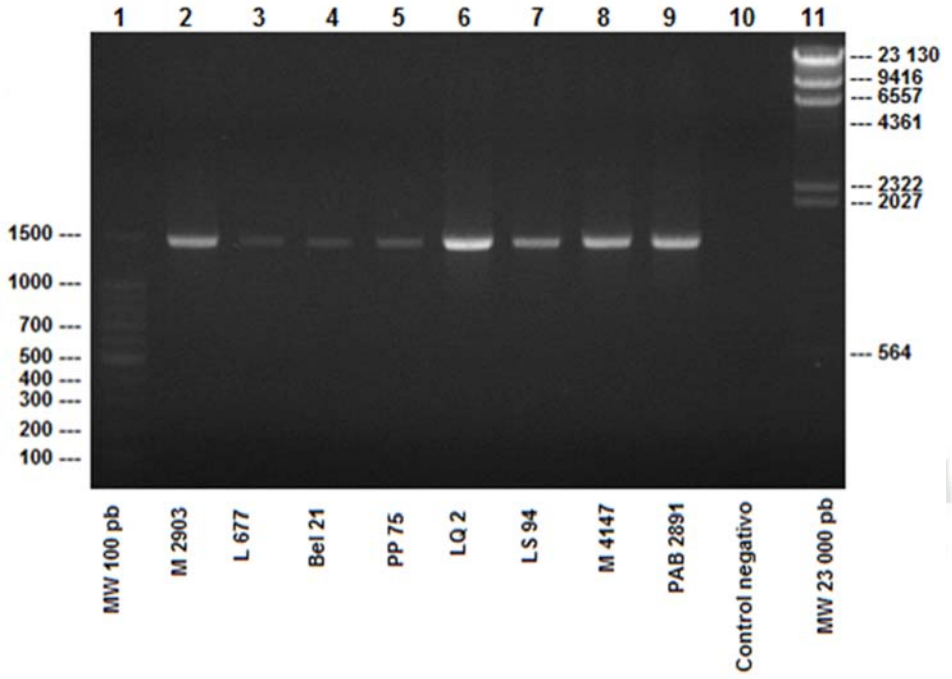
El producto de amplificación esperado fue de 1443 pb, según Montalvo AM (23) y para su visualización utilizamos geles de agarosa al 1%, añadiendo 0.5μg/mL de bromuro de etidio a la agarosa fundida, una vez que alcanzó una temperatura de 60 ºC. La preparación de la muestra consistió en mezclar 2 μL del producto de la amplificación, 8 μL de agua para electroforesis y 2 μL de tampón de carga 6X (Promega).

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

FOTOGRAFÍA N°1
PRODUCTO DE AMPLIFICACIÓN DE LA PCR-hsp70 DE LAS CEPAS DE *Leishmania* DE REFERENCIA INTERNACIONAL



PCR-hsp70. Carril 1: Estándar de 100 pb (Promega), Carril 2: L. (V.) braziliensis M2903, Carril 3: L. (V.) peruviana L677, Carril 4: L. (L.) mexicana Bel 21, Carril 5: L. (L.) chagasi PP 75, Carril 6: L. (V.) braziliensis LQ2, Carril 7: L. (V.) panamensis LS94, Carril 8: L. (V.) guyanensis M 4147, Carril 9: L. (V.) lainsoni PAB 2891, Carril 10: Control negativo, Carril 11: Estándar de 23 000 pb (Roche).

Fuente: Datos obtenidos con el Software *Quantity One*.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

TABLA N° 8
PRODUCTO DE AMPLIFICACIÓN DE PCR- RFLP hsp 70 Hae III DELAS CEPAS DE *Leishmania* DE REFERENCIA INTERNACIONAL

Código	M 2903	L 677	Bel 21	PP 75	LQ 2	LS 94	M 4147	PAB 2891
Especie	*L.* (V.) *braziliensis*	*L.* (V.) *peruviana*	*L.* (L.) *mexicana*	*L.* (L.) *Chagasi*	*L.* (V.) *braziliensis*	*L.* (V.) *panamensis*	*L.* (V.) *guyanesis*	*L.* (V.) *Lainsoni*
Fragmentos de restricción (pb)	329.02	334.04	340.99	341.07	339.83	338.57	340.16	337.33
	311.30	315.74	316.93	321.96	315.30	311.24	312.42	314.84
	286.52	300.86	250.41	247.74	296.85	300.94	296.30	136.65
	219.66	228.66	136.28	136.68	224.91	277.60	270.63	121.97

Fuente: Análisis con el *Quantity One*.

Una vez conocida la cantidad del producto amplificado, sigue la digestión enzimática para la misma se sigue las instrucciones del fabricante (Roche) quien recomienda usar el Buffer M 1.7 µL (1X), Enzima Hae III 0.5 µL uL y la muestra 160 ηg/µL con un volumen total de 17.00 µL.

Se preparó la mezcla y se incubó en baño maría a 37 ºC por 12 horas o toda la noche. Luego del tiempo de digestión, todo el volumen de la reacción se preparó para ser sembrado en un gel de electroforesis al 1.8%, añadiendo 0.5µg/mL de bromuro de etidio a la agarosa fundida una vez que alcanzó una temperatura de 65 ºC. En cada pozo del gel se sembró 17 µL de los productos de la digestión enzimática mezclados con 4 µL de tampón de carga 6X. La electroforesis se realizó en la cámara de electroforesis (Hoefer), con tampón TAE 1X. Las condiciones de la electroforesis son las siguientes: 90V, 118mA, 10W durante 1 hora y 30 minutos.

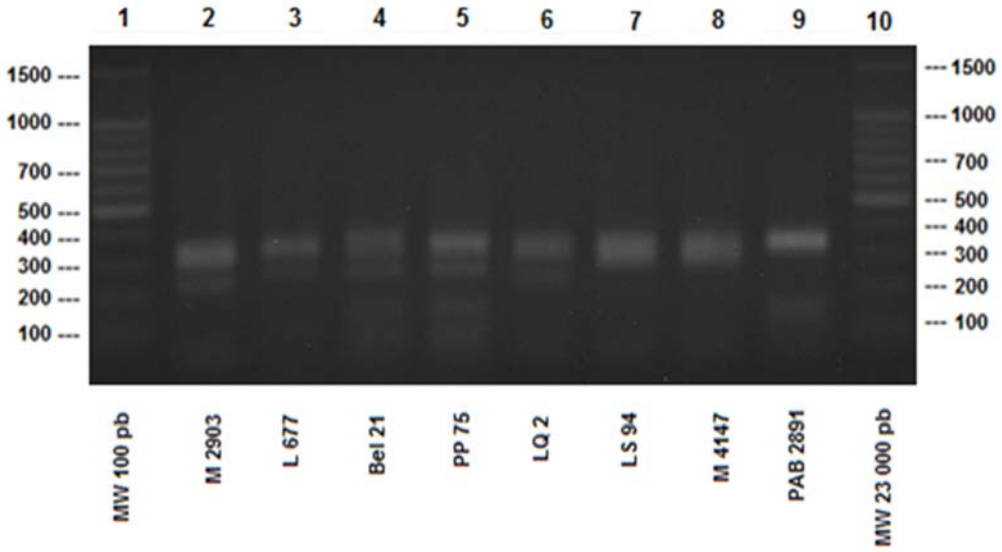
El resultado de la digestión enzimática con la enzima de restricción Hae III del producto de la amplificación de PCR-hsp70 de las 8 cepas de referencia mundial se muestra en la Fotografía Nº 2

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

FOTOGRAFIA N°2
PRODUCTO DE AMPLIFICACIÓN DE PCR- RFLP hsp 70 Hae III DELAS CEPAS DE *Leishmania* DE REFERENCIA INTERNACIONAL



Carril 1: Estándar de 100 pb (Promega), **Carril 2:** *L.* (V.) *braziliensis* M2903, **Carril 3:** *L.* (V.) *peruviana* L677, **Carril 4:** *L.* (L.) *mexicana* Bel 21, **Carril 5:** *L.* (L.) *chagasi* PP 75, **Carril 6:** *L.* (V.) *braziliensis* LQ2, **Carril 7:** *L.* (V.) *panamensis* LS94, **Carril 8:** *L.* (V.) *guyanensis* M 4147, **Carril 9:** *L.* (V.) *lainsoni* PAB 2891, **Carril 10:** Estándar de 100 pb (Promega)

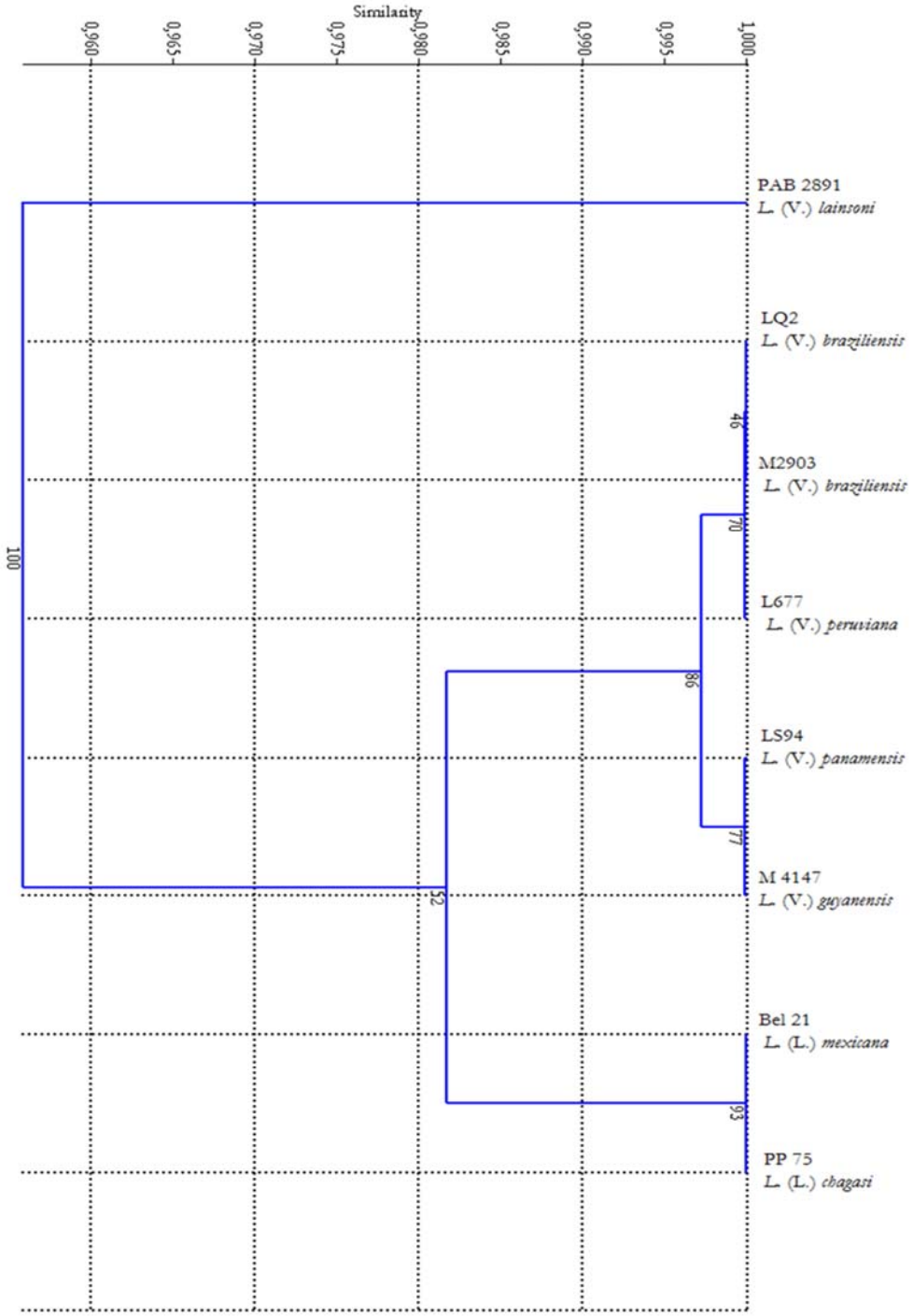
Fuente: Análisis con el *Quantity One*.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

DENDROGRAMA Nº 1
RELACIÓN FILOGENÉTICA DE LAS CEPAS DE REFERENCIA MUNDIAL DE *Leishmania*



Fuente Análisis con el *Quantity One* utilizando el Software PAST versión 2.16

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

En relación al análisis efectuado por el Software *Quantity One* y el software PAST versión 2.16, se analizaron los tamaños moleculares de los fragmentos de restricción y podemos distinguir de manera individual las relaciones entre las cepas de referencia mundial *Leishmania* (Dendograma Nº 01).

Analizando el dendrograma, observamos las relaciones que tienen entre las especies de *Leishmania* del subgénero Viannia, que se agrupan independientemente a excepción de *L.* (V.) *Lainsoni* que por tener un patrón de corte diferente se agrupa de manera individual.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

1.3. CARACTERIZACIÓN DE LAS ESPECIES DE *Leishmania* SEGÚN TIPO, TIEMPO DE LESION Y TRATAMIENTO

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

TABLA N° 9
CARACTERIZACION MOLECULAR POR PCR- RFLP hsp 70 Hae III DELAS CEPAS DE *Leishmania* AISLADAS DE PACIENTES CON LEISHMANIOSIS DE LA MICRO RED DE KITENI

Especie de *Leishmania*	Código	Origen geográfico	Establecimiento de salud	Manifestación clínica
	LM 1003	Ozonampiatoo	Kepashiato	Cutánea
	LM 1017	Ozonampiato	Kepashiato	Cutánea
	LM 1034	San Carlos	Ivochote	Cutánea
	LM 1036	Kumpirushiato	Kiteni	Mucoso
	LM 1053	Cerranuyoc Alto	Kiteni	Cutánea
	LM 1082	Confortayoc	Kiteni	Cutánea
	LM 1090	Inquiruato	Ivochote	Mucoso
	LM 1128	Sirialo	Kiteni	Cutánea
	LM 1132	Kamankiriato	Kamankiriato	Cutánea
	LM 1136	Pangoa	Ivochote	Mucoso
	LM 1138	Kepashiato	Kepashiato	Cutánea
	LM 1141	Alto Ivochote	Ivochote	Cutánea
	LM1154	Ivochote	Ivochote	Cutánea
	LM1158	Saniriato	Kiteni	Cutánea
	LM 1204	Manatarushiato	Kepashiato	Cutánea
	LM 1211	Ivochote	Ivochote	Cutánea
	LM 1217	Tintinikiato	Ivochote	Cutánea
	LM 1223	Ivochote	Ivochote	Cutánea
	LM 1225	Selva Alegre	Kiteni	Cutánea
	LM 1230	Paquichari	Ivochote	Cutánea
	LM 1231	Alto Ivochote	Ivochote	Cutánea
	LM 1232	Ozonampiato	Kepashiato	Cutánea
L. (V) *braziliensis*	LM 1234	San Carlos	Ivochote	Cutánea
	LM 1032	Paquichari	Ivochote	Cutánea
	LM 1170	Saringabeni	Kamankiriato	Cutánea
L. (V) guyanensis	LM 1208	Ozonampiato	Kepashiato	Cutánea
L. (V) lainsoni	LM 1115	Ozonampiato	Kepashiato	Cutánea

Fuente: Ficha de datos del investigador

Los genes que codifican las proteínas de choque térmico han sido caracterizados en varias especies de *Leishmania*. Los miembros de esta familia de las Hsp70 son los más conservados evolutivamente, tanto en estructura

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

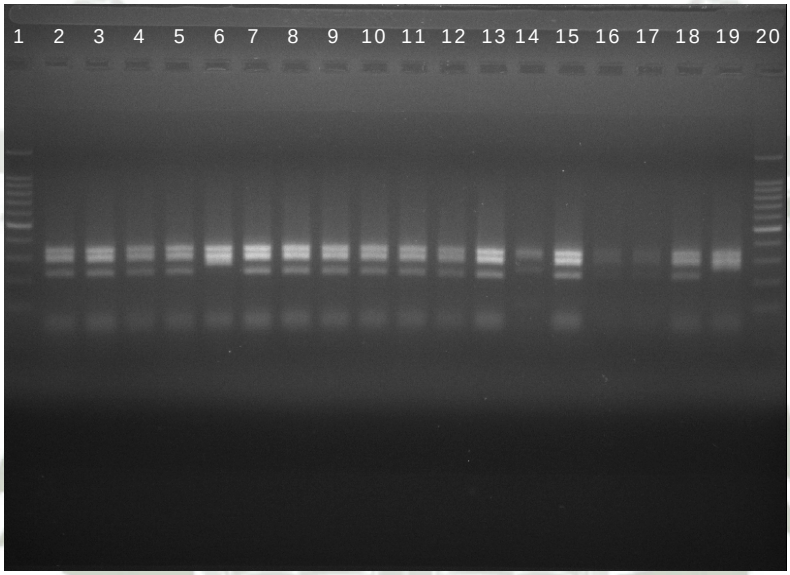
REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

como en función, estas características son usadas para determinar las diferencias existentes entre las especies de Leishmania.

En cepas aisladas de pacientes provenientes de la Micro Red de Kiteni se lograron caracterizar 03 especies de *Leishmania,* utilizando la biología molecular por PCR- RFLP hsp 70 Hae III.

FOTOGRAFÍA N° 3
CORRIDA ELECTROFORÉTICA DE LA DIGESTIÓN ENZIMÁTICA CON Hae-III DEL PRODUCTO DE LA PCR-Hsp70 PARA LAS MUESTRAS PROBLEMA



Carril 1: Estándar de 100pb; **Carril 2:** Patrón *L.* (V.) *braziliensis* M2903; **Carril 3:** LM 1128-32-CA1;**Carril 4:** LM 1128-32-CB1;**Carril 5:** LM 1128-32-CB2;**Carril 6:** Patrón *L.* (V.)*guyanensis* M4147;**Carril 7:** LM 1136-50-CA2;**Carril 8**; LM 1141-08-CA1;**Carril 9:**LM 1141-08-CA2;**Carril 10:**Patrón *L.* (V.) *braziliensis* M2903;**Carril 11:**LM 1141-08-CB1;**Carril 12:** LM 1154-28-CB2;**Carril 13:** LM 1230-02-CA1;**Carril 14:** Patrón *L.* (V.) *peruviana* L677;**Carril 15:** LM 1230-02-CA2;**Carril 16:**LM 1225-23-CA2;**Carril 17:**LM 1225-23-CB1;**Carril 18:** LM 1232-16-01-CA2;**Carril 19:** Patrón *L.* (V.*) panamensis*LS94;**Carril 20:** Estándar de 100pb.

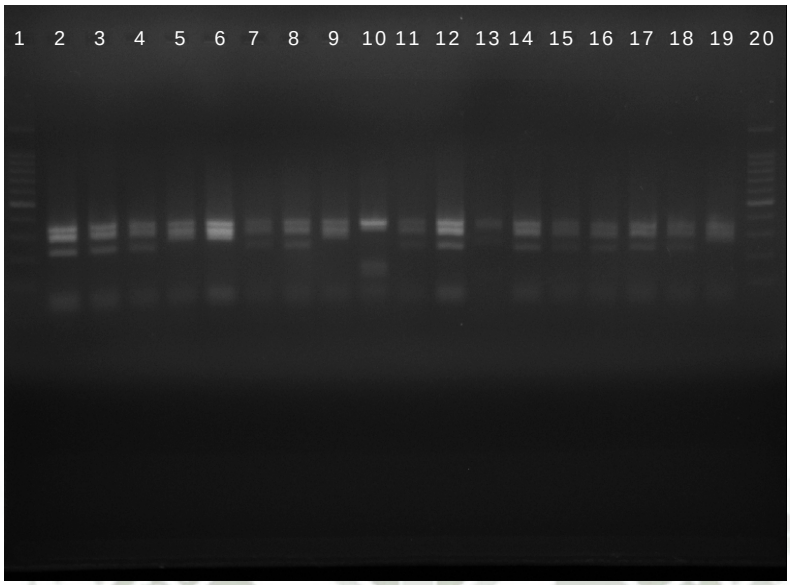
Fuente: Análisis con el *Quantity One*.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

FOTOGRAFÍA N° 4
CORRIDA ELECTROFORÉTICA DE LA DIGESTIÓN ENZIMÁTICA CON Hae III DEL PRODUCTO DE LA PCR-Hsp70 PARA LAS MUESTRAS PROBLEMA.



Carril 1: Estándar de 100pb; **Carril 2:** Patrón *L.* (V.) *braziliensis* M2903; **Carril 3:** LM 1128-32-CB3;**Carril 4:** LM 1158-17-CA2;**Carril 5:** LM 1170-15-1-CA3;**Carril 6:** Patrón *L.* (V.)*guyanensis* M4147;**Carril 7:** LM 1204-25-CA2;**Carril 8**; LM 1204-25-CB2;**Carril 9:**LM 1208-02-CB1;**Carril 10:***L.* (V.)*lainsoni* PAB 2891;**Carril 11:** LM 1211-35-CA2;**Carril 12:** LM 1132-36-CA1;**Carril 13:** LM 1138-15-CA1;**Carril 14:** Patrón *L.* (V.) *peruviana* L677;**Carril 15:** LM 1217-01-CA3;**Carril 16:** LM 1223-32-CA2;**Carril 17:** LM 1231-04-CA2;**Carril 18:** LM 1234-15-CA2;**Carril 19:** Patrón *L.* (V.) *panamensis*LS94;**Carril 20:** Estándar de 100pb.

Fuente: Análisis con el *Quantity One*.

Como se puede observar en las fotografías de las electroforesis de la digestión enzimática del producto de la PCR-hsp70 con la enzima de restricción Hae III, las muestras problema en la fotografía 03 correspondientes a los carriles 3, 4, 5, 7, 8, 9, 11, 12, 13, 15, 16, 17, 18 presentan los mismos productos de amplificación que la cepa estándar por lo tanto en la caracterización molecular las identificamos como *L.* (V) *braziliensis*; igualmente en la fotografía 04 identificamos que las muestras problema correspondientes a los carriles 3, 4, 7, 8, 11, 12, 13, 15, 16, 17, 18 presentan los mismos productos de amplificación que la cepa estándar por lo tanto en la caracterización molecular las identificamos como *L.* (V) *braziliensis* y las muestras problema correspondientes a los carriles 5 y 9 presentan los mismos productos de amplificación que la cepa estándar por lo tanto en la caracterización molecular las identificamos como *L.* (V) *guyanensis.*

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

TABLA N° 10

ESPECIES DE *Leishmania* AISLADAS POR TIPO DE LESIÓN DE PACIENTES DE LA MICRORED DE KITENI

ESPECIES DE Leishmania	TIPO DE LESION				TOTAL	
	CUTANEO		MUCOSA			
	N°	%	N°	%	N°	%
L (V) braziliensis	20	74.1	3	11.1	23	85.2
L (V) guyanensis	3	11.1	0	0.0	3	11.1
L (V) lainsoni	1	3.7	0	0.0	1	3.7
TOTAL	24	88.9	3	11.1	27	100.0

FUENTE: Ficha de datos del investigador.

En la jurisdicción de la Micro Red de Kiteni, se identificaron la presencia de 3 especies de *Leishmania*, siendo la *Leishmania (V) braziliensis* la más predominante con el 85%, esta especie produce lesiones cutáneas y mucosas, Caballero (21) en el estudio realizado en la caracterización isoenzimatica de cepas aisladas de pacientes provenientes del Distrito de Echarati, Provincia de La Convención reporto 96% como *Leishmania (V) braziliensis.* En el caso de *Leishmania (V) guyanensis* y *Leishmania (V) lainsoni*, también fueron reportados por Pérez (24), en cepas aisladas de pacientes de la Micro Red de Kiteni mediante el método molecular RAPD, utilizando el cebador OPC-20. Estas dos últimas especies de Leishmania identificadas producen lesiones cutáneas, como se demuestra en la tabla N° 10.

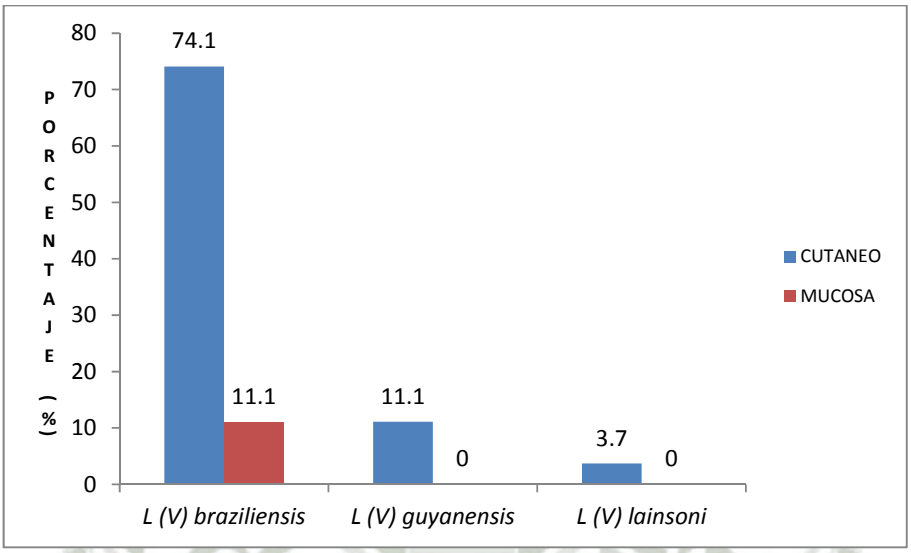
Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

GRAFICO N° 6

ESPECIES DE *Leishmania* AISLADAS POR TIPO DE LESIÓN DE PACIENTES DE LA MICRORED DE KITENI



FUENTE: Ficha de datos del investigador.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

CUADRO Nº 11

ESPECIES DE *Leishmania* AISLADAS DE PACIENTES POR TIEMPO DE LESION

TIEMPO DE LESION	*L(V) braziliensis*		*L(V) guyanensis*		*L(V) lainsoni*		TOTAL	
	N°	%	N°	%	N°	%	N°	%
< 3 meses	14	51.9	2	7.4	1	3.7	17	63.0
3 a 6 meses	2	7.4	0	0.0	0	0.0	2	7.4
7 a 12 meses	3	11.1	0	0.0	0	0.0	3	11.1
> 12 meses	4	14.8	1	3.7	0	0.0	5	18.5
TOTAL	23	85.2	3	11.1	1	3.7	27	100.0

FUENTE: Ficha de datos del investigador.

Se puede observar que las cepas de *Leishmania* aisladas de pacientes provienen de la Micro Red de Kiteni, el 63% presentaron lesiones menores de 3 meses, así mismo se diferenciaron tres especies existentes en la zona como *Leishmania (V) braziliensis, L. (V) guyanensis y L. (V) lainsoni*.

L. (V) braziliensis se aisló de pacientes que presentaron lesiones activas hasta más de 12 meses, ello está relacionada con los métodos parasitológicos de aislamiento y la destreza del investigador.

La importancia de la identificación precisa de la especie de *Leishmania,* sirve para el manejo de tratamiento e intervención sanitaria adecuada.

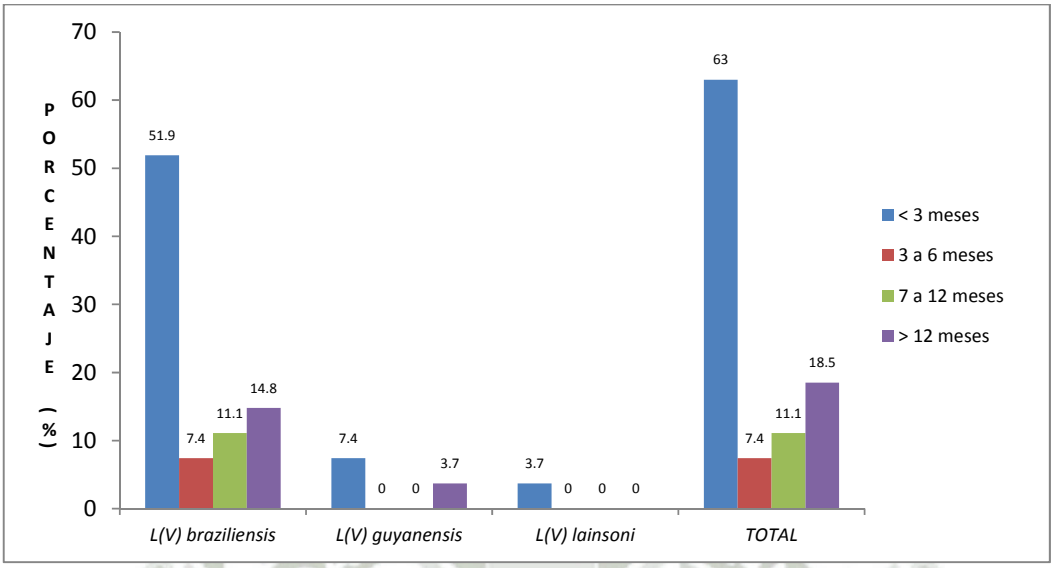
Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

GRAFICO Nº 7

ESPECIES DE *Leishmania* AISLADAS DE PACIENTES POR TIEMPO DE LESION



FUENTE: Ficha de datos del investigador.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

TABLA N° 12
ESPECIES DE *Leishmania* AISLADO DE PACIENTES DE LA MICRORED DE KITENI SEGÚN TRATAMIENTO

ESPECIES DE Leishmania	TRATAMIENTO				TOTAL	
	SIN TRATAMIENTO		CON TRATAMIENTO			
	N°	%	N°	%	N°	%
L (V) braziliensis	19	70.4	4	14.8	23	85.2
L (V) guyanensis	2	7.4	1	3.7	3	11.1
L (V) lainsoni	1	3.7	0	0.0	1	3.7
TOTAL	**22**	**81.5**	**5**	**18.5**	**27**	**100.0**

FUENTE: Ficha de datos del investigador.

En la presente tabla se observa que las 3 especies de *Leishmania*, identificadas en la jurisdicción de la Micro Red de Kiteni, se determinaron que el 81.5% de los pacientes refiere no haber recibido tratamiento antileishmaniasica.

Leishmania (V) braziliensis) es el principal agente etiológico de leishmaniosis mucosa, una enfermedad infiltrativa crónica de retraso en la aparición que afecta las vías aéreas superiores y, a través de factores aún desconocidos, aparecen en 2 a 3 % de los casos de Leishmaniosis cutánea. Para el tratamiento se sigue utilizando antimoniales pentavalentes, desde hace más de 60 años, cuya administración dura de 20 a 30 días, como tratamiento de primera línea, sin embargo existen pocos estudios que se han realizado sobre la influencia de factores clínicos, especies de Leishmania y epidemiológicos en los resultados de los tratamiento, sin embargo por los fracasos que se tienen, se piensa que existen genes de resistencia a las drogas antimoniales, como lo menciona Llanos en "*Clinical and Parasite Species Risk Factors for Pentavalent Antimonial Treatment Failure in Cutaneous Leishmaniasis in Peru*" (28)

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

TABLA N° 13
ESPECIES DE *Leishmania* AISLADO DE PACIENTES DE LA MICRORED DE KITENI SEGÚN ESTABLECIMIENTO DE SALUD

ESTABLECIMIENTO DE SALUD	*L(V) braziliensis*		*L(V) guyanensis*		*L(V) lainsoni*		TOTAL	
	N°	%	N°	%	N°	%	N°	%
C.S. Kiteni	6	22.2	0	0.0	0	0.0	6	22.2
C.S. Kepashiato	4	14.8	1	3.7	1	3.7	6	22.2
P.S. Ivochote	12	44.5	1	3.7	0	0.0	13	48.2
P.S. Kamankiriato	1	3.7	1	3.7	0	0.0	2	7.4
TOTAL	**23**	**85.2**	**3**	**11.1**	**1**	**3.7**	**27**	**100.0**

FUENTE: Ficha de datos del investigador.

En la jurisdicción de la Micro Red de Kiteni, *Leishmania (V) braziliensis,* se pudo identificar en los 4 establecimientos de salud intervenidos, *Leishmania (V) guyanensis* se encuentro en la jurisdicción del Puesto de Salud de Ivochote y Kamankiriato, y en el Centro de Salud de Kepashiato, Asi mismo en este último Establecimiento de Salud se logró asilar a *Leishmania (V) lainsoni.*

En el Puesto de Salud de Ivochote, se pudo aislar el 48% de las cepas de *Leishmania* y el 22.2% de los Centro de Salud de Kiteni y Kepashiato respectivamente.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

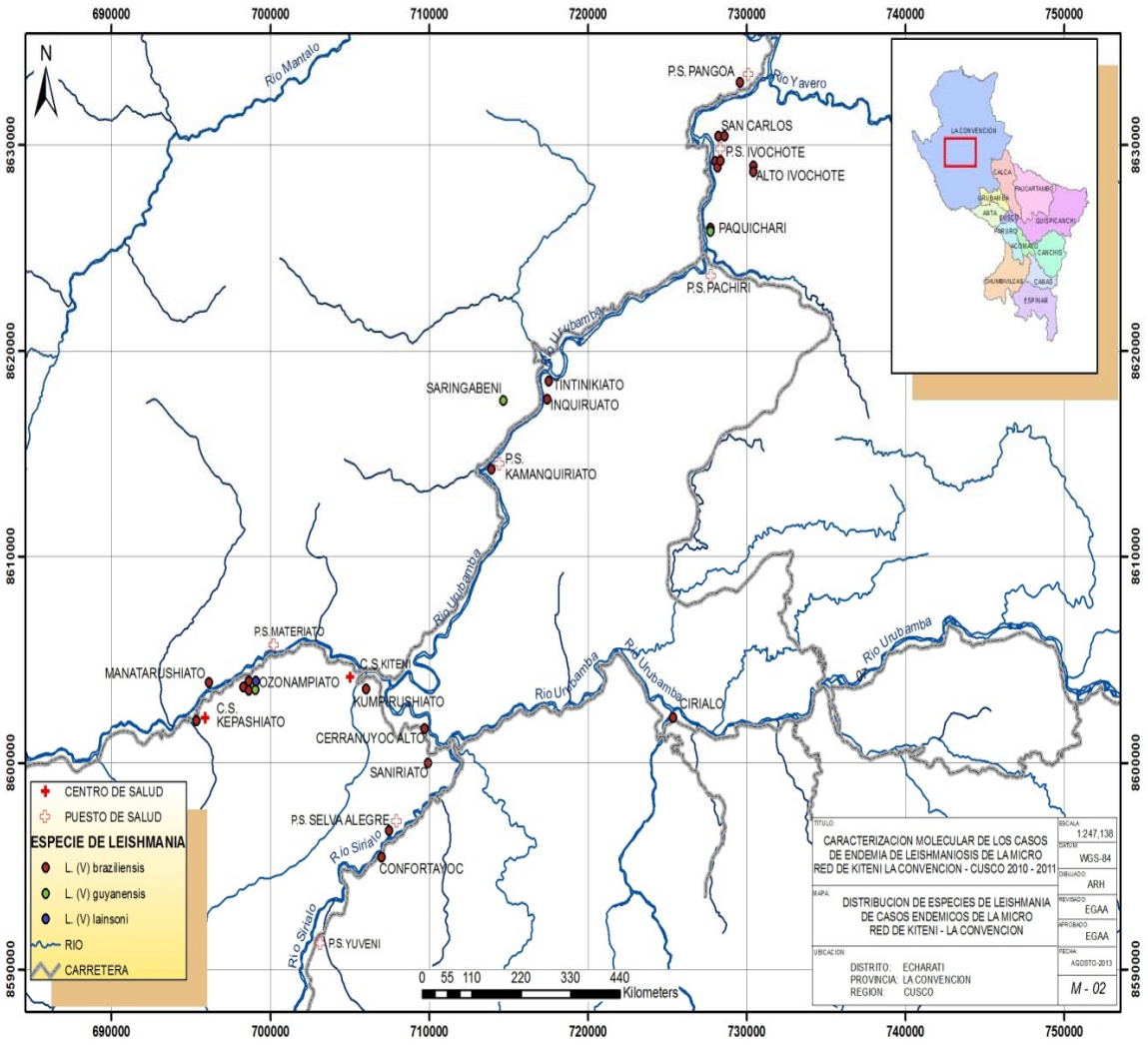
1.4 UBICACIÓN GEOGRAFICA DE LAS ESPECIES DE *Leishmania* CARACTERIZADOS POR PCR- RFLP hsp 70 Hae III DE PACIENTES CON LEISHMANIOSIS DE LA MICRO RED DE KITENI

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

MAPA N° 1
ESPECIES DE *Leishmania* AISLADAS DE PACIENTES DE LA MICRORED DE KITENI



En el presente mapa se puede observar la distribución de especies de *Leishmania* en el área microendémicas de la jurisdicción de la Micro Red de Kiteni del Distrito de Echarati.

En zonas endémicas depende básicamente de la distribución focal del agente causal, el parasito, los insectos vectores y los reservorios, probablemente ello se deba a las condiciones microecologicas de cada una de las comunidades, por ello la importancia de la Ecoepidemiologia de la Leishmaniosis, para

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

determinar si los cambios sean estas naturales o inducidas por las actividades antropológicas, de ello dependería la prevalencia de la enfermedad.

Una de las características básicas comunes en la zona de estudio, que es selva alta, con bosques primarios y secundarios así como los cultivos de café, achiote, coca como actividad agrícolas; en los últimos 8 años se ha incrementado la actividad de la explotación del gas de Camisea.

En el mapa podemos observar algunas comunidades microendemicos, como la comunidad de Ozonampiato que está ubicada dentro de la jurisdicción del Centro de Salud de Kepahiato, se logró aislar las 3 cepas de Leishmania reportadas para la zona de estudio, identificadas molecularmente como *Leishmania (V) braziliensis y Leishmania (V) guyanensis y Leishmania (V) lainsoni*, es de suma importancia hacer un estudio epidemiológica de vectores y reservorios, lamentablemente es estos últimos años, la zona se encuentra con problemas sociales.

Otra comunidad de importancia microendemica para *Leishmania (V) braziliensis*, son las comunidades de Ivochote, Alto Ivochote, que se encuentran dentro de la jurisdicción del Puesto de Salud de Ivochote.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

2. DISCUSION

2.1. CARACTERÍSTICAS DE LA POBLACIÓN DE ESTUDIO

La leishmaniosis es una enfermedad parasitaria que afecta a 88 países de áreas tropicales a nivel mundial, la Organización Mundial de Salud en 2010, considera como una enfermedad transmisible desatendida (6).

En el Perú la leishmaniosis es endémica y constituye un problema de salud pública aún irresuelto. La incidencia anual durante el último quinquenio en promedio se encuentra en 30 por 100,000. Existen las formas cutánea (cutáneo andina o Uta) y la mucocutánea (cutáneo selvática o espúndia) según la OMS (6).

Según la Dirección General de Epidemiologia en nuestro país, la leishmaniosis constituye una endemia que afecta a 13 departamentos de los 24 que lo conforman, es considerada como la segunda endemia de carácter tropical después de malaria, y la tercera que causa la morbilidad como enfermedades transmisibles después de la Malaria y la tuberculosis.

Las regiones de salud que reportan el mayor número de casos son Ancash, Ucayali, Junín, Loreto, San Martín, Amazonas, Ayacucho, Cajamarca, Cusco, Huánuco, Cerro de Pasco, Madre de Dios, Lima. La mayoría de los casos en el Perú es causada por *L. brasiliensis* y *L. peruviana*. No se ha registrado casos de leishmaniosis visceral (9).

El departamento de Cusco reporta más del 50% de casos a nivel nacional y de ellos la provincia de la Convención el 70% de estas y la Micro red de Salud de Kiteni el 60%. En la distribución de pacientes con diagnóstico clínico leishmaniosis de la jurisdicción de la Micro Red de Kiteni, según el sexo y el grupo etareo. El sexo masculino es la predominante con el 70% de caso clínicamente diagnosticado y el grupo etareo de 15 a 45 años representa el 50% de casos. La leishmaniosis por consiguiente es considerada como una enfermedad laboral, en las

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

personas que se trasladan por motivo de trabajo a las áreas endémicas. Esta casuística está respaldada por la Oficina General de Epidemiologia, así mismo coinciden con los resultados reportados por RENACE (9) y Pérez (24).

Desde la perspectiva del Ministerio de Salud y la Organización Mundial de Salud, los factores de riesgo relacionados con la leishmaniosis tegumentaria son los siguientes: Edad: 15 - 44 años, población económicamente activa; Sexo: masculino; Ocupación: aserrador, cazador, minero, colonizador, trabajador del campo, personal de las fuerzas armadas, guerrilleros; Factores ambientales: clima cálido y medio, altura entre 0 y 1750m, presencia de bosques primarios, secundarios o de galería; Eventos económicos: colonización, apertura de vías de penetración, nuevas explotaciones forestales, agrícolas o mineras y Eventos sociales: migración, urbanización de áreas semi forestales (6) (10).

La variabilidad de las manifestaciones clínicas de las leishmaniosis, se debe a la existencia de varias especies de *Leishmania*, y estas manifestaciones clínicas no son características de cada especie, pueden ser variables.

Los resultados representados en la tabla N° 2, se observó que pacientes clínicamente diagnosticados leishmaniosis, 78% presento lesiones cutáneas y 28% lesiones mucosas, estos resultados es corroborado por Pérez (24).

En la Tabla N°3, se observa que el 75% de lesiones cutáneas se encuentran entre los miembros inferiores y superiores, los pobladores de la zona usan generalmente pantalones cortos y polos, por el clima cálido y el tipo de actividades laborales que desempeñan como es el rose de terreno, extracciones de madera y otros.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

En lesiones mucosas se observa que las fosas nasales son las predominantes con el 45% con nódulos e infiltraciones del septo cartilaginoso, que muchas veces puede causar la obstrucción del orificio nasal, posteriormente se puede observar la perforación o colapso del septo, produciendo deformaciones como el ensanchamiento de la nariz, produciendo la característica clínica de nariz de tapir.

En el caso de las afecciones de la úvula y paladar blando sufren linfadenopatia, que en casos graves conlleva a la perdida de úvula y destrucción del paladar, situación que puede agravarse y provocar al paciente la muerte por complicaciones como desnutrición y que pueden desencadenas otras patologías como la tuberculosis e inmunosupresoras.

Según la OMS, las manifestaciones clínicas de la forma mucocutánea se presentan muchos meses o años después haber cursado con la forma cutánea, sin embargo en algunos pacientes aparecen cuando todavía existen las manifestaciones en la piel. En más de un tercio de los casos, las lesiones mucosas se manifiestan sin antecedente de lesión cutánea; posiblemente la infección primaria ha sido inaparente o se ha manifestado como una lesión mínima que pasó desapercibida para el paciente. Sin embargo, un alto riesgo de desarrollo de la leishmaniosis mucocutánea, está asociado a la falta, incompleta o inadecuado tratamiento.

La Leishmaniosis Mucocutánea, en los primeros años de su evolución, no afecta el estado general del paciente, el que puede realizar su labor normalmente. Sin embargo, cuando las lesiones mucosas están muy avanzadas y comprometen la mucosa de la boca y la laringe, la respiración, la alimentación y el estado general del enfermo se altera, encontrando al paciente afectado física, psicológica y laboralmente.

El tiempo de lesión o evolución de la enfermedad, tiene importancia clínica, observándose lesiones clásicas y/o sobreinfectadas con otros

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

agentes microbianos, lo que define el éxito o fracaso en el diagnostico parasitológico de la enfermedad. Los pacientes que acudieron a los Establecimientos de Salud, con lesiones menores de 6 meses que representan el 70% aproximadamente, no encontramos lesiones muy crónicas debido a que desde más de 10 años, el Grupo de Investigación de Leishmania de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad de San Antonio Abad del Cusco, como proyección y extensión universitaria, viene realizando intervenciones de carácter permanente en el diagnóstico gratuito de esta patología.

En la distribución de pacientes con diagnóstico clínico leishmaniosis según tipo de lesión y tratamiento, en casos endémicos de la Micro Red de Kiteni, como se muestra en el cuadro N° 4, se observó que el 70% de pacientes no han recibido tratamiento antileishmaniasica, el 77% de casos cutáneos y el 51% de casos mucosas reportan no haber recibido tratamiento antimoniales para leishmaniosis. Algunos pacientes refieren haberse realizado tratamientos con ácido de batería, algunas plantas medicinales y otros.

En el presente estudio se eligieron 4 Establecimientos de Salud de la Micro Red de Kiteni, por su ubicación estratégica y accesibilidad. En la tabla N° 5, se mostró la distribución con diagnóstico clínico leishmaniosis según los Establecimientos de Salud de origen, donde se determinó que la mayor procedencia de pacientes fueron del Puesto de Salud de Ivochote con el 36.6% (63/172), seguida por pacientes que acudieron al Centro de Salud de Kepashiato con el 28.5% (49/172), seguidas por el Centro de salud de Kiteni y Kamankiriato.

El diagnóstico de la Leishmaniosis es la demostración directa e indirecta del microorganismo protozoario causante de la enfermedad y su correlación con los antecedentes epidemiológicos del paciente. Los exámenes parasitológicos, inmunológicos y de biología molecular nos permiten determinar la presencia del agente etiológico, los cuales

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

pueden variar según la presentación clínica, ya sea cutánea o mucocutánea.

En la tabla N° 6 se determinó la presencia de Leishmania en lesiones cutáneas como mucosas mediante examen directo el 9.3%, por cultivo el 15.7% y por PCR (reacción en cadena de la polimerasa) el 37.8% de positividad de 172 pacientes con diagnóstico clínico leishmaniosis. Los resultados obtenidos por Miranda (20), estudio que realizo con 69 pacientes con antecedente de vivir en zonas endémicas de leishmaniosis en la Región La Libertad. Se procedió a tomar muestras de bordes de las lesiones cutáneas obteniendo 93% de positividad para PCR, 85% para el examen directo y 72% para el cultivo, Los resultados comparados con los nuestros son óptimos, probablemente por los tipos de especies de *Leishmania* causantes.

Según Evans (16), el método directo permitió observar al microscopio amastigotes de *Leishmania* presentes en lesiones, los cuales variaron según el tiempo de evolución y la forma clínica de la enfermedad. La muestra de lesión se obtiene mediante la escarificación de la superficie o del borde de la lesión, empleando bisturí o con el extremo en forma de bisel; la muestra se la extiende en un portaobjetos y se tiñe con colorantes Giemsa, para su observación al microscopio óptico. La detección de parásitos en lesiones crónicas típicas de leishmaniosis cutánea localizada es más difícil que en lesiones recientes, donde se observan una mayor cantidad de parásitos que hacen más fácil su diagnóstico.

Se consideró positivo al cultivo, cuando se observó crecimiento de forma promastigotes de *Leishmania*, observadas al microscopio hasta 30 días después del cultivo inicial en el medio USAMRU. Un resultado positivo de cultivo confirma la enfermedad. Las cepas de *Leishmania* aisladas deberán tipificarse para averiguar la especie y la variedad a fin de conocer cuáles son las que circulan en las distintas regiones del país. Una de las dificultades de realizar el diagnostico en zonas endémicas y

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

no contar con laboratorios implementados en los centros de salud, es la contaminación con microorganismos ambientales, así como la sobreinfecciones que presentan las lesiones tanto cutánea como mucosas. Los tratamientos caseros utilizados como ácidos de batería impiden el aislamiento del parasito.

La prueba molecular tiene la finalidad de copiar un fragmento en particular de DNA del parásito y producir un gran número de copias de la misma, posterior a la amplificación se realizó una corrida electroforética en gel, su sensibilidad es superior a la técnica de referencia (cultivo); esta sensibilidad está de acuerdo con la calidad y cantidad de muestra obtenida, tiene la ventaja de tener los resultados de una forma rápida, actualmente esta técnica solo se usa en laboratorios especializados. Dichas características concuerdan con Miranda (20), Da Silva (22) y Pérez (24).

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

2.2. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LAS ESPECIES PATRÓN DE ESPECIES DE *Leishmania*

Según la Organización Mundial de Salud, existen aproximadamente 20 especies de *Leishmania*, capaces de causar alguna manifestación clínica de la enfermedad. La severidad de la manifestación clínica está ligada a muchos aspectos, donde uno de los principales es la especie infectante responsable. Por lo tanto desde el punto de vista epidemiológico, es importante conocer la distribución de las especies en las diferentes zonas endémicas y desde el punto de vista clínico para realizar un adecuado tratamiento (7).

La clasificación taxonómica de *Leishmania* no está definitivamente cerrada, la clasificación se basa en métodos extrínsecos (basados en el fenotipo) y actualmente se utilizan los métodos de caracterización intrínsecos que analizan el genoma del parásito. Para la caracterización molecular está basada en el análisis del secuencias genómicas, que en principio permanecen invariables durante toda la vida del parasito, la región más utilizada es el ADN del kinetoplasto, según Da Silva (22)

Las proteínas de choque térmico (HSP) han sido identificadas en las células de todos los organismos tanto procariotas como eucariotas. Dichas proteínas se encuentran presentes en el citosol de procariotas y en el citosol, núcleo, retículo endoplasmico, mitocondria y cloroplastos de los eucariotas. Las proteínas de choque térmico son proteínas evolutivamente ancestrales y altamente conservadas en su secuencia de aminoácidos, regulación y funciones bioquímicas, indicativo de su función esencial en la supervivencia celular.

Entre las Hsps, los miembros de la familia de las Hsp70 son los de mayor importancia como “chaperonas moleculares”. Se identificaron por primera vez en células de *Drosophila* sometidas a un rápido incremento de temperatura, según Montalvo (23).

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

La importancia que el gen Hsp 70, parece tener en diversos aspectos de la biología de *Leishmania,* regulan de forma diferente durante el choque térmico, traduciéndose tanto a 26ºC como a temperaturas de choque térmico (37 y 39ºC). La transmisión de los parásitos del género *Leishmania* desde el insecto vector poiquilotermo (26ºC) al hospedador mamífero homeotermo (35-37ºC) implica un aumento drástico de temperatura que desencadena la respuesta al choque térmico en estos organismos. La adaptación de los parásitos al aumento de temperatura constituye, en consecuencia, un requisito importante del ciclo de vida de *Leishmania* y, de hecho, ha sido descrito como uno de los factores desencadenantes del proceso de diferenciación promastigote-amastigote. Los genes que codifican para las proteínas de choque térmico han sido ampliamente estudiados en *Leishmania*, tanto por su importancia durante el proceso de diferenciación del parásito, como por constituir un modelo ideal para el estudio de los mecanismos de regulación de la expresión génica en estos organismos, menciona Montalvo (23).

Para diferenciar entre los genes Hsp70, utilizamos especies de *Leishmania patrones.* Las especies elegidas para el estudio fueron: *L. (V) braziliensis, L.(V) guyanensis, L. (V) mexicana, L. (V) chagasi, L. (V) lainsoni.* En las reacciones de PCR-hsp70, el producto de amplificación fue de 1443 pb, coincide con lo propuesto por Montalvo (23), evidenciada en gel de agarosa al 1%, haciendo uso de enzimas de restricción Hae III, la digestión enzimática con la enzima del producto de la amplificación de PCR-hsp70 de las 8 cepas de referencia mundial

Montalvo (23) realizó un análisis teórico para determinar la utilidad de la enzima de restricción Hae III, determinando patrones de bandas para cada 147 cepas de referencia y aislamientos previamente caracterizados. Para comparar los patrones obtenidos por este autor con los que obtenemos en el presente estudio, construimos haciendo uso en referencia a los fragmentos de restricción del gen hsp70 de las especies

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

L. (V.) *braziliensis*, *L.* (V.) *peruviana*, *L.* (V.) *guyanensis*, *L.* (V.) *panamensis*, *L.* (V.) *lainsoni*, *L.* (L.) *mexicana* y *L.* (L.) *chagasi*. Este análisis efectuado por el Software *Quantity One* y el software PAST versión 2.16, se determinaron los tamaños moleculares de los fragmentos de restricción y podemos distinguir de manera individual las relaciones entre las cepas de referencia mundial *Leishmania*, evidenciado en el dendrogrma N°1. Se observa las relaciones que tienen entre las especies de *Leishmania* del subgénero Viannia, que se agrupan independientemente a excepción de *L.* (V.) *Lainsoni* que por tener un patrón de corte diferente se agrupa de manera individual.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

2.3. CARACTERIZACIÓN DE LAS ESPECIES DE Leishmania SEGÚN TIPO, TIEMPO DE LESION Y TRATAMIENTO

En la jurisdicción de la Micro Red de Kiteni se lograron caracterizar 03 especies de *Leishmania,* utilizando la biología molecular por PCR- RFLP hsp 70 Hae III. Como se puede observar en las fotografías de las electroforesis de la digestión enzimática del producto de la PCR-hsp70 con la enzima de restricción Hae III, los productos de amplificación que la cepa estándar por lo tanto en la caracterización molecular las identificamos como *L.* (V.) *braziliensis*; *L.* (V.) *guyanensis y L(V) lainsoni.*

Caballero en 2008 (21), Da silva en 2010 (22), Montalvo *en 2011 (23) y Perez 2011 (24)* indican que *L.* (V.) *braziliensis* es la especie responsable de las formas cutáneas y mucosas; como también predominante frente a otras especies que causan esta enfermedad

Se puede observar que las cepas de *Leishmania* aisladas de pacientes provienen de la Micro Red de Kiteni, el 63% presentaron lesiones menores de 3 meses, así mismo se pudieron diferenciar las tres especies existentes en la zona como *Leishmania (V) braziliensis, L(V) guyanensis y L(V) lainsoni*, como se mostró en la tabla N° 10.

En la tabla 11, se observó que las 3 cepas identificadas en la jurisdicción de la Micro Red de Kiteni, se determinaron que el 81.5%, el paciente refiere no haber recibido tratamiento antileishmaniasica, sin embargo el 18.5% de los pacientes refieren haber recibido tratamiento. Este último tiene importancia epidemiológica, porque podría pensarse que se tratamiento en una resistencia a los antimoniales.

En programa de Control de enfermedades Transmisibles del Perú, norma la administración gratuita de antimoniales pentavalentes (20mg/Kg/día) parenteral, el empleo de fármaco tiene varias desventajas como su costo elevado, la vía de administración y los considerables efectos adversos.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

Leishmania (V) braziliensis) es el principal agente etiológico de leishmaniosis mucosa, una enfermedad infiltrativa crónica de retraso en la aparición que afecta las vías aéreas superiores y, a través de factores aún desconocidos, aparecen en 2 a 3 % de los casos de Leishmaniosis cutánea. Para el tratamiento se sigue utilizando antimoniales pentavalentes, después de 60 años de uso, cuya administración dura de 20 a 30 días, como tratamiento de primera línea, sin embargo existen pocos estudios que se han realizado sobre la influencia de factores clínicos, especies de Leishmania y epidemiológicos en los resultados de los tratamiento, sin embargo por los fracasos que se tienen, se piensa que existen genes de resistencia a las drogas antimoniales, como lo menciona Llanos en "*Clinical and Parasite Species Risk Factors for Pentavalent Antimonial Treatment Failure in Cutaneous Leishmaniasis in Peru*" (28)

En la jurisdicción de la Micro Red de Kiteni, *Leishmania (V) braziliensis,* se pudo identificar en los 4 establecimientos de salud intervenidos, sin embargo la especie de *Leishmania (V) guyanensis* se encuentro en la jurisdicción del Puesto de Salud de Ivochote y Kamankiriato, y en el Centro de Salud de Kepashiato, Asi mismo en este último Establecimiento de Salud se logró asilar a *Leishmania (V) lainsoni.* En el Puesto de Salud de Ivochote, se pudo aislar la mayor cantidad de cepas de *Leishmania* a partir de pacientes con diagnóstico clínico leishmaniosis con el 48% y en el Centro de Salud de Kiteni y Kepashiato el 22.2% respectivamente.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

2.4. UBICACIÓN GEOGRAFICA DE LAS ESPECIES DE *Leishmania* CARACTERIZADOS POR PCR- RFLP hsp 70 Hae III DE PACIENTES CON LEISHMANIOSIS DE LA MICRO RED DE KITENI

Las características ecológicas de los lugares de transmisión, de la exposición actual y pasada de la población humana al parásito, y del comportamiento humano, que es muy variable.

Los sistemas de información geográfica, se han convirtiendo en instrumentos importantes para entender la epidemiología de la leishmaniosis. Dichos sistemas integran una amplia gama de datos procedentes de diferentes fuentes, como la teledetección y los sistemas mundiales de determinación de la posición. Además, los sistemas de información geográfica pueden facilitar la toma de decisiones y respaldar la planificación estratégica de la asignación de recursos y del control eficaz de la Leishmaniosis. Combinados con buenos datos procedentes de las actividades de vigilancia, estos sistemas pueden utilizarse sistemáticamente para generar mapas de base, distribución de los vectores y los huéspedes reservorios.

El mapa del distrito de Echarati, la jurisdicción de Micro Red de Kiteni, fue proporcionado por la Sub Gerencia de Ordenamiento Territorial del Gobierno Regional de Cusco, un tema importante a abordar son las vías de acceso ya que los pacientes se trasladan a los puntos donde se toman las muestras: Centro de Salud de Kiteni, Kepashiato y Puesto de Salud de Ivochote y Kamankiriato.

En el mapa se identificaron a los pacientes, por comunidad, así como las especies de *Leishmania* causantes de lesiones cutáneas y mucosas; su respectiva distribución focal de las especies de *Leishmani*, características ecológicas como es selva alta, con bosques primarios y secundarios así como los cultivos de café, achiote, coca como actividad agrícolas; en los últimos 8 años se ha incrementado la actividad de la explotación del gas de Camisea.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

Se determinó a comunidades microendemicos, como la comunidad de Ozonampiato que está ubicada dentro de la jurisdicción del Centro de Salud de Kepahiato, se logró aislar las 3 cepas de Leishmania reportadas para la zona de estudio, identificadas molecularmente como *Leishmania (V) braziliensis y Leishmania (V) guyanensis y Leishmania (V) lainsoni*, seria de suma importancia hacer un estudio epidemiológica de vectores y reservorios, lamentablemente es estos últimos años, la zona se encuentra con problemas sociales. Otra comunidad de importancia microendemica para *Leishmania (V) braziliensis*, son las comunidades de Ivochote, Alto Ivochote, que se encuentran dentro de la jurisdicción del Puesto de Salud de Ivochote.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

CONCLUSIONES

1. En la Micro Red de Kiteni- La Convención – Cusco, se determinaron por caracterización molecular por la técnica PCR-RFLP hsp70 Hae III, la presencia 3 especies de Leishmania: *Leishmania (V) braziliensis* mayoritariamente, seguida por *Leishmania (V) guyanensis* y *Leishmania (V) lainsoni* en pacientes con leishmaniosis.

2. Los pacientes con leishmaniosis presentaron lesiones cutáneas con mayor predominancia y lesiones mucosas 1 de cada 10, el tiempo de la enfermedad que presentaron las lesiones fueron menores de 3 meses, 1 de cada 8 pacientes refieren no haber recibido ningún tratamiento antileishmaniasica, y provienen de las jurisdicciones del Puesto de Salud de Ivochote, Centro de Salud de Kepashiato, Centro de Salud de Kiteni y Puesto de Salud de Kamankiriato, zona endémica.

3. El lugar de mayor contagio y variabilidad de cepas es la comunidad de Ozonampiato de la jurisdicción del Centro de Salud de Kepashiato, aislándose las cepas de *Leishmania (V) braziliensis*, *Leishmania (V) guyanensis* y *Leishmania (V) lainsoni,* seguida por la comunidad de Ivochote de la jurisdicción del Puesto de Salud de Ivochote.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

RECOMENDACIONES

1. Al Ministerio de Salud, proponer nuevos esquemas de tratamiento de acuerdo a las especies de ***Leishmania*** existentes en las zonas endémicas así como una farmacovigilancia

2. A las Universidades, Institutos de Enfermedades Tropicales e Instituto Nacional de Salud, donde realizan investigaciones en enfermedades tropicales como la leishmaniosis, generan nuevos conocimientos en prevención, diagnósticos, tratamiento, control vectorial y otros, deben transferir y capacitar al Personal de Salud de zonas endémicas, por ser un problema en salud pública y de carácter epidemiológica, fomentando proyectos de investigación multidisciplinarias, para su posterior formulación de directrices nacionales.

3. A las Instituciones Educativas de los Centros Poblados del distrito de Echarati, de la unidad de Gestion Educativa Local La Convención – Cusco, dentro de su programa curricular de nivel primaria y secundaria, incorporar Educación Sanitaria para la prevención y control de la enfermedades tropicales como la leishmaniosis a través de un proyecto de intervención, por ser una zona de endémica de alto riesgo, con apoyo de especialistas del Ministerio de Salud, Universidades, Gobierno Local.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

PROPUESTA

I. ASPECTOS GENERALES

1.1. NOMBRE DEL PROYECTO:

Educación sanitaria para la prevención de Leishmaniosis en la Micro Red de Kiteni La Convención Cusco**.**

Presentación

Las enfermedades metaxenicas, en el Perú, en los últimos tiempos constituyen un problema de salud pública de importancia nacional, que afectan a las poblaciones más pobres, de menos acceso y están catalogadas entre las enfermedades reemergentes.

La leishmaniosis es uno de los 5 problemas de salud abordados desde la Estrategia de Salud Nacional de Prevención y Control de las Enfermedades Metaxenicas y Otras Transmitidas por Vectores, cuyo incremento en la transmisión e incremento de los factores de riesgo, ha hecho prioritario su abordaje.

Con relación a la afectación por grupos etéreos, este es similar para todos los grupos, observándose últimamente un giro hacia el menor de 14 años y al en edad productiva, sin embargo constituye un grupo de mayor riesgo los niños, madres gestantes y ancianos. Una explicación de este fenómeno se debe a que la población infantil, por la crisis económica que afecta a nuestro país, se está integrando a temprana edad en la PEA lo cual los hace más vulnerables a estos daños, expresando indirectamente que las poblaciones de menores recursos serían mayormente las afectadas.

El control de la leishmaniosis requiere el desarrollo de actividades de información y educación que fomenten la participación de la

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

población en la reducción del impacto de los factores de riesgo para la transmisión de la enfermedad.

Es necesario que la población que vive o circula por áreas de riesgo conozca bien las características de la enfermedad, la dinámica de la transmisión, los vectores y los reservorios relacionados y las formas clínicas existentes, además de comprender el impacto negativo de esta enfermedad en la salud.

Es útil proporcionar información sobre los mecanismos individuales de protección, evitar la penetración en zonas muy boscosas e infestadas del vector, especialmente después del atardecer. Es necesario promover la identificación temprana de las formas cutánea y mucosa como mecanismo de control y prevención de la enfermedad en áreas de alto riesgo.

La participación de la población es fundamental para la detección de casos y para la movilización de las acciones de mejoramiento del entorno. Es en ese sentido que debe promoverse un trabajo articulado con todos los actores sociales involucrados con el problema y su solución. Para el presente Plan, se unen los esfuerzos de todas las instancias del Ministerio de Salud, Universidad, Ministerio de Educación y Comunidad a fin de lograr el objetivo común articulando la tecnología y los recursos disponibles.

En la Micro red de Salud de Kiteni, La Convención - Cusco la leishmaniosis es endémica, ataca a personas con escasos recursos económicos y a habitantes de áreas rurales que se ven obligados a ingresas a la selva en busca de mejoras económicas, ataca principalmente a varones adultos, la leishmaniosis al ser un problema de salud en los últimos años se trata de un fenómeno sanitario.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

BASE LEGAL

- D.S. Nº 013-2002-SA – Reglamento de la Ley del Ministerio de Salud.
- D.S. Nº 014-2002-SA – Reglamento de Organización y Funciones del Ministerio de Salud
- Ley Nº 27657, art. 5º - Ley del Ministerio de Salud
- R.M. Nº 729-2003-SA/DM- Modelo de Atención Integral de Salud
- R.M. Nº 771-2204/MINSA – Establecer las Estrategias Sanitarias Nacionales del Ministerio y sus respectivos órganos responsables

NORMAS

- Doctrinas, Normas y Procedimientos para el Control de la Tripanosomiasis o Enfermedad de Chagas en el Perú.
- Norma Técnica para el Diagnóstico y Atención Curativa de la Bartonelosis o Enfermedad de Carrión – NT Nº001-MINSA/DGSP-V.01
- Norma técnica para el Diagnóstico y Atención de la Leishmaniosis Tegumentaria en el Perú NTS N° MINSA/DGSP-V.01

DIRECTIVAS

- Directiva Nacional DGSP-PMMOEM-Nº 001-00. “Planificación y Programación del uso de mosquiteros para la prevencion y control de enfermedades metaxénicas”
- Directiva Conjunta DIGESA-DGSP-PCMOEM N° 001-2000 Vigilancia y Control Vectorial - Uso racional de plaguicidas para el control de vectores de la malaria y otras enfermedades metaxénicas”

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

II. OBJETIVOS:

2.1. OBJETIVO GENERAL:

Prevenir la leishmaniosis en la Micro Red de Kiteni La Convención – Cusco.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Capacitar a la comunidad escolar en la prevención de la leishmaniosis.
- Capacitar al personal de Salud de la Micro Red de Kiteni en el diagnóstico parasitológico y molecular de la Leishmania.
- Capacitar al personal de Salud de la Micro Red de Kiteni en la captura e identificación de los vectores y reservorios de Leishmania.

JUSTIFICACIÓN:

La educación sanitaria es un elemento esencial de todo programa de prevención y control de cualquier enfermedad. Para ello creemos que es de suma importancia trabajar con los niños de las Instituciones Educativas de la zona endémica de la Micro Red de Kiteni, porque los niños podrán en práctica sus conocimientos y reproducir la capacitación en sus padres y familiares. Se debe trabajar en coordinación con el Ministerio de Educación para incorporar dentro de su programa curricular Educación Sanitaria de enfermedades tropicales con la finalidad de implicar en los planes educativos las medidas de control y prevención de la leishmaniosis.

La capacitación al personal de salud, responsable del diagnóstico clínico y de laboratorio de enfermedades tropicales como *Leishmania*, ya que es una instancia decisoria para el tratamiento del paciente. Se cuenta con alianzas estratégicas como el Instituto de Enfermedades Tropicales y Biomedicina de Cusco, de la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco, cuenta con laboratorio de parasitología, entomológico y biología molecular implementada con personal capacitada.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

Las Instituciones Educativas y los Establecimientos de Salud de la Micro Red de Kiteni, están comprometidos a poder trabajar de forma articulada.

III. CONTENIDO:

3.1. CAPACITACIÓN A LA COMUNIDAD ESCOLAR:

- Coordinación con la Unidad de Gestion Local La Convención–Cusco.
- Autorización para dar la educación sanitaria a los estudiantes de las Instituciones Educativas de la Micro Red de Kiteni, La Convención, Cusco.
- Contenido:

CONCEPTUALES	PROCEDIMENTALES	ACTITUDINALES
Módulo I: • **Leishmaniosis** 1. Que es leishmaniosis 2. Modo de adquisición de la enfermedad	• Información completa sobre la leishmaniosis. • Identificación del vector. • Identificación de las formas de contraer la enfermedad.	• Toma de conciencia sobre el peligro que presenta en la salud de la población y sus consecuencias.
Módulo II: • **Medidas preventivas para controlar la enfermedad**	• Identificar los lugares donde pueden estar el vector. • Proteger las viviendas y realizar la limpieza de las viviendas de manera constante. • Tomar medidas preventivas si se presenta la enfermedad	• Toma de conciencia de la importancia en la limpieza, prevención, y protección de las viviendas.
Módulo III: • **Talleres de control y prevención de la enfermedad** 1. Talleres didácticos y prácticos con los estudiantes de los centros educativos	• Realizar talleres con material didáctico como folletos, gigantografias, dípticos, trípticos; para captar la atención de los estudiantes. • Focos grupales que permitan propuestas para el control y prevención.	• Los participantes deben mostrar una buena actitud, participar en los talleres para la mejora en la toma de medidas de prevención a la enfermedad.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

METODOLOGÍA

- **Charlas Informativas sobre la leishmaniosis:** Estas charlas consistirán en dar información a los estudiantes de los centros educativos sobre lo que es la enfermedad, como se transmite y que se debe hacer frente a ello.
- **Charlas Informativas sobre y control y prevención de las leishmaniosis:** Estas estarán dirigidas específicamente a las medidas que se deben tomar frente a la enfermedad, la manera de proteger su ambiente próximo.
- **Realización de Talleres para el control y prevención de la leishmaniosis:** Se realizaran dinámicas, en los cuales se verá la participación activa de los estudiantes.
- **Procesos de Retroalimentación:** Aquí se realizaran talleres que refuerce lo aprendido por los estudiantes.

SISTEMA DE EVALUACIÓN

- **Realizar Evaluaciones individuales:** Estas evaluaciones consistirán en encuestas que los estudiantes realizaran para ver el porcentaje de estudiantes que captaron mejor lo expuesto en las diferentes sesiones.
- **Observación:** Consistirá en la evaluación de cambio de actitudes.

VISITAS DE ASISTENCIA TÉCNICA

- Estarán basadas en el interés y entusiasmo que pusieron los estudiantes en las diferentes sesiones, se programará visitas de asistencia técnica a las viviendas de los habitantes de los centros poblados de la Micro Red de Salud de Kiteni.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

3.2. CAPACITACIÓN EN EL DIAGNOSTICO PARASITOLÓGICO Y MOLECULAR DE LEISHMANIA AL PERSONAL DE SALUD

- Coordinación con la Dirección General de Salud de Quillabamba.
- Autorización para la capacitación del personal de salud que designen.
- Contenido:

CONCEPTUALES	PROCEDIMENTALES	ACTITUDINALES
Módulo I: • **Sistema de Gestión de Calidad NTP/ISO-IEC17025.** • **Bioseguridad en laboratorios de Nivel III.**	• Manual de calidad de trabajo en laboratorio de diagnóstico de leishmaniosis. • Manejo de normas de bioseguridad de nivel III de material biológico.	• Toma de conciencia sobre el peligro que representa manejar microorganismos de nivel de bioseguridad III como *Leishmania (V) braziliensis.*
Módulo II: • **Atención de pacientes para el diagnóstico parasitológica de Leishmania.**	• Llenado de ficha epidemiológica. • Consentimiento y asentimiento informado. • Obtención de muestras para los diferentes métodos de diagnóstico parasitológico. • Lectura de resultados: Directo y cultivos. • • Mantenimiento de cepas: Preparación de material para hacer medios de cultivo USAMRU.	• Los participantes deben mostrar buena actitud y aptitud para poder participar en la capacitación.
Módulo III: **Diagnóstico y caracterización molecular de Leishmania.**	• Diagnóstico molecular por Reacción en cadena de la polimerasa. Aislamiento y purificación de DNA a partir de Biopsias. Electroforesis en gel de agarosa para cuantificación de DNA. Uso de Nanodrop • Aplicación de la PCR para diagnóstico de Leishmaniosis. Visualización de resultados en gel de agarosa. Uso de Documentador de Geles • Identificación molecular por PCR-RFLPs hsp70 Hae III.	Los participantes deben mostrar buena actitud y aptitud para poder participar en la capacitación.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

3.3. CAPACITACIÓN EN LA IDENTIFICACIÓN, TAXONÓMICA DE FLEBOTOMINEOS AL PERSONAL DE SALUD

CONCEPTUALES	PROCEDIMENTALES	ACTITUDINALES
Módulo I: • **Captura de Plebotomineos**	• Colecta con trampa Shannon con cebo humano protegido • Colecta con trampa de luz tipo CDC • Preparación de muestras de Phlebotomineos para la identificación taxonómica de los mismos	• Los participantes deben mostrar buena actitud y aptitud para poder participar en la capacitación en campo.
Módulo II: • **Identificación taxonómico**	• Preparación de aclaramiento de vectores • Identificación morfológica de Phebotomineos	• Los participantes deben mostrar buena actitud y aptitud para poder participar en la capacitación en laboratorio de entomología.
Módulo III: • **Identificación de Diagnóstico y caracterización molecular de Leishmania aisladas a partir de vectores**	• Reacción en cadena de la polimerasa. Aislamiento y purificación de DNA a partir de Biopsias. Electroforesis en gel de agarosa para cuantificación de DNA. Uso de Nanodrop • Aplicación de la PCR para diagnóstico de Leishmaniosis. Visualización de resultados en gel de agarosa. Uso de Documentador de Geles • Identificación molecular por PCR-RFLPs hsp70 Hae III.	Los participantes deben mostrar buena actitud y aptitud para poder participar en la capacitación en laboratorio de biología molecular.

IV. BENEFICIARIOS DEL PROYECTO

4.1. EDUCACIÓN SANITARIA

Estudiantes del 5to y 6to grado de nivel primario y 4to y 5to del nivel secundario de las siguientes instituciones educativas:

- I.E. N° 50898 – Kiteni distrito de Echarati nivel primario.
- I.E. Miguel Grau Kiteni distrito de Echarati nivel secundario.
- I.E. 501108 de Ivochote distrito de Echarati nivel primario.
- I.E. Medio Urubamba de Ivochote distrito de Echarati nivel secundario.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

4.2. CAPACITACIÓN PERSONAL DE SALUD DE LA MICRO RED DE KITENI

Personal responsable de enfermedades metaxenicas y control vectorial de los Establecimientos de Salud de la Micro Red de Kiteni.

- Centro de Salud de Kiteni.
- Centro de Salud de Kepashiato.
- Puesto de Salud de Ivochote.
- Puesto de Kamankiriato.

V. UNIDAD FORMULADORA Y EJECUTORA:

5.1. La unidad formuladora estará a cargo de la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco, como proyección comunitaria.

5.2. La unidad ejecutora será los investigadores del Instituto Universitario de Enfermedades Tropicales y Biomedicina de Cusco de la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco.

VI. LUGAR DE EJECUCIÓN:

6.1. Instituciones educativas:

- I.E. N° 50898 – Kiteni distrito de Echarati nivel primario.
- I.E. Miguel Grau Kiteni distrito de Echarati nivel secundario.
- I.E. 501108 de Ivochote distrito de Echarati nivel primario.
- I.E. Medio Urubamba de Ivochote distrito de Echarati nivel

6.2. Establecimientos de salud:

Personal de salud de los Establecimientos de Salud.

- Centro de Salud de Kiteni.
- Puesto de Salud de Ivochote.
- Puesto de Salud de Kamanquiriato.

6.3. Laboratorio del Instituto de Enfermedades Tropicales y Biomedicina de Cusco de la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco.

- Laboratorio de Diagnostico gratuito de Leishmaniosis.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

- Laboratorio Parasitología.
- Laboratorio de Biología Molecular
- Laboratorio de Entomología.

VII. DURACIÓN

El proyecto tiene una duración de 1 año, se brindara la educación sanitaria cada fin de mes, se iniciara en abril a diciembre del 2014. De enero a marzo se realizara la preparación del material didáctico y de evaluación.

VIII. PRESUPUESTO:

El presente presupuesto será financiado por el Proyecto Canon: ECOEPIDEMIOLOGIA DE LA LEISHMANIOSIS DE LA MICRO RED DE KITENI DISTRITO DE ECHARATI, PROVINCIA DE LA CONVENCIÓN CUSCO.

ACTIVIDADES	PRESUPUESTO S/.
Coordinación interinsticucional: • Dirección General de Salud Cusco • Ministerio de Educacion: UGEL Quillabamba	3000
Preparación de material educativo validado: • Afiches. • Videos • Otros	20000
Intervención a la capacitación a todo costo: • 9 intervenciones a las instituciones educativas. • 6 capacitaciones al personal de los establecimientos de salud. • 4 capacitaciones al personal en laboratorios del IUETBC - UNSAAC	20000
Evaluación	5000
TOTAL	S/. 48 000

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

ANEXOS

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

PERFIL DE PROYECTO

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LOS CASOS DE ENDEMIA DE LEISHMANIOSIS DE LA MICRO RED DE KITENI – LA CONVENCIÓN – CUSCO 2010 – 2011

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

ÍNDICE

PAG.

I.- PREÁMBULO. 1

II. PLANTEAMIENTO TEORICO 3
1. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN 3
1.1. ENUNCIADO DEL PROBLEMA 3
1.2. DESCRIPCION DEL PROBLEMA 3
A.- Área del conocimiento 3
B.- Análisis de variables. 3
C.- Interrogantes básicas 4
D.- Tipo de investigación 4
E.- Nivel de investigación
1.3. JUSTIFICACIÓN DEL PROBLEMA 4
2. MARCO CONCEPTUAL 8
2.1. LEISHMANIA 8
2.1.1. Género *Leishmania* 8
2.1.2. Posición Sistemática 8
2.1.3. Ciclo biológico 11
2.2. LEISHMANIOSIS 14
2.2.1. Leishmaniosis cutánea 14
2.2.2. Leishmaniosis cutánea difusa 17
2.2.3. Leishmaniosis mucocutánea 17
2.3. GENÉTICA DE *LEISHMANIA* 21
2.3.1. DNA del Kinetoplasto 22
2.3.2. Proteínas de choque térmico de 70 kDa en *Leishmania* (HSP70) 22
2.4. DIAGNÓSTICO DE *LEISHMANIA* 23
2.4.1. Métodos Directos 23
2.4.1.1. Frotis de la lesión 23
2.4.1.2. Cultivo de *Leishmania* 24
2.4.1.3. Reacción de la cadena de la Polimerasa (PCR) 24
2.5. CARACTERIZACIÓN DE ESPECIES DE LEISHMANIA 24

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

2.5.1. Técnicas de fenotipificación para la caracterización de *Leishmania*. 24
2.5.2. Técnicas genotípicas de caracterización de *Leishmania* 25
2.5.3. Polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP) 26
2.6. ANTECEDENTES DE INVESTIGACIÓN 27
3. HIPÓTESIS 31
4. OBJETIVOS 31

III.- PLANTEAMIENTO OPERACIONAL 32
3.1. TÉCNICA E INSTRUMENTO 32
3.2. MATERIALES 37
3.3. CAMPO DE VERIFICACIÓN 39
3.3.1. Ubicación espacial 39
3.3.2. Ubicación temporal 41
3.3.3. Unidad de estudio 41
3.4. MÉTODOS 42
3.4.1. Convocatoria de pacientes en la Micro Red de Kiteni 42
3.4.2. Protocolo de trabajo 43
IV. CRONOGRAMA DE TRABAJO 50
V. BIBLIOGRAFÍA BÁSICA 51

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

I.- PREÁMBULO.

Las leishmaniosis es una zooantroponosis, causada por un protozoario del género Leishmania. Ésta enfermedad representa un problema médico y veterinario, con un mayor impacto en salud pública, ya que afecta a millones de personas, se estima que ocurre cada año 2 millones de casos nuevos en todo el mundo, de los cuales 1,5 millones son de leishmaniosis cutánea, reportado por la OMS en el año 2007.

En el Perú, se tienen cinco especies reportadas hasta la actualidad. En la región amazónica, tres especies han sido reconocidas como agentes de la leishmaniosis cutánea y mucocutánea: *Leishmania* (Leishmania) *amazonensis, Leishmania* (Viannia) *guyanensis* y *Leishmania* (Viannia) *braziliensis*, siendo esta última la de mayor importancia en la zona. En el distrito de Echarate, provincia de La Convención - Cusco, se ha reportado la presencia de *Leishmania* (Viannia) *guyanensis* y *Leishmania* (Viannia) *braziliensis* como agente causal de leishmaniosis.

La Región Cusco ha sido declarada como área de alto riesgo para leishmaniosis cutánea y mucocutánea, con más de 300 casos por cada 100000 habitantes para la forma cutánea y de 100 a más casos por cada 100 000 habitantes de la forma mucocutánea, El distrito de Echarate, de la provincia de La Convención reporta casi la cuarta parte de casos para la región, reportado por RENACE en 2009.

Actualmente el diagnóstico de la enfermedad se basa en criterios clínicos y de laboratorio. Los exámenes de laboratorio son el examen directo o frotis y cultivo, la desventaja de ambos es la baja sensibilidad, lo cual está relacionado a diversos factores entre los que se encuentran, el tiempo de la lesión, la ubicación de la misma y también la destreza del analista al realizar la toma de muestra y la respectiva lectura. Para mejorar el diagnóstico de laboratorio, a nivel mundial se vienen desarrollando técnicas de Biología Molecular tales

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), técnicas de hibridación (*Southern blot*), y otras variaciones de la PCR como PCR-Elisa.

El diagnóstico oportuno permite al paciente recibir tratamiento de forma inmediata. Al respecto, se mencionan que uno de los factores para la falla en el tratamiento con antimoniales, es la especie de parásito de *Leishmania* infectante. Es por ello que se hace necesaria la caracterización molecular de las diferentes especies de *Leishmania,* responsables de la enfermedad en las distintas zonas endémicas. El método estándar para la caracterización de cepas de *Leishmania* es la electroforesis de isoenzimas, además de ésta técnica se han desarrollado otros métodos inmunológicos, genéticos y moleculares; en éste último grupo se encuentra la técnica de polimorfismos en la longitud de fragmentos de restricción (RFLP) cuyas siglas provienen del inglés Restriction Fragment Length Polymorphism.

En el presente trabajo de investigación, la autora realizará el trabajo de investigación, con el fin de determinar la caracterización molecular de especies de *Leishmania*, de casos de endemia de leishmaniosis predominantes de la Micro red de Kiteni entre los años 2010 y 2011.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

II. PLANTEAMIENTO TEORICO.

1. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN.

1.1. ENUNCIADO DEL PROBLEMA.

Caracterización molecular de especies de Leishmania de los casos de endemia de leishmaniosis de la Micro Red de Kiteni – La Convención – Cusco 2010 - 2011

1.2. DESCRIPCION DEL PROBLEMA

A.- ÁREA DEL CONOCIMIENTO

- Campo : Ciencias de la Salud.
- Área : Salud Pública
- Línea : Enfermedades metaxénicas.
- Tópico : Caracterización de especies.

B.- ANÁLISIS DE VARIABLES.

OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES.

VARIABLE	INDICADORES	SUBINDICADORES
Caracterización molecular de especies de Leishmania	Bandas de amplificación Determinaran las especies de *Leishmania*	
	Leishmaniosis: **Tipo de lesión** **Tiempo de lesión** **Tratamiento anti leishmaniásica**	 Cutánea Mucosa Menores de 3 meses 3 a 6 meses 7 a 12 meses Más de 1 año Si no
	Lugar de contagio	*Comunidades de la Micro red de Kiteni*

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

C.- INTERROGANTES BÁSICAS:

¿Cuáles son las especies de Leishmania caracterizadas por PCR – RFLPs, utilizando el gen Hsp 70 con la enzima de restricción Hae III para casos endémicos de leishmaniosis de la Micro Red de Kiteni?

¿Cuáles son las especies más predominantes de *Leishmania* según el tipo, tiempo de lesión y tratamiento de leishmaniosis de la Micro Red de Kiteni?

¿Cuáles son las especies más predominantes de *Leishmania* según el lugar de contagio de la Micro Red de Kiteni?

D.- TIPO DE INVESTIGACIÓN:

Laboratorial, de corte transversal, observacional.

E.- NIVEL DE INVESTIGACIÓN:

El nivel de investigación es descriptivo

1.3. JUSTIFICACIÓN DEL PROBLEMA

Relevancia humana

La leishmaniosis es causada por un protozoario parásito del género *Leishmania,* perteneciente a la familia Trypanosomátidae, es considerada como una enfermedad olvidada a nivel mundial, ya que más de 12 millones de personas se encuentran infectadas y se citan 2 millones de casos nuevos cada año. Esta enfermedad afecta a las poblaciones más pobres de los países en vías de desarrollo y en 88 países la enfermedad es considerada como endémica, reportado por la OMS en 2007.

Esta enfermedad tiene una amplia gama de síntomas clínicos y se manifiesta de diferente manera según la especie de *Leishmania* infectante. Esta es el causante de severas infecciones que afectan la piel, órganos internos y mucosas. En Perú se encuentran dos formas de la enfermedad, la

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

leishmaniosis andina (uta) y la leishmaniosis selvática (espundia), reportado por la OMS en 2010.

La prevalencia de la leishmaniosis viene en aumento los números de casos, debido a los cambios ambientales provocados por el hombre; la extracción de madera, minería, ampliación de áreas de cultivo, creación de sistemas de irrigación, construcción de carreteras en bosques primarios, son las principales causas para el aumento de la exposición humana al mosquito vector, donde se observar la expansión geográfica de la enfermedad, convirtiéndose como una patología emergente por la urbanización de estas y el incremento en la con infección con el VIH, siendo este una prioridad para el sistema de salud.

La Provincia de La Convención por sus características ecológicas de temperatura y humedad constituye una zona endémica de la leishmaniosis. Echarate continua siendo el distrito con mayor número de casos de leishmaniosis mucocutánea, notificando aproximadamente la cuarta parte de los casos reportados a la Dirección Regional de Salud de Cusco- DIRESA Cusco en 2011.

En las investigaciones realizados por Llanos (2008) determinó que las fallas en el tratamiento antimonial para leishmaniosis cutánea, comparando el tratamiento en *Leishmania (V) braziliensis* y *Leishmania (V) guyanensis*, donde confirman la necesidad de tipificar las especies infectantes de esta enfermedad y la alta vulnerabilidad de los pobladores de zonas endémicas.

Relevancia científica.

Actualmente el diagnóstico de la enfermedad en el Ministerio de Salud en Cusco se basa en criterios clínicos y de laboratorio. Los exámenes de laboratorio que se realizan en los establecimientos de Salud, el examen directo o frotis y en algunos establecimientos pruebas inmunológicas como la Leishmanina, este primero tiene baja sensibilidad del 20 al 30% se sensibilidad, que dependerá de la toma de muestra, tipo de lesión, tiempo de lesión. El

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

Laboratorio Referencial de la Región de Salud Cusco, realizan la prueba de Inmunofluorescencia, prueba inmunológico que dependerá de los niveles de anticuerpos que presente el paciente, siendo esta también una prueba indirecta.

El Instituto Universitario de Enfermedades Tropicales y Biomedicina de Cusco de la UNSAAC, como proyección social a la comunidad se realiza el examen parasitológico como examen directo y cultivo, presentando esta ultima mayor sensibilidad que el examen directo, de igual manera dependerá de los factores mencionados como tipo y tiempo de lesión para emitir los resultados se debe esperar hasta 28 días por el tiempo de cultivo. Así mismo viene investigando pruebas moleculares e inmunológicas.

Para mejorar el diagnóstico de laboratorio, a nivel mundial se vienen desarrollando técnicas de Biología Molecular tales como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), técnicas de hibridación (*Southern blot*), y otras variaciones de la PCR como PCR-Elisa. Es por ello que se hace necesaria el diagnóstico molecular de la enfermedad utilizando la técnica de PCR convencional usando cebadores MP que tiene la característica de amplificar con material génico del genero *Leishmania*. Así mismo utilizando la técnica de RLFPs (Polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción) utilizando enzimas de restricción Hae III y gen obtenido Hsp 70 obtenido del ADN del kinetoplasto del parasito para la caracterización molecular de las especies de *Leishmania*.

Relevancia social

El impacto de esta enfermedad es la segunda en nuestro país después de la malaria, debido a su amplia distribución y su impacto en la comunidad, así como el sistema de salud. El enfermo sufre marginación, rechazo de su propia familia, comunidad, siendo este un problema psico-social, produciéndoles

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

muchas veces mutilaciones deformantes que ellos mismos empiezan a discriminarse en la sociedad.

Siendo la leishmaniosis una enfermedad laboral, por ello el diagnóstico oportuno permite al paciente recibir tratamiento de forma inmediata. Al respecto Llanos, en el año 2008, mencionan que uno de los factores para la falla en el tratamiento con antimoniales es la especie de parásito de *Leishmania* infectante, las co- infección de bacterias y hongos que pueden presentar las lesiones.

Según los reportes epidemiológicos, Cusco ocupa el segundo lugar con mayor incidencia de leishmaniosis cutánea y el primer lugar con mayor incidencia de leishmaniosis mucocutánea, el distrito de Echarate, provincia de La Convención es la que reporta el mayor número de casos para los años 2007 - 2008. (RENACE, 2009) y de estas reporta más del 50% de los casos la Micro Red de Kiteni.

Originalidad

Este estudio de diagnóstico e identificación molecular de la *Leishmania* en pacientes clínicamente diagnosticados leishmaniosis en la Micro Red de Kiteni, se identificaran las especies de *Leishmania* predominante, en vista que el Ministerio de Salud tiene implementado las pruebas parasitológicas directa en todos los puestos y centros de salud, el diagnostico inmunológico por IFI solo se realiza en el Laboratorio Referencial de la Región de Salud Cusco.

Viabilidad

La ejecución del presente trabajo de investigación es viable, debido a que se cuenta con la autorización de la Dirección General de Salud de Cusco, para la intervención en los establecimientos de Salud de la Micro red de Kiteni. Así mismo se cuenta con el consentimiento informado de los pacientes y el apoyo del Instituto Universitario de Enfermedades Tropicales y Biomedicina de Cusco

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

de la Universidad de San Antonio Abad del Cusco, subvencionado por el proyecto AECID “Control de leishmaniosis en el departamento de Cusco).

Aporte:

El aporte del presente trabajo de investigación es determinar las especies de *Leishmania* predominantes en la Micro Red de Kiteni, utilizando herramientas moleculares lo cual permitirá, un tratamiento adecuado para los pacientes en esta zona endémica.

Motivación:

El presente estudio se realiza con el fin de poder obtener el grado académico de Master en Salud Publica.

2. MARCO CONCEPTUAL

2.1. LEISHMANIA

2.1.1. Género *Leishmania*.-

Leishmania es un protozoario dimórfico perteneciente a la familia Trypanosomátidae, morfológicamente todas las especies son similares, con diferencias en el comportamiento biológico, inmunológico, tipo de enfermedad y distribución geográfica. Existen en todo el mundo cerca de 30 especies que infectan a los animales, de las cuales 21 pueden infectar al hombre. En el nuevo mundo, existen reconocidas un total de 20 especies, llamadas *Leishmania* neotropical, de las cuales 14 son conocidas que infectan al hombre[1]

2.1.2. Posición Sistemática.-

Leishmania presenta pocos criterios morfológicos que ayuden a su clasificación. El criterio inicial que se utilizó fueron las características extrínsecas como por ejemplo las manifestaciones clínicas, factores geográficos, factores epidemiológicos, y otros. Sin embargo se trata de

[1] WORLD HEALD ORGANIZATION, Working to overcome the global impact of neglected tropical disease. 2010

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

variables poco constantes que dependen del estado inmunológico del huésped humano, las especies y el comportamiento del vector.

La posición sistemática *Leishmania* según la Organización Panamericana de Salud del año 1996[2] es la siguiente:

Reino Protista (Haecker, 1986)

Subreino Protozoa (Goldfuss, 1817)

Phylum Sarcomastigophora (Honigberg y Balamuth, 1963)

Supbhylum Mastigophora (Diesing, 1866)

Clase Zoomastigophora (Calkins, 1909)

Orden Kinetoplastida (Honigberg, 1963. Vickerman, 1976)

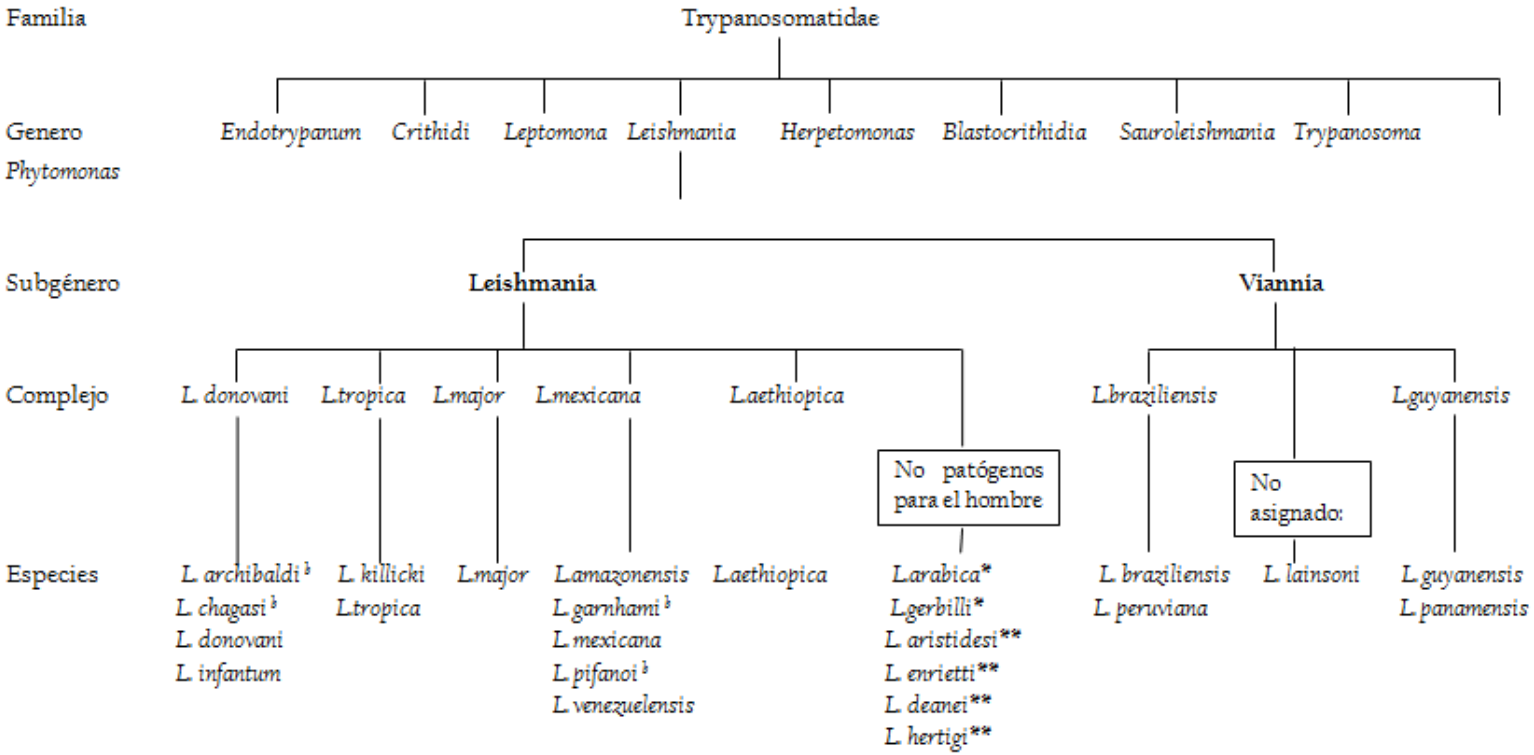
Familia Trypanosomatidae (Döflein, 1901. Grobben, 1905)

Género *Leishmania* (Ross, 1903)

[2] WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO) Control de Leishmaniosis. 1990

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

ESQUEMA N° 01: TAXONOMÍA DEL GÉNERO *Leishmania* (WHO 1990)



[a]Clasificación de géneros y subgéneros basados en caracteres extrínsecos y la de los complejos basada en caracteres intrínsecos (isoenzimas)
[b]Algunos investigadores no las consideran especies distintas
*Especies del viejo mundo **Especies del nuevo mundo.

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

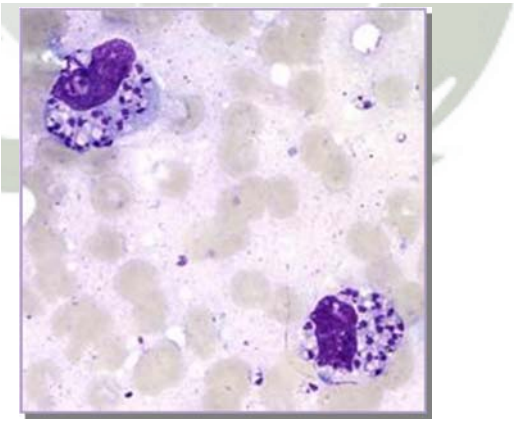
UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

2.1.3. Ciclo biológico.-

El ciclo evolutivo de *Leishmania* transcurre en dos huéspedes: un vertebrado (hombre y otros mamíferos susceptibles) y un invertebrado (insecto hembra hematófago del género *Lutzomiya,* nuevo mundo y *Phlebotomus* en el viejo mundo). En el flebótomo se desarrollan dos formas evolutivas en el tubo digestivo: una forma flagelada llamada promastigote, con capacidad de multiplicarse por división binaria longitudinal y otra forma que se diferencia morfológica y fisiológicamente para pre adaptarse al hospedero mamífero en la forma promastigote metacíclico[3]

Los amastigotes son intracelulares, redondeados o fusiformes, de una longitud de 3 a 5µm y una anchura de entre 1.5 y 2.5 µm. En su citoplasma contiene un núcleo voluminoso y esferoidal, generalmente excéntrico y un kinetonúcleo anterior que es la observación conjunta del blefaroplasto del flagelo y de una mitocondria modificada a kinetoplasto. La forma amastigote es la que se encuentra en los monocitos y macrófagos, están adaptados a la temperatura corporal y al medio ácido de este, aquí residen y se multiplican por división simple.

FOTOGRAFÍA N°01: AMASTIGOTES DE *Leishmania* spp.



Fuente: Propia

[3] CUBA, A. Diagnostico parasitológico de la Leishmaniasis tegumentaria americana. Rev. Med. Exp. 2000:17 (1-4).

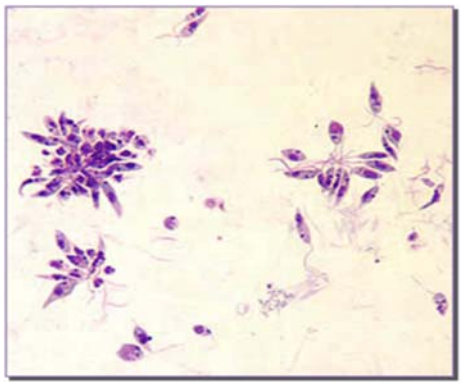
Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

Los promastigotes son de forma extracelular *metacíclica* infectante presente en el intestino medio del hospedador invertebrado, fusiforme, móvil y de un tamaño entre 10 y 30 µm de longitud y 1.5 y 3 µm de anchura, con un núcleo oval central y un kinetonúcleo bastoniforme claramente pre núclear y flagelo anterior libre, son alargados con un flagelo bien desarrollado, que usan tanto para la propulsión como para fijarse a las micro vellosidades del intestino del mosquito. Cuando los estadios intermedios llegan a promastigotes metacíclicos, migran hacia la probóscide del vector y son inoculados cuando éstos intentan tomar sus alimentos. Tanto los amastigotes como los promastigotes se dividen repetidamente por fisión binaria longitudinal [4]

FOTOGRAFÍA N° 02: PROMASTIGOTE DE *Leishmania.*



Fuente: propia

El ciclo biológico (Figura N° 01), empieza cuando el insecto pica un vertebrado susceptible, las formas metacíclicas son inoculadas en la piel y dermis, y son fagocitadas por las células del sistema fagocitario mononuclear (SFM). Las células invadidas permiten la transformación de las formas flageladas en formas amastigotes, en el interior de las vacuolas parasitóforas. Los amastigotes de *Leishmania* tienen la capacidad de evadir la acción parasiticida de las células del SFM y además de multiplicarse por división binaria simple asexuada. Muchas

[4] ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE SALUD Leishmaniosis and Leishmaniasis/HIV co-infection. WHO/CDS/CR/2000.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

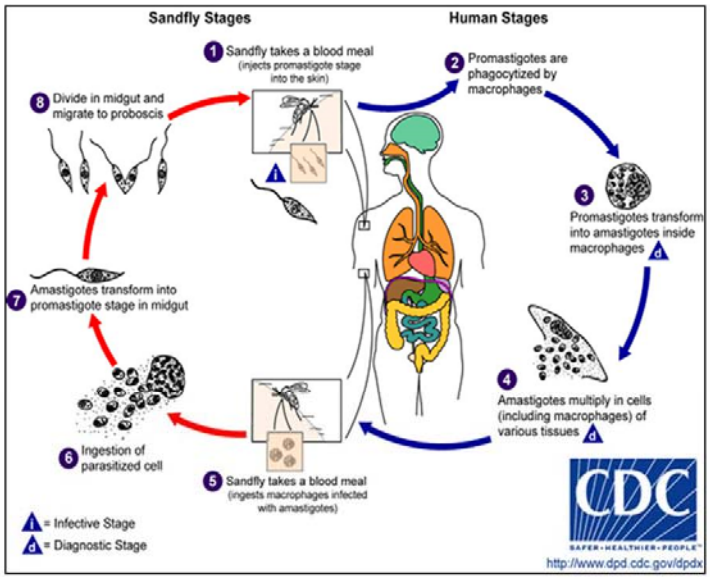
REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

de esas células liberan los amastigotes, en tanto que otras células, fagocitan los parásitos diseminando así el parasitismo en los tejidos, nódulos linfáticos y otras localizaciones tegumentarias.

En los seres humanos la mayoría de infecciones de *Leishmania,* conllevan a casos asintomáticos; sin embargo cuando se declara la enfermedad, esta se expresa en una variedad de formas clínicas: cutánea, mucocutánea y visceral. Por estas razones *Leishmania* es un modelo biológico complejo desde los puntos ecológicos, genéticos y filogenéticos[5]

FIGURA N° 01 CICLO BIOLÓGICO DE *Leishmania*



La leishmaniasis se transmite por la picadura de un flebótomo hembra. Los flebótomos inyectan la fase infectiva (promastigotes) cuando se alimenta de sangre. Los promastigotes son fagocitados por los macrófagos (2) y se transforman en amastigotes (3). Los amastigotes se multiplican en las células infectadas y afectan a diferentes tejidos, dependiendo en parte de la especie *Leishmania* infectante(4) origina las manifestaciones clínicas de la leishmaniasis. Cuando el insecto flebotomino vuelve a alimentarse de sangre de un huésped infectado ingiere macrófagos infectados con amastigotes (5)(6). En el intestino del flebótomo, los parásitos se diferencian en promastigotes (7), se multiplican y migran hacia la probóscide (8), cerrando de esta manera el ciclo biológico.

Fuente: Center of Disease Control and prevention

[5] BAÑULS A, HIDE M, PRUGNOLLE F. Leishmania and Leishmaniosis. A parasite genetic update and advances in taxonomy, Epidemiology and pathogenecity in human. Adv. Parasitol 2007

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

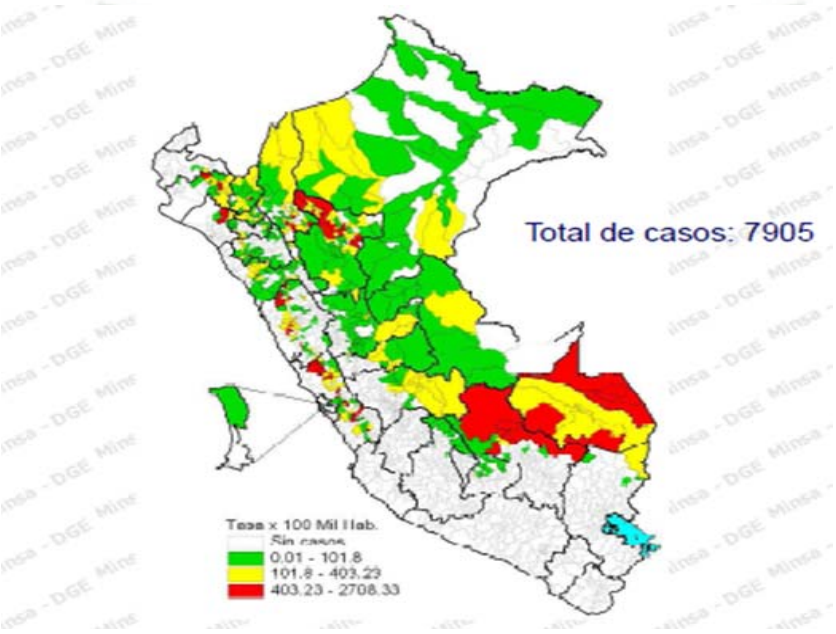
REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

2.2. LEISHMANIOSIS

Se considera que al menos 20 especies de *Leishmania*, son responsables de las cuatro formas clínicas con que puede presentarse la enfermedad: Leishmaniosis cutánea localizada, Leishmaniosis cutánea difusa, Leishmaniosis mucocutánea y Leishmaniosis visceral. Cada una de ellas con sus peculiaridades.

MAPA N° 01: DISTRIBUCIÓN DE *Leishmaniosis* POR DISTRITOS PERÚ 2011



Fuente: RENACE; 2009.

2.2.1. Leishmaniosis cutánea

Los agentes causales más comunes de la leishmaniosis cutánea son: *L.* (V.) *braziliensis, L.* (V.) *guyanensis, L.* (V.) *panamensis* y *L.* (L.) *mexicana*. Cada especie tiene diferente patrones epidemiológicos y demográficos. La aparición de estas lesiones está asociada a la picadura del vector, el periodo de incubación para desarrollar la enfermedad varía de semanas a meses, un trauma local puede activar una infección latente. Las primeras manifestaciones son pequeñas lesiones caracterizadas por máculas rosadas o rojas, pruriginosas, del tamaño de la cabeza de un alfiler o de una lenteja, que tiene semejanza a las

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

picaduras de los insectos. A los pocos días éstas se elevan y adquieren un carácter papuloso, con estas características de la lesión primaria, es difícil detectar esta patología en su fase inicial, pasando a veces desapercibida incluso por el propio enfermo, en promedio, después del período de incubación, esta lesión inicial se ulcera espontáneamente y se recubre de un líquido amarillento y adherente, que posteriormente da lugar a la costra. Debajo de esta costra, la lesión se extiende en superficie, profundidad, además pueden aparecer lesiones satélites que pueden unirse a la inicial y dan lugar a una gran ulceración

La úlcera característica es generalmente redondeada, indolora (aparentemente los parásitos de *Leishmania* poseen una toxina que afecta el nervio periférico), con bordes bien definidos, levantados e indurados y cortados en forma de sacabocado (Fotografía Nº 03), lo que hace que se asemeje a la imagen de un cráter. Cuando se desprende la costra se observa un fondo granuloso de color rojizo, limpio y exudando líquido no purulento. Sin embargo, cuando se presentan infecciones bacterianas oportunistas, esta úlcera puede volverse dolorosa, exudativa y purulenta.

La mayoría de las lesiones se curan espontáneamente durante un periodo de unos cuantos meses (a veces suele durar más de 12 meses), la cicatriz de leishmaniosis es típica ya que en el centro de la misma presenta una despigmentación y los bordes se mantienen pigmentados, esta cicatriz presenta adelgazamiento de la piel. Escuchar

Leer fonéticamente

Diccionario - Ver diccionario detallado

©2010Herramientas para empresasGoogle Translator ToolkitAcerca del Traductor de GoogleBlogPrivacidadAyuda

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

La forma cutánea puede producir hasta 200 lesiones y por lo tanto produce discapacidad, por otro lado el paciente se queda de forma permanente con cicatrices y puede llegar a ser excluido socialmente[6]

FOTOGRAFÍA N°03: LEISHMANIOSIS CUTÁNEA

Fuente: propia

Para el año 2008, RENACE informó casos probables y confirmados de leishmaniosis cutánea, la Red Nacional de Epidemiología que Cusco es una zona de alto riesgo, existen más de 300 casos por cada 100 000 habitantes y se encuentran distribuidos principalmente en el Valle de la Convención, tal como se muestra en el mapa de distribución de leishmaniosis cutánea.

Si bien es cierto se indica que el número de casos ha disminuido, también existen casos que no se notifican o no se llegan a diagnosticar; por lo tanto las estadísticas oficiales tienen un valor escaso para determinar el número real de enfermos.

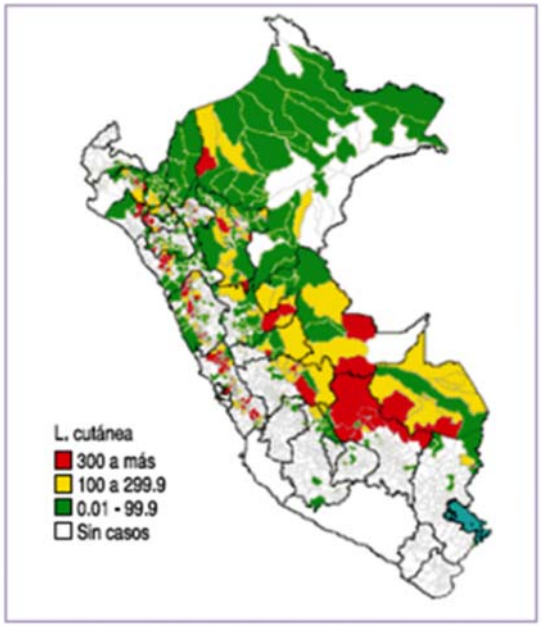
[6] WORLD HEALD ORGANIZATION, Working to overcome the global impact of neglected tropical disease. 2010

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

MAPA N° 02: DISTRIBUCIÓN DE LA *LEISHMANIO*SIS CUTÁNEA EN PERÚ



Fuente: RENACE; 2009

2.2.2. Leishmaniosis cutánea difusa.-

Se caracteriza por la presencia de nódulos aislados o agrupados, máculas, pápulas, placas infiltradas y en algunos casos lesiones verrucosas. Las lesiones muestran generalmente límites imprecisos que da un aspecto que recuerda a la lepra lepromatosa. La enfermedad se inicia bajo la forma de lesiones localizadas y poco a poco se disemina

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

por todo el cuerpo. Estas lesiones no curan espontáneamente y tienden a la recaída después del tratamiento[7]

2.2.3. Leishmaniosis mucocutánea.-

La forma mucocutánea es la forma crónica de la leishmaniosis, esta forma es la más predominante en Sudamérica, en efecto *L.* (V.) *braziliensis* y otras especies del parásito tales como: *L.* (V.) *panamensis, L.* (V.) *guyanensis* y *L.* (L.) *amazonensis* han sido relacionadas con esta forma.

Las lesiones mucosas pueden aparecer existiendo todavía las manifestaciones cutáneas o cuando estas ya han cicatrizado que es lo más frecuente. En los casos de lesiones mucosas ya no existe la tendencia a la cura espontánea, los pacientes que sufren de esta forma de la enfermedad generalmente son aislados y son víctimas del prejuicio y discriminación, debido a la mutilación y destrucción de los tejidos blandos.

La lesión mucosa se inicia en el septum cartilaginoso, cuando las lesiones están avanzadas, se presenta exudación, ulceración de toda la mucosa, ulceración del cartílago, y al destruir la mucosa del otro lado se produce la perforación que puede dar destrucción parcial o total del tabique, esto determina la caída de la punta de la nariz. Las lesiones en la boca comprometen generalmente al paladar, los pilares, la úvula y secundariamente vienen los procesos destructivos, las amígdalas raramente son afectadas, las lesiones del paladar son con más frecuencia proliferativas que destructivas, la úvula suele hipertrofiarse o ulcerarse y algunas veces puede desaparecer [8]

[7] WORLD HEALD ORGANIZATION, Working to overcome the global impact of neglected tropical disease. 2010

[8] GONZALES U et al. Interventions for American cutaneous and mucocutaneous leishmaniosis. Cochrane Library. 2009.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

Según datos de RENACE, la región del Cusco también notifica 100 o más casos por cada 100 000 habitantes de leishmaniosis mucocutánea tal como lo muestra el mapa de distribución de leishmaniosis mucocutánea.

FOTOGRAFÍA N° 04: LEISHMANIOSIS MUCOCUTÁNEA, PÉRDIDA DE LA ÚVULA

Fuente: propia

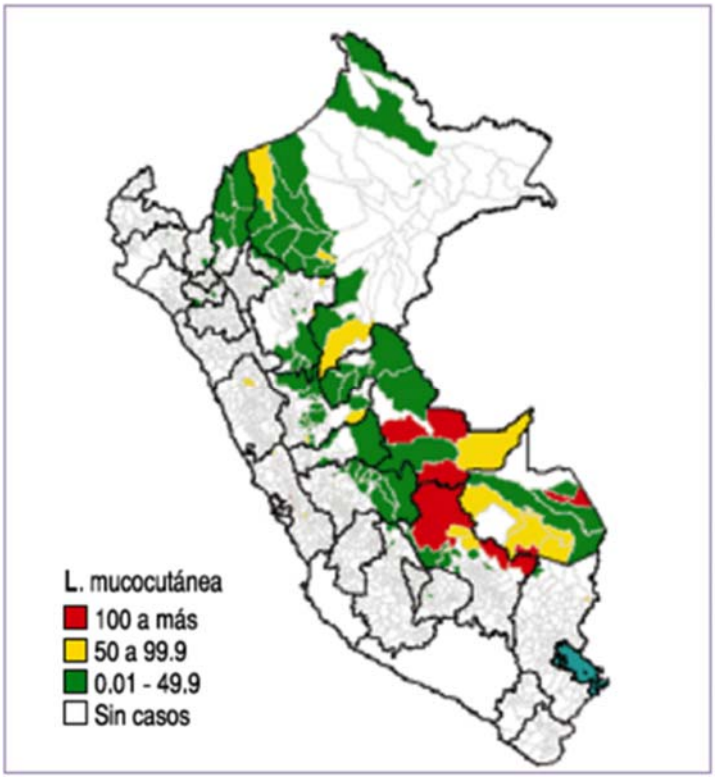
MAPA N°03: DISTRIBUCIÓN DE LA LEISHMANIOSIS MUCOCUTÁNEA EN PERÚ[9]

[9] RENACE Boletín epidemiológico Nº53 2009. Pp 1001-1004.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA



Fuente: RENACE 2009

Tabla N° 01: Leishmaniosis según departamentos Perú años 2004-2012 y 2013

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

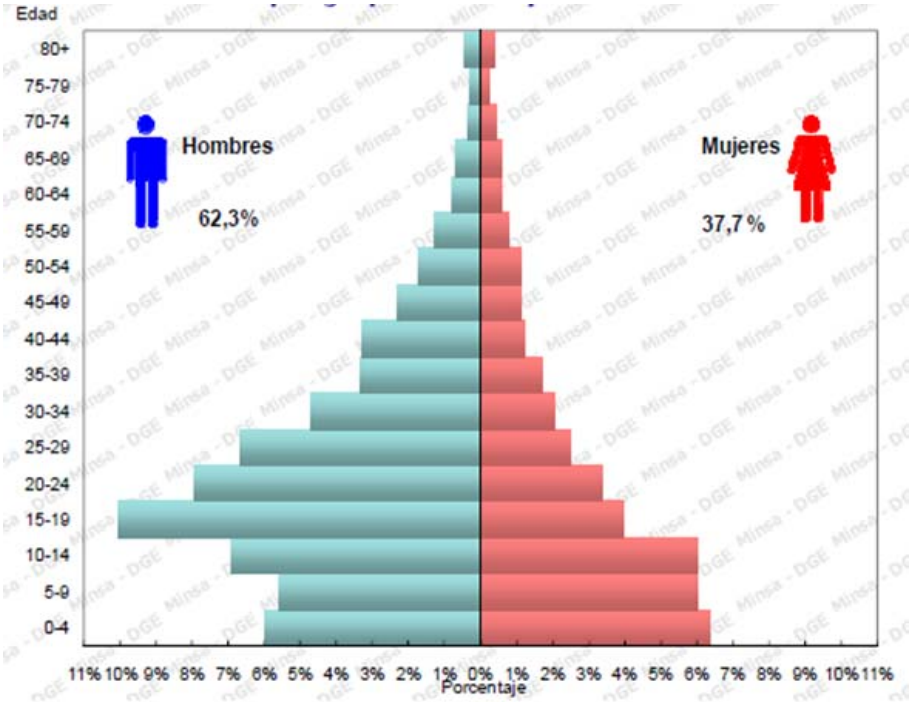
REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

DEPARTAMENTOS	AÑOS									
	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013*
SAN MARTIN	223	331	897	1758	881	392	1078	3192	554	2
CUSCO	772	962	1193	917	1081	985	999	967	940	27
CAJAMARCA	1182	1073	755	895	614	428	597	719	412	5
PIURA	469	620	754	1246	543	665	736	783	503	2
JUNIN	471	471	956	663	894	777	702	786	493	3
ANCASH	818	894	606	1051	739	357	412	172	248	2
MADRE DE DIOS	433	935	651	435	376	470	406	729	695	
LIMA	544	530	331	745	451	354	481	262	230	2
AMAZONAS	529	364	319	381	308	275	566	620	345	
LA LIBERTAD	323	386	255	961	455	355	382	242	221	1
HUANUCO	273	444	383	335	422	282	354	310	262	
LORETO	295	276	411	290	285	305	261	381	286	1
UCAYALI	150	235	231	120	137	123	171	137	166	
PASCO	192	176	193	110	106	142	172	152	132	2
LAMBAYEQUE	57	268	132	98	132	120	100	152	93	
PUNO	11	18	30	67	119	185	180	103	171	
AYACUCHO	72	66	100	64	76	65	60	73	70	1
APURIMAC	17	13	26	25	18	12	28	23	31	
HUANCAVELICA	5		3	2	3		4		2	
ICA									1	
AREQUIPA									1	
TUMBES									1	
MOQUEGUA										
CALLAO										
TACNA										
Total general	6836	8062	8226	10163	7640	6292	7689	9803	5857	48

Fuente: RENACE 2013

Figura N° 02: Leishmaniosis por grupo de edad y sexo. Perú 2011



Fuente: RENACE 2011

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

Datos obtenidos del boletín de RENACE muestran que el departamento de Cusco es una zona de alto riesgo para la leishmaniosis, además que el sexo masculino sigue siendo de alto riesgo.[10]

2.3. GENÉTICA DE *LEISHMANIA*

Los tripanosomátidos poseen dos genomas: DNA nuclear y DNA mitocondrial (DNA de kinetoplasto). El DNA del kinetoplasto constituye del 10 al 30 % del DNA celular total, es rico en A+T (72-73%) y está formado por numerosas moléculas de DNA circulares concatenadas entre sí como si fuera una red de círculos, que dependiendo de su tamaño reciben el nombre de maxi círculos y mini círculos. En los mini círculos están los RNA ribosomales (rRNA) y los RNA guías (gRNA), respectivamente. Los gRNAs juegan un papel importante en la edición de los RNA mensajeros (mRNA) mitocondriales[11]

En *Leishmania*, al igual que ocurre en otros trypanosomátidos, los genes que codifican proteínas carecen de intrones y se disponen en largas agrupaciones ordenados en *tándem*. Los distintos genes están separados entre sí por regiones cortas de DNA que constituyen las regiones intergénicas. Algunos genes poseen una única copia por genoma. Sin embargo, con frecuencia los genes presentan varias copias, siendo habitual que exista una elevada conservación en la secuencia de las regiones codificantes, encontrándose mayor divergencia en las regiones no traducidas 5'UTR y 3'UTR, como ocurre con los genes que codifican la histona H2A de *L. infantum*. En otros casos, como el gen que codifica la gp63, existen numerosas regiones variables, producto de recombinaciones intragénicas, que alternan con regiones conservadas, lo cual se relaciona con la heterogeneidad de las

[10] RENACE. Boletín epidemiológico 2013. http:/www.dge.gob/vigilancia/sala/2013/SE02/leishmaniasis.pdf

[11] BAÑULS A, HIDE M, PRUGNOLLE F. Leishmania and Leishmaniosis. A parasite genetic update and advances in taxonomy, Epidemiology and pathogenecity in human. Adv. Parasitol 2007

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

presiones selectivas y probablemente se pueden relacionar con la evolución adaptativa del parásito[12]

2.3.1. DNA del Kinetoplasto

Es una estructura celular inusual en la naturaleza que contiene 10^7 pares de bases de DNA mitocondrial o kDNA que representa hasta el 20% de todo el DNA del parásito. Está formado por una red de moléculas circulares, maxi círculos homogéneos y mini círculos heterogéneos, concatenadas de forma covalente. Los maxi círculos contienen una región conservada de 16-17 Kb y una región no codificante, que es altamente variable entre cepas y especies[13]

2.3.2. Proteínas de choque térmico de 70 kDa en *Leishmania* (HSP70).

Las proteínas de choque térmico son las que garantizan la termotolerancia de estos parásitos. Dentro de ellas, la familia de las proteínas HSP70 son proteínas conservadas a lo largo de la evolución y se presentan en todo tipo de organismos. Comprenden formas inducidas por la temperatura (HSP70) y proteínas que se expresan de forma constitutiva (HSC70).

Las proteínas pertenecientes a esta familia se localizan en una amplia variedad de compartimentos celulares, como: citoplasma (HSP70, HSC70), retículo endoplasmático, mitocondrias (mHSP70) y cloroplastos. Su estructura se caracteriza por la presencia de un dominio de unión al ATP en la mitad amino terminal, y una parte carboxilo terminal responsable de la unión a polipéptidos. Su actividad se basa en la unión, controlada por la hidrólisis de moléculas de ATP, a segmentos peptídicos hidrofóbicos. Un tipo en particular, las proteínas de choque térmico de 70 KDa (HSP70), están altamente conservadas tanto en los

[12] IVENS AC et al**.** The genome of the kinetoplastid parasite *Leishmania major*. Science 2005;309:436-42

[13] FLEGOTOV PN et al. The *Leishmania major* maxicircle divergent region is variable in different isolates and cell types. Mol Biochem Parasitol 2006;146:173-79.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

procariotas como en eucariotas, en lo referente a secuencia y función, y tiene gran importancia como chaperonas en el ensamblaje de proteínas y el transporte.

Basado en esta descripción, Folgueira C, Requena JM (2007) describen la organización genómica del *loci* HSP70 para otras especies y concluyen que *L.* (L.) *mayor*, *L.*(L.) *tropica* y *L.* (L.) *infantum* tienen una organización muy similar: varios genes organizados en tándem en su mayoría hsp70-I y una sola copia del tipo hsp70-II. En el caso de *L.* (L.) *mexicana* y *L.* (L.) *amazonensis*, tienen una organización idéntica entre ellas, con seis y siete genes hsp70-I y una copia hsp70-II, respectivamente, aunque difieren ligeramente de los anteriores al no compartir los mismos sitios polimórficos. *L.* (V.) *braziliensis* presenta la organización genómica más divergente entre las estudiadas, al presentar varias copias, aún no determinadas, del gen hsp70-I y ninguna del tipo hsp70-II. Algunos autores indican la presencia de una copia del gen (Zurita AI *et al* 2003), pero no se conoce aún si la organización génica del gen hsp70 en el subgénero Viannia ocurre del mismo modo que las especies del subgénero Leishmania[14]

2.4. DIAGNÓSTICO DE *LEISHMANIA*

2.4.1. Métodos Directos[15]

2.4.1.1. Frotis de la lesión

Este examen consiste en la realización de un frotis de exudado de la lesión o de la extensión tras punción-aspiración con una aguja fina del borde de la lesión, la tinción con Giemsa del frotis permite ver los amastigotes dentro o fuera de los macrófagos como cuerpos redondeados u ovales, de color azul claro, con un núcleo y un kinetoplasto, ambos de color púrpura, en el interior de su citoplasma.

[14] FOLGUEIRA C. et al. Genomic organization and expression of the Hsp70 loccus in New and Old World Leishmania species. Parasitology 2007.pp 369-377

[15] INSTITUTO NACIONAL DE SALUD Leishmaniosis, localización, diagnóstico y vigilancia epidemiológica. Serie Nº8, 2000.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

2.4.1.2. Cultivo de *Leishmania*

El cultivo de *Leishmania* consiste en el aislamiento de formas promastigotes in vitro a partir del material obtenido por aspirado de las lesiones mucosas y cutáneas, los medios más utilizados son los bifásicos con base de agar sangre y los medios líquidos enriquecidos con suero fetal bovino, USAMRU.

2.4.1.3. Reacción de la cadena de la Polimerasa (PCR)

Las técnicas de biología molecular permiten detectar porciones de ácidos nucleicos ADN o ARN que son específicos de cada microorganismo en diferentes materiales clínicos. Su aplicación en microbiología clínica surge como una necesidad para detectar microorganismos de difícil crecimiento en cultivos, o desarrollo tardío, y donde las técnicas serológicas de detección de antígenos y anticuerpos carecen de suficiente sensibilidad y especificidad diagnóstica.

Diversas zonas del genoma del parásito de *Leishmania* han sido útiles para el diseño de cebadores, la zona más utilizada para el diagnóstico de la enfermedad ha sido la de DNA del kinetoplasto (kDNA), su sensibilidad es idéntica o superior a la técnica de referencia (cultivo); esta sensibilidad está de acuerdo con la calidad y cantidad de muestra obtenida, respecto al frotis presenta mayor sensibilidad, y tiene la ventaja de tener los resultados de una forma rápida, actualmente esta técnica solo se usa en laboratorios especializados.

2.5. CARACTERIZACIÓN DE ESPECIES DE LEISHMANIA

2.5.1. Técnicas de fenotipificación para la caracterización de Leishmania.

Como ya se ha comentado, existen aproximadamente 20 especies de *Leishmania* capaces de causar alguna manifestación clínica de la enfermedad. La severidad de la manifestación clínica está ligada a muchos aspectos, donde uno de los principales es la especie infectante responsable. Por lo tanto desde el punto de vista epidemiológico, es

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

importante conocer la distribución de las especies en las diferentes zonas endémicas y desde el punto de vista clínico es importante para realizar el adecuado tratamiento a los pacientes así como realizar los controles periódicos que eviten complicaciones posteriores.

La clasificación taxonómica de *Leishmania* no está definitivamente cerrada, la clasificación se basa en métodos extrínsecos (basados en el fenotipo) y actualmente se utilizan los métodos de caracterización intrínsecos que analizan el genoma del parásito.

El análisis isoenzimático o *multilocus enzyme electrophoresis* (MLEE) es aún considerado el método estándar para la identificación de especies de *Leishmania.* El método se basa en la movilidad electroforética distinta de enzimas que tienen la misma función. La caracterización isoenzimática se lleva a cabo en diferentes soportes, como son acetato de celulosa, poliacrilamida y almidón, siendo este último el más utilizado y el que tiene mejor rendimiento.

Esta caracterización isoenzimática es una herramienta de referencia para estudios taxonómicos y epidemiológicos en *Leishmania* además de ser ampliamente utilizada en otros protozoos. El protocolo para la realización de isoenzimas está unificado en el sur de Europa, utilizando los mismos 15 sistemas enzimáticos y el almidón como sustrato. Mediante el uso de zimodemas, en el Nuevo Mundo se establecieron las diferencias bioquímicas entre *L.* (L.) *amazonensis, L.* (V.) *braziliensis y L.* (V.) *guyanensis*[16]

2.5.2. Técnicas genotípicas de caracterización de Leishmania

Son técnicas basadas en el análisis del genoma que, en principio, permanece invariable durante toda la vida del parásito; incluso cuando

[16] EVANS DA. Handbook on isolation, characterization and cryopreservation of Leishmania. 1989.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

ocurren cambios morfológicos a lo largo de su ciclo biológico, y aún bajo presión del sistema inmune del hospedador.

Hibridación con sondas de DNA.- La región más utilizada para la hibridación con sondas han sido los mini círculos de DNA del kinetoplasto (kDNA), puesto que contienen una región conservada, y están altamente repetidos. Este ensayo se basa en la especificidad de la interacción entre las bases complementarias, para lo cual se necesita una secuencia diana en uno de los fragmentos (obtenidas generalmente por digestión con enzimas de restricción) y un fragmento corto de DNA (sonda) que tenga una secuencia conocida y complementaria a la secuencia diana y que este marcado para poder detectarlo.

En taxonomía, el uso de estas sondas de kDNA ha permitido la separación de *L.* (L.) *mexicana* y *L.* (V.) *braziliensis*, y dentro del subgénero *Viannia* quedan incluidas las especies *L.* (V.) *braziliensis*, *L.* (V.) *guyanensis* y *L.* (V.) *panamensis* [17]

2.5.3. Polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP)

En general, detecta pequeñas variaciones en un gen concreto, ya que el producto amplificado es digerido con diferentes enzimas de restricción que reconocerán o no su diana dependiendo de estas variaciones nucleotídicas. El patrón de bandas que se visualiza tras la electroforesis es útil para distinguir especies del subgénero *Viannia*. Uno de los genes más utilizados en la caracterización y filogenia de *Leishmania* es el gen de la proteína de membrana de 63kDa, denominada gp63. [18]

También se entiende por PCR-RFLP la digestión de cualquier producto amplificado y que, al digerirlo, ofrece un patrón distinguible y diferente para cada especie o individuo, como pueden ser los mini círculos de

[17] IVENS AC et al**.** The genome of the kinetoplastid parasite *Leishmania major*. Science 2005;309:436-42
[18] VICTOR K et al. The gp63 gene locus, a target for genetic characterization of Leishmania belonging to subgenus Viannia. *Parasitology*. 1998

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

KDNA. Esta aproximación ha sido útil para la detección de *L.* (L.) *tropica* y posteriores estudios epidemiológicos.[19]

Las endonucleasas de restricción son capaces de encontrar dianas específicas en la secuencia de DNA (de 4 a 6 nucleótidos), y cortar en tantos fragmentos como dianas existan. Estos fragmentos se separan mediante electroforesis y se visualizan en geles de agarosa. En los tripansomátidos en general y en Leishmania en particular, la técnica de RFLP se ha venido realizando digiriendo el kDNA, los cuales presentan unos patrones útiles en el estudio de caracterización del parasito.

También se entiende por PCR – RFLP la digestión de cualquier producto amplificado y que, al digerirlo, ofrece un patrón distinguible y diferente para cada especie o individuo, como pueden ser los mini círculos de KDNA. Esta aproximación ha sido útil para la detección de *Leishmania tropica* y posteriores estudios epidemiológicos.

2.6. ANTECEDENTES DE INVESTIGACIÓN.

En la zona de estudio, motivo de la presente investigación, se han realizado estudios mediante técnica isoenzimática, pero no PCR-RFLPs; a continuación se resumen las investigaciones más relevantes.

[19] NOYES HA et al. Gene locus, a target for genetic characterization of Leishmania belonging to subgenus Viannia. *Parasitology*. 1998

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

Miranda H, Alfaro A, Lora C. 2003.[20] ESTUDIO COMPARADO DE MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO DE LA LEISHMANIASIS Y CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LOS AGENTES ETIOLÓGICOS EN LA LIBERTAD**.** Unidad de Biología Molecular, Instituto de Medicina Tropical e Infectología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional de Trujillo, Perú.

"Objetivo: Comparar el rendimiento del PCR frente al cultivo y examen directo en el diagnóstico de leishmaniosis.
Material y Métodos: Estudio analítico transversal, se estudió un total de 69 pacientes con antecedente de vivir en zonas endémicas de leishmaniosis en la Región La Libertad. Se procedió a tomar muestras de bordes de las lesiones por raspado profundo que abarcaba tejido, para el posterior análisis directo, cultivo en medio bifásico y PCR.
Resultados: La positividad del PCR alcanzó el 93%; el examen directo 85% y el cultivo, el 72%. La existencia de más de una especie además de L. peruviana es una probabilidad respaldada por el hallazgo de dos nuevos perfiles genéticos en el examen del DNA en casos de leishmaniosis de pacientes del distrito de Salpo provincia de Otuzco. No se ha podido establecer, por limitaciones de número de pacientes y de marcadores moleculares, la relación entre especies y variedades clínicas.
Conclusiones: El PCR presenta un mejor rendimiento como prueba diagnóstica. Este estudio preliminar muestra que la Leishmania que circula en las zonas endémicas tiene distintos perfiles de ADN"

Caballero M 2008. [21] ESTANDARIZACIÓN DE LA TÉCNICA DE ELECTROFORESIS DE ISOENZIMAS EN EL LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA E INMUNOLOGÍA DE LA FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS DE LA UNSAAC. Para optar el título profesional de Bióloga. En este trabajo de investigación se utilizaron 8 cepas de referencia de *Leishmania* y se caracterizaron 34 cepas del parásito

[20] MIRANDA H. ALFFARO A. LORA C 2003
[21] CABALLERO M. Tesis de licenciatura. 2008

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

aisladas de pacientes y 14 cepas aisladas del insecto vector. La zona de muestreo utilizada por la autora, fue el Distrito de Echarate, Provincia de La Convención, Departamento de Cusco, Perú. Los resultados indicaron, que el 96% de cepas aisladas tenían la identidad de *L.* (V.) *braziliensis* y el 4% correspondían a *L.* (V.) *guyanensis*.

Da Silva LA, de Sousa S, da Graca GC, Porrozzi R, Cupolillo E. 2010. [22]Secuencia de análisis y perfiles de PCR-RFLP del gen hsp70 como una herramienta valiosa para la identificación de especies de Leishmania asociados con leishmaniasis humana en Brasil. "Desde el primer informe del género Leishmania, muchas especies se han descrito. En Brasil, la leishmaniasis humana se ha asociado con ocho especies, siete de los cuales son responsables de la leishmaniasis cutánea (LC). En algunas zonas endémicas, LC está asociado con una sola especie, sin embargo, en otras áreas, tales como el Amazonas, la etiología de la LC se pueden asignar a varias especies. La mayoría de las especies de Leishmania fueron descritos por primera vez sobre la base de las características epidemiológicas y biológicas, las cuales fueron posteriormente corroborados por electroforesis de enzimas multilocus (MLEE), la técnica de referencia para la identificación de especies de Leishmania. En un intento de superar las limitaciones de MLEE, muchos métodos basados en PCR han sido desarrollados y utilizados para la identificación del parásito. En el presente estudio, se analizó la secuencia del gen hsp70 en especies de Leishmania asociados con la leishmaniasis humana en Brasil. Este análisis condujo a la identificación de enzimas de restricción que podrían ser utilizados para la PCR-RFLP basado en la identificación. Los resultados obtenidos estaban en completo acuerdo con los obtenidos por MLEE, lo que sugiere que el análisis de PCR-RFLP de hsp70 pronto podría reemplazar MLEE para la tipificación de Leishmania rutina".

[22] DA SILVA LA, DE SOUSA S, DA GRACA GC, PORROZZI R, CUPOLILLO E. 2010

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

Montalvo M 2011.[23] TIPIFICACIÓN DE ESPECIES DE LEISHMANIA DE IMPORTANCIA MEDICA BASADO EN EL GEN QUE CODIFICA LA PROTEÍNA HSP70 CITOPLASMÁTICA. Instituto de Medicina Tropical Pedro Kouri Departamento de parasitología – Cuba, para obtener el grado de doctor en Ciencias de la Salud. "Con el propósito de diseñar una propuesta que permita la identificación de las principales entidades taxonómicas de *Leishmania* en diversas áreas geográficas, se investigó el gen que codifica la proteína de choque térmico de 70KDa, se detectaron mediante la PCR 16 especies de importancia medica de este parasito, de las cuales 9 se estudian por primera vez con relación a este gen. Se obtuvieron y caracterizaron 44 secuencias nucleotidicas hsp70 y se realizó un análisis filogenético que constituyo un marco de referencia para la posterior discriminación. Se identificaron y seleccionaron los sitios polimórficos individuales más apropiadas para facilitar la tipificación de la mayoría de las especies o entidades taxonómicas de importancia médica de *Leishmania* para el Nuevo Mundo y Viejo Mundo, mediante digestión enzimática sucesiva del producto de PCR. Se diseñó un algoritmo teórico de tipificación que se corroboro a través del análisis de cepas referenciales y muestras biológicas de origen diverso, que permitió proponer la PCR-hsp70/RFLP, como herramienta para la identificación universal de *Leishmania*, lo cual resulta novedoso y de gran aplicación en países endémicos, centros de referencia o investigación y clínicos viajeros".

Pérez E. 2011.[24] CARACTERIZACIÓN MOLECULAR MEDIANTE RAPD DE CEPAS DE *Leishmania* AISLADAS DE PACIENTES DE LA MICRORED DE KITENI Tesis para obtener el título profesional de bióloga en la Universidad de San Antonio Abad del Cusco. "Mediante la técnica de Amplificación al azar de fragmentos polimórficos (RAPD), utilizando el cebador OPC-20, se logró diferenciar los aislamientos provenientes de pacientes de la Microred de Salud de Kiteni, se aislaron 48 cepas de *Leishmania* a partir de lesiones cutáneas y/o mucosas. Se

[23] MONTALVO M 2011
[24] PÉREZ E. 2011

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

estandarizó la técnica a las condiciones del Laboratorio de Inmunología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UNSAAC; para lo cual se utilizó el DNA de cepas de referencia correspondiente a *Leishmania* (V.) *braziliensis*, *Leishmania* (V.) *peruviana*, *Leishmania* (V.) *guyanensis*, y *Leishmania* (V.) *lainsoni*; los productos de amplificación se revelaron mediante el uso de geles de agarosa al 1.5%. Con ayuda del documentador de geles y el software *Quantity One*, se procedió a determinar el tamaño molecular de los productos de amplificación de cada una de las cepas problema y los patrones utilizados. Para realizar la evaluación cuantitativa, se procedió a construir una matriz básica de datos teniendo en cuenta la presencia (1) y ausencia (0) de los productos de amplificación; utilizando el software Past se procedió a hallar el índice de similitud utilizando el índice de Jaccard, es así que se encontraron: 18 cepas cuyos índices de similaridad se encuentran entre 0.6 y 1.0 que corresponden a *Leishmania* (V.) *braziliensis*, 3 cepas cuyos índices de similaridad están entre 0.5 y 0.8 que corresponde a *Leishmania* (V.) *guyanensis*, 2 cepas cuyos índice de similaridad es 1.0 que corresponde a *Leishmania* (V.) *lainsoni* y 25 cepas cuyos índices de similaridad no se asemejaron a ningún patrón usado en el estudio y se señalan como *Leishmania spp"*

3. HIPÓTESIS

No precisa por ser un trabajo de investigación de carácter descriptiva.

4. OBJETIVOS

- Determinar las especies Leishmania por caracterización molecular por la técnica de RFLPs utilizando el gen Hsp70 de los casos endémicos de leishmaniosis de la Micro Red de Kiteni.
- Determinar las especies de *Leishmania* según el tipo, tiempo de lesión, y tratamiento de leishmaniosis.
- Determinar las especies de *Leishmania* según el lugar de contagio de la leishmaniosis.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

III.- PLANTEAMIENTO OPERACIONAL

3-.1. TÉCNICA E INSTRUMENTO

Estructura del instrumento

VARIABLE	INDICADORES Y SUB INDICADORES	TECNICAS E INSTRUMENTOS	ESTRUCTURA DE INSTRUMENTO
Caracterización molecular de especies de Leishmania	• Bandas de amplificación. • Determinaran las especies de Leishmania por comparación por especies patrones.	**PCR-RFLP-hsp70 HaeIII** Ficha de datos de paciente para el diagnóstico para *Leishmania*	• Numeral V Resultados de Laboratorio.
	Leishmaniosis: **Tipo de lesión** • Cutánea • Mucosa **Tiempo de lesión** • Menores de 3 meses • 3 a 6 meses • 7 a 12 meses • Más de 1 año **Tratamiento anti leishmaniasica** • Si • No	Observación directa Ficha de datos de paciente para el diagnóstico para *Leishmania*	• Numeral VIII: Tipo de lesión. • Numeral IX: Descripción de lesión • Numeral III: Tratamiento.
	Lugar de contagio • Comunidades de la Micro red de Kiteni	Ficha de datos de paciente para el diagnóstico para *Leishmania*	• Numeral II: Datos del paciente.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

FICHA DE DATOS DE PACIENTES PARA EL DIAGNOSTICO PARA LEISHMANIA

Datos generales:

Fecha de admisión: ____/____/____ Código de viaje: | | **Código:** | |

Establecimiento de procedencia: _____

Datos del paciente:

Nombre y apellidos: _____

Fecha de nacimiento: ____/____/____ Edad:_____ Sexo: M( ) F ( )

Si es menor de edad, anotar el nombre del padre, madre y/o apoderado: _____

Lugar de:	Comunidad	Distrito	Provincia	Departamento	Mes y año	Permanencia
Nacimiento						
Procedencia						
Residencia						
Contagio 1						
Contagio 2						

Ocupación durante el contagio:

- Agricultor ( ) - Comerciante ( ) - Minero ( )
- Extractor de madera ( ) - Profesional ( ) - Su casa ( )
- Otros:_____

. Tratamiento:

Fármaco	L. Cutánea	L. Mucosa	Fecha	N ° Dosis	Días
Glucantime			/ /		
Pentostan			/ /		
Anfotericina			/ /		
Estibogluconato			/ /		
Plantas medicinales			/ /		
Otro:			/ /		

. Tipos de muestra:

Área – lesión	Frotis	Cultivo	PCR	Serología	Leishmanina

Resultados de laboratorio:

DIRECTO		CULTIVO		PCR		CARACTERIZACION MOLECULAR PCR-RFLP hsp70 Hae III	
Fecha	Resultado	Fecha	Resultado	Fecha	Resultado	Fecha	Resultado
/		/		/		/	
Resp.:		Resp.:		Resp.:		Resp.:	

. Responsable de la muestra: _____ Firma:_____

I. Aceptación del paciente: Firma: _____ Huella digital:

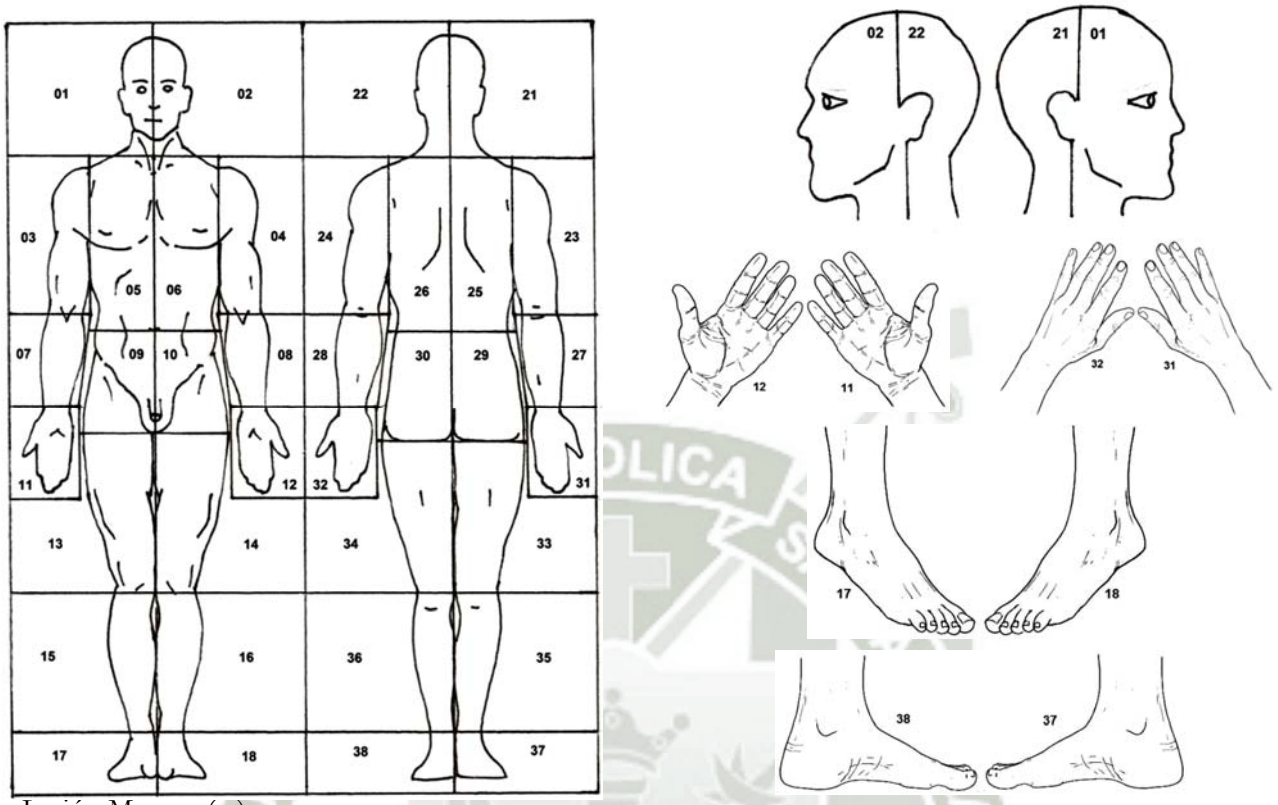
Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

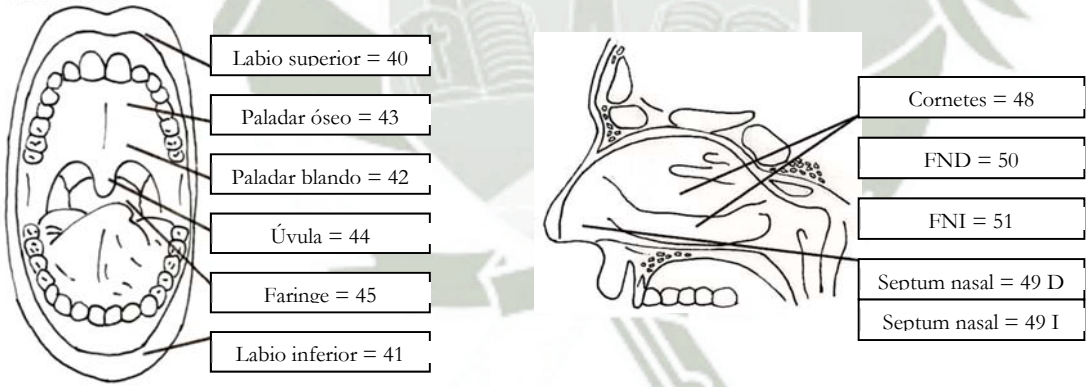
UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

VIII. Tipo de lesión:

a) Lesión Cutánea ( ):
Ubicación:



a) Lesión Mucosa ( )
Ubicación:



IX. Descripción de lesión:

Área Lesión	Aparición		Cicatrización	
	Fecha	Tamaño cm²	Fecha	Tamaño cm²
	/ /		/ /	
	/ /		/ /	
	/ /		/ /	
	/ /		/ /	
	/ /		/ /	
	/ /		/ /	

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

El instrumento utilizado ha sido diseñado por la autora del presente trabajo de investigación, tomando como base la ficha epidemiológica para el diagnóstico de Leishmaniosis planteado por el Instituto Nacional de Salud del Ministerio de Salud, la misma que fue aprobada por expertos el Instituto Universitario de Enfermedades Tropicales y Biomedicina de Cusco de la Universidad de San Antonio Abad del Cusco.

Cuenta con 9 numerales, las que son descritas de la siguiente manera:

I. **Datos generales**: Donde se consigna fecha de admisión, código del paciente que es de suma importancia para el trabajo en laboratorio para evitar los sesgos, establecimiento de salud de procedencia.

II. **Datos del paciente**: Se consigna los datos personales como Nombre y apellidos del paciente, fecha de nacimiento, edad y sexo. También se considera el lugar de nacimiento, procedencia, residencia y lugar de contagio que nos permitirá identificar las zonas de mayor riesgo, como dato complementario la ocupación laboral.

III. **Tratamiento**: Se consigna las drogas anti leishmaniasicas que pudieron recibir los pacientes, incluyendo la dosis y fichas de los tratamientos.

IV. **Tipo de muestra**: Aquí identificamos las muestras que se tomaron del paciente, con sus respectivas codificaciones de acuerdo a la ubicación de ellas, como Área de lesión, para el diagnóstico por frotis, cultivo y PCR.

V. **Resultado de laboratorio**: Estos datos nos permitirán determinar si el paciente tiene *Leishmania* y que a partir de los cultivos positivos podremos realizar la identificación molecular de las especies de *Leishmania*.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

VI. **Responsable de la toma de muestra**: Es para determinar la persona que haya realizado de toma de muestra.

VII. **Aceptación de paciente**: Se requiere la firma y huella digital del paciente si este es mayor de edad, en caso de ser menor de edad de los padres de familia y/o apoderado. En Anexo se incluye la ficha de consentimiento informado, solo con este documento debidamente firmada nos permite empezar con el procedimiento.

VIII. **Tipo de lesión**: Mediante un esquema se determina exactamente la ubicación de la (s) lesión (es) sean esta mucosa o cutánea, este permite una codificación específica.

IX. **Descripción de lesión**: Complementa la información del numeral VIII, además nos da la información del tiempo de lesión.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

3.2. MATERIALES

MATERIAL BIOLÓGICO:

TABLA N° 01: CEPAS DE REFERENCIA DE *Leishmania*

ESPECIE	CÓDIGO
Leishmania (V.) *braziliensis*	MHOM/BR/75/M2903
Leishmania (V.) *guyanesis*	MHOM/BR/75/M4147
Leishmania (V.) *peruviana*	MHOM/PE/L677
Leishmania (V.) *panamensis*	MHOM/PA/71/LS94
Leishmania (L.) *mexicana*	MHOM/BZ/82/BEL21
Leishmania (L.) *chagasi*	MHOM///PP75
Leishmania (V.) *braziliensis*	MHOM/PE/95/LQ2*
Leishmania (V.) *lainsoni*	MHOM/PAB2891*

Cultivo y biopsias de pacientes de pacientes provenientes de la zona endémica de la Micro Red de Kiteni, que acudieron de forma voluntaria al Centro de Salud de Kiteni, Puesto de Salud de Ivochote, Centro de Salud de Kepashiato y Puesto de salud de Kamankiriato, durante las convocatorias realizadas en el año 2010 y 2011.

Equipos y accesorios

- Microscopio binocular (Marca: LEICA CME, Modelo: 1349522X)
- Centrifuga refrigerada (Marca: SIGMA, Modelo: 1-15K)
- Baño maría (Marca: JSR, Modelo: JSWB-11T)
- Espectrofotómetro (Marca: THERMO, Modelo: Nanodrop 2000C)
- Termociclador (Marca: PERKIN ELMER, Modelo: GeneAmp PCR System 2400)
- Cámara de electroforesis (Marca: HOEFER, Modelo: HE99X)
- Fuente de poder (Marca: CONSORT, Modelo: EV-265)

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

- Digitalizador de imágenes (Marca: BIORAD, Modelo: Gel Doc^{TM}XR^{+})
- Balanza analítica (Marca: OHAUS, Modelo: Explorer)
- Cámara de Flujo Laminar (Marca: Telstar, Modelo: BIO-11-A)
- Refrigeradora (Marca: Coldex, Modelo: CH10P)
- Congeladora -20 °C (Marca. Coldex, Modelo: CA39)

Materiales para el aislamiento de cepas de *Leishmania*

- Tubos tapa rosca 13x100
- Jeringas hipodérmicas de 1 cc. y 3 cc.
- Medios de cultivo USAMRU.
- Solución salina con antibiótico 1% (Bencil penicilina sódica y Gentamicina)

Reactivos

Para el aislamiento DNA de *Leishmania*

- Tampón fosfato salino pH 7.4
- Tampón TELT
- RNasa (Roche)
- Proteinasa K (Roche)
- Fenol equilibrado de pH 8.0 (Sigma)
- Cloroformo (Merck)
- Alcohol isoamílico (Merck)
- Isopropanol (Merck)
- Etanol (Merck)
- Acetato de Sodio 3M (Merck)
- Agua bidestilada estéril

Para la PCR

- Tampón 5X Go-Taq Flexi buffer (Promega)
- $MgCl_2$ 25mM (Promega)
- Taq DNA Polimerasa 5U/µl (Promega)
- Desoxirribonucleótidos dATP, dTTP, dGTP, dCTP 100 mM (Promega)

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

- Agua bidestilada estéril.

Para electroforesis de DNA

- Tampón TAE 1X
- Marcador de peso molecular de 100 pb (Promega)
- Marcador de peso molecular de 23 kb (Promega)
- Tampón de carga 6X (Promega)
- Agarosa Estándar media EEO (Ecogen)
- Bromuro de Etidio (Sigma)
- Cebador o primers
- Cebador o primers Hsp70sen y Hsp70ant.
- Enzima de restricción: HaeIII.

Materiales complementarios

- Tubos de microcentrífuga de 1.5 mL.
- Tubos de reacción de PCR.
- Micropipetas de 20 µL, 100 µL y 1000 µL.
- Puntas de 10 µL, 20 µL y 1000 µL.
- Puntas con filtro de 10 µL, 20 µL y 1000 µL.
- Papel Aluminio.
- Guantes de látex.

Software

- Gene runner V 3.05.
- Software *Quantity One* 1-D Analysis *versión 4.6.9* (Biorad).
- Software PAST versión 2.16.

3.3. CAMPO DE VERIFICACIÓN.

3.3.1. Ubicación espacial

La provincia de La Convención se encuentra localizada en la parte nor-oriental del departamento de Cusco, ocupa la región de la selva alta, selva baja, con una superficie de 30,061.82 Km^2 y una población

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

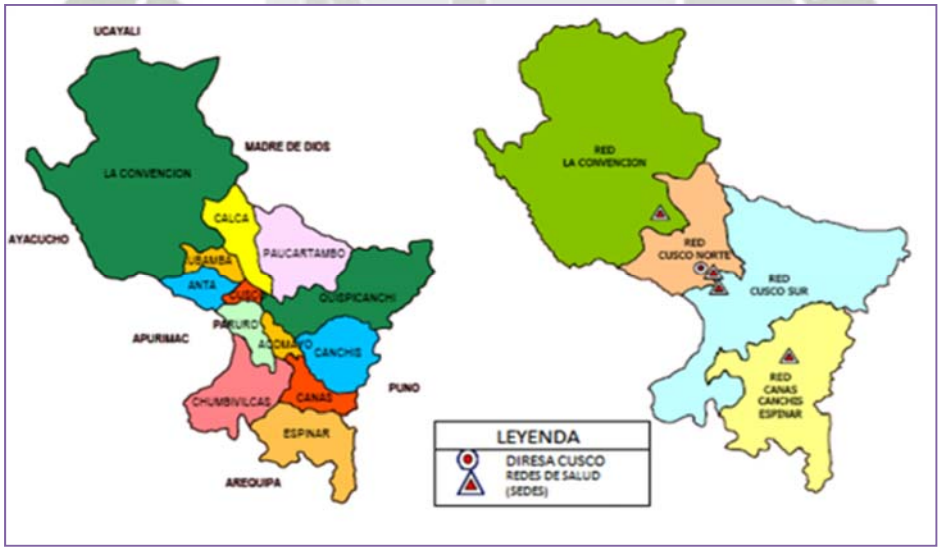
UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

aproximada de 166, 833 habitantes, de los cuales el 29.9% pertenece al área rural y el 70.1% pertenece al área urbana.[25]

El Plan de desarrollo Estratégico 2005-2012 señala que Echarate es el distrito más grande de la provincia de La Convención ubicada en ceja de selva, su extensión equivale a 65.1 % de territorio de la Convención con una superficie de 2'588,500 Ha, los poblados más resaltantes son: Palma Real, Kiteni, Kepashiato, Ivochote, Timpía, Kamisea, Kingueti, entre otros.

La parte experimental del presente trabajo, se realizara en el laboratorio del Instituto Universitario de Enfermedades Tropicales y Biomedicina de Cusco de la Universidad de San Antonio Abad del Cusco y la obtención de las muestras serán realizadas en los laboratorios de los Centro de Salud de Kiteni, Centro de Salud de Kepashiato, Kamankiriato e Ivochote de la Micro Red de Salud de Kiteni.

MAPA N^{O} 04: DIVISIÓN POLÍTICA Y ADMINISTRATIVA DE LA DIRECCIÓN REGIONAL DE SALUD (DIRESA)- CUSCO



Fuente: DIRESA- Cusco. Población proyectada 2011

[25] INEI Censo Nacional y Departamental de la provincia de La Convención 2007.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

La DIRESA Cusco tiene a su cargo 4 redes de servicios de salud, entre ellas se encuentra la red de Servicios de Salud La Convención está conformada por seis Micro Redes de Salud: Micro Red Santa Ana, Maranura, Quellouno, Pucyura, Kamisea y Kiteni; esta última tiene a si cargo 2 centros de salud (Kiteni y Kepashiato) con 9 Puestos de salud (Chontabamba, Kamanquiriato, Materiato, Pachiri, Pangoa, Saniriato, Selva Alegre, Yuveni e Ivochote)[26]

3.3.2. Ubicación temporal

Es trabajo de investigación por ser de carácter prospectiva se realizara entre los años 2010, 2011 a junio de 2012.

3.3.3. Unidad de estudio

3.3.3.1. Universo.

En el año 2010 acudieron a la convocatoria 85 pacientes y en el año 2011 acudieron 97 pacientes con diagnóstico clínico leishmaniosis los mismos que están distribuidos por establecimiento de salud en la tabla donde se indica el número de pacientes que acudió por establecimiento de salud en las seis convocatorias realizadas por año.

TABLA N°03: PACIENTES QUE ACUDIÓ A CADA ESTABLECIMIENTO DE SALUD POR CONVOCATORIA REALIZADA 2010

Fecha de Intervención Sanitaria	Nombre del Establecimiento de Salud			
	C.S. Kiteni	P.S. Kepashiato	P.S. Ivochote	**Total**
30 de mayo	02	05	02	09
20 de junio	04	04	06	14
18 de julio	07	05	05	17
29 de agosto	04	04	04	12
29 de setiembre	05	02	04	11
24 de octubre	05	04	03	12
Total	27	24	24	**75**

[26] DIRESA Población proyectada 2011.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

TABLA N°04: PACIENTES QUE ACUDIÓ A CADA ESTABLECIMIENTO DE SALUD POR CONVOCATORIA REALIZADA 2011

Fecha de Intervención Sanitaria	Nombre del Establecimiento de Salud				
	C.S. Kiteni	P.S. Kepashiato	P.S. Ivochote	P.S. Kamanquiriato	**Total**
29 de mayo	01	01	06	05	13
10 de julio	01	08	05	--	14
07 de agosto	02	07	03	06	18
04 de setiembre	01	03	10	00	14
09 de octubre	05	05	09	06	25
06 de noviembre	04	01	06	02	13
Total	14	25	39	19	**97**

En el presente trabajo de investigación para caracterizar las cepas de *Leishmania* por métodos moleculares se realizara a partir de los cultivos positivos del parasito obtenido de las lesiones de pacientes con diagnóstico clínico leishmaniosis.

3.4. METODOS

3.4.1. Convocatoria de pacientes en la Micro Red de Kiteni

Para lograr captar pacientes con leishmaniosis, previamente antes de cada viaje se realizó la convocatoria correspondiente mediante difusión radial tanto provincial como local. La difusión radial se realizó días antes de cada intervención con una frecuencia de 03 avisos por día. Se utilizó también la comunicación interna entre los puestos de salud de la Micro Red de Kiteni a través del personal del servicio de Laboratorio Clínico. Por otro lado se diseñó una gigantografía en la cual se colocó la fecha de la siguiente intervención las mismas que fueron colocadas a la entrada de los establecimientos de salud respectiva. También se utilizó como estrategia de difusión la entrega de comunicados a los alumnos en los cuales se mencionaba la fecha de la próxima intervención así como lugar y horario de atención, los mismos que fueron entregados por los profesores días antes

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

de la atención a pacientes. En todos los casos el objetivo estuvo direccionado a la mayor captación de pacientes que se encuentren afectados por la leishmaniosis.

Se programaron intervenciones sanitarias una vez al mes de preferencia un domingo de cada inicio de mes desde el mes de mayo hasta el mes de noviembre.

3.4.2. Protocolo de trabajo

A continuación se describirá cada uno de los pasos que se seguirá en la presente investigación, en el caso de las reacciones de PCR se utilizara cinco cepas de referencia como control positivo y agua grado PCR libre de nucleasas respectivamente como control negativo.

Obtención de muestras y cultivo de parásitos

Las intervenciones sanitarias consistieran en realizar la convocatoria de pacientes a través de distintos medios de comunicación y la atención de los pacientes en los establecimientos de Salud de Kiteni, Kepashiato e Ivochote de la Micro Red de Salud de Kiteni, distrito de Echarate, provincia de La Convención.

Las muestras biológicas (cultivos) se aislaran de pacientes con diagnóstico clínico de leishmaniosis. El primer paso consistirá en entregar un documento de consentimiento informado a cada uno de los pacientes, a los padres u apoderados en el caso de niños o adolescentes menores de edad, así mismo recibirán ayuda aquellos pacientes que no sabían leer. Una vez firmado el documento de consentimiento informado se realizara la encuesta para la recolección de datos epidemiológicos y finalmente se realizara la toma de muestra para el cultivo *in vitro* de acuerdo al siguiente procedimiento.

- Limpieza preliminar de la herida con abundante agua y jabón, quitar cuerpos extraños y suciedad de la misma y alrededores, si existe la

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

posibilidad de que se encuentre infectada o purulenta, presionar ligeramente y con fuerza, para extraer la pus en su totalidad.

- Con la jeringa de 3cc, absorber 0.5 ml de solución salina fisiológica con antibiótico al 1%, realizar isquemia en los bordes de la lesión, introducir el bisel en su totalidad.
- Realizar unos giros cuidadosamente alternando con los aspirados, coger un tubo con medio de cultivo (USAMRU), flamear la boquilla después de abierta y expulsar fuertemente la muestra obtenida en la jeringa dentro del tubo.
- Incubar los tubos a 24 ºC en incubadora.
- Los cultivos conteniendo las muestras se revisaran cada 3, 6, 9, 12, 15, 20 y 30 días.
- Una vez hallados los parásitos se procederá al mantenimiento de las muestras, mediante repiques sucesivos, realizando observaciones microscópicas para evaluar la cantidad y estado del parásito.

Todas las cepas aisladas serán incorporadas al cepario del Instituto Universitario de Enfermedades Tropicales y Biomedicina de Cusco de la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco.

Extracción de DNA

Basado en el método de solubilidad del DNA cromosomal de tripanosomátidos en la mezcla fenol/cloroformo/tritón/LiCl se seguirá el procedimiento modificado siguiente:

- Iniciar la extracción con 10^7 de promastigote.
- Centrifugar a 3 500 rpm por 10 minutos a 4 ºC.
- Descartar el sobrenadante y agregar un volumen de PBS, resuspender el pellet.
- Centrifugar a 3 500 rpm por 10 minutos a 4 ºC.
- Repetir los pasos 3 y 4, 2 veces para eliminar todo resto de agar.
- Resuspender el pellet en 300 µL de tampón TELT.
- Agregar RNasa a una concentración de 300 µg/mL e incubar a 37 ºC durante 1.5 horas.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

- Agregar proteinasa K a una concentración de 20 µg/mL e incubar a 56 ºC durante 30 minutos.
- Agregar 200 µL de Tris 10 mM pH 8.0.
- Agregar un volumen de fenol pH 8.0, agitar suavemente hasta que este blanco.
- Centrifugar a 13 000 rpm por 10 minutos a 4 ºC.
- Recoger la fase acuosa a un tubo de microcentrifuga, agregar un volumen de la mezcla fenol: cloroformo: alcohol isoamilico (25:24:1), agitar suavemente.
- Centrifugar a 13 000 rpm por 10 minutos a 4 ºC.
- Recoger la fase acuosa, agregar un volumen de cloroformo, agitar suavemente.
- Centrifugar a 13 000 rpm por 10 minutos a 4 ºC.
- Recoger la fase acuosa a un tubo de microcentrifuga, agregar un volumen de isopropanol a -20 ºC y 0.1 volumen de acetato de sodio 3M. Incubar a -20 ºC por 1 hora o toda la noche.
- Centrifugar a 13 000 rpm por 10 minutos a 4 ºC.
- Eliminar el sobrenadante y agregar 700 µL de etanol al 70% a -20 ºC, agitar suavemente.
- Centrifugar a 13 000 rpm por 10 minutos a 4 ºC. Descartar el sobrenadante, incubar a 37 ºC por 7 minutos en incubadora (ó dejar secar toda la noche a temperatura ambiente).
- Resuspender en 20 µL de agua ultra pura e incubar en baño maría a 40 ºC por 1 hora.

Cuantificación de DNA

El método para la determinación de la concentración de DNA se realizara midiendo la absorción de la luz ultravioleta a 260 y 280 ηm. Se utilizara el equipo espectofotómetro Nanodrop 2000c (Thermo), el cual además da la concentración de DNA en ηg/µl, indicara la calidad de la muestra obtenida, esta se informara mediante la relación A260/A280 que debe presentar

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

valores entre 1.8 - 1.9 que también demostrara la fiabilidad de la cuantificación[27]

PCR para amplificar un fragmento del gen hsp70

Para la amplificación del fragmento del gen hsp70, se preparara el master mix en una cámara de bioseguridad, y con el siguiente procedimiento:

	Componente	Concentración inicial	Concentración final	Volumen por reacción
Master mix	Agua para PCR	-	-	25.926 µL
	Buffer PCR 5x	5x	1x	10 µL
	$MgCl_2$	25 mM	1.5 mM	3 µL
	DNTPs	2 mM	200 µM	5 µL
	hsp70sen	10 pmol/µL	20 pmol	2 µL
	hsp 70 ant	10 pmol/µL	20 pmol	2 µL
	Taq polimerasa	5U/µL	0,37U	0.074 µL
	Muestra de DNA	3 ηg/µL	≈6 ηg	2 µL
	Volumen final			**50 µL**

Como controles positivo se incluirá DNA de *L.* (V.) *braziliensis* cepa M2903, *L.* (V.) *guyanensis* cepa M4147, *L.* (V.) *lainsoni* cepa PAB2891, *L.* (V.) *peruviana* cepa L677, *L.* (V.) *panamensis* cepa LS94, *L.* (L.) *mexicana* cepa BEL21 y como control negativo agua grado PCR. Cada reacción tendrá un volumen final de 50 µl, 48 µl de la mezcla y 2 µl del DNA extraído de cada muestra y de los controles.

[27] Sambrook, J. Rusell D. Molecular cloning.1989

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

Los ciclos térmicos de amplificación serán de 94º C por 5 minutos, 33 ciclos de 94º C 30 segundos, 63º C 1minuto y 72º C 1 minuto, con un paso final de amplificación de 72º C por 5 minutos.

Polimorfismo en los fragmentos de restricción (RFLP).

La digestión enzimática de los productos de amplificación se realizara siguiendo las indicaciones del fabricante, la misma que consistirá en utilizar tampones adecuados para cada enzima. En el proceso de estandarización, el uso de 160 ηg/µL de DNA a digerir, será la cantidad adecuada para una buena visualización de los productos de digestión.

Electroforesis en geles de agarosa.

Las electroforesis para observar los productos de amplificación de las PCRs, se realizaran en geles de agarosa al 1% en tampón TAE 1X, éste mismo tampón se utilizara en las cámaras de electroforesis. Para poder visualizar los productos de amplificación se añadirá bromuro de etidio a la agarosa fundida, cuando alcance una temperatura de 60° C. El bromuro de etidio es un componente que se intercala entre las bases nitrogenadas del DNA y que emite fluorescencia bajo la luz ultravioleta.

La preparación de la muestra previa a la siembra en los geles de agarosa, consistirá en mezclar 8 µL de agua pura con 2 µL de cada producto de PCR y 2 µL de tampón de carga 6X. Se usara como marcador de peso molecular de 100 pb ladder (Promega) y 23 000 pb ladder (Promega). La electroforesis se realizara a un voltaje constante de 90 voltios durante 1 hora y 20 minutos.

La visualización y evaluación de los productos de la digestión enzimática, se realizara en geles de agarosa a una concentración de 1.8 % en tampón TAE 1X. Del mismo modo que en el caso anterior, se añadirá bromuro de etidio en la agarosa cuando alcance una temperatura de 60° C. La preparación de las muestras tras la digestión consistirá en mezclar los 18 µL del producto de la digestión enzimática con un volumen de 3.6 µL de tampón de carga 6X. Se usara el marcador

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

de peso molecular de 100 pb ladder como estándar para medir los tamaños moleculares de los productos de digestión. La electroforesis se realizara a un voltaje constante de 90 voltios durante 1 hora y 30 minutos.

ANÁLISIS DE DATOS

Para visualizar tanto los productos de la PCR, como los productos de digestión enzimática, utilizaremos el equipo de digitalización de imágenes Gel doc XR^{+}. El equipo agrupa un transiluminador de luz ultravioleta con una cámara fotográfica, lo cual nos permitirá digitalizar la imagen del gel.

Evaluación de los RFLP con el software *Quantity One.*

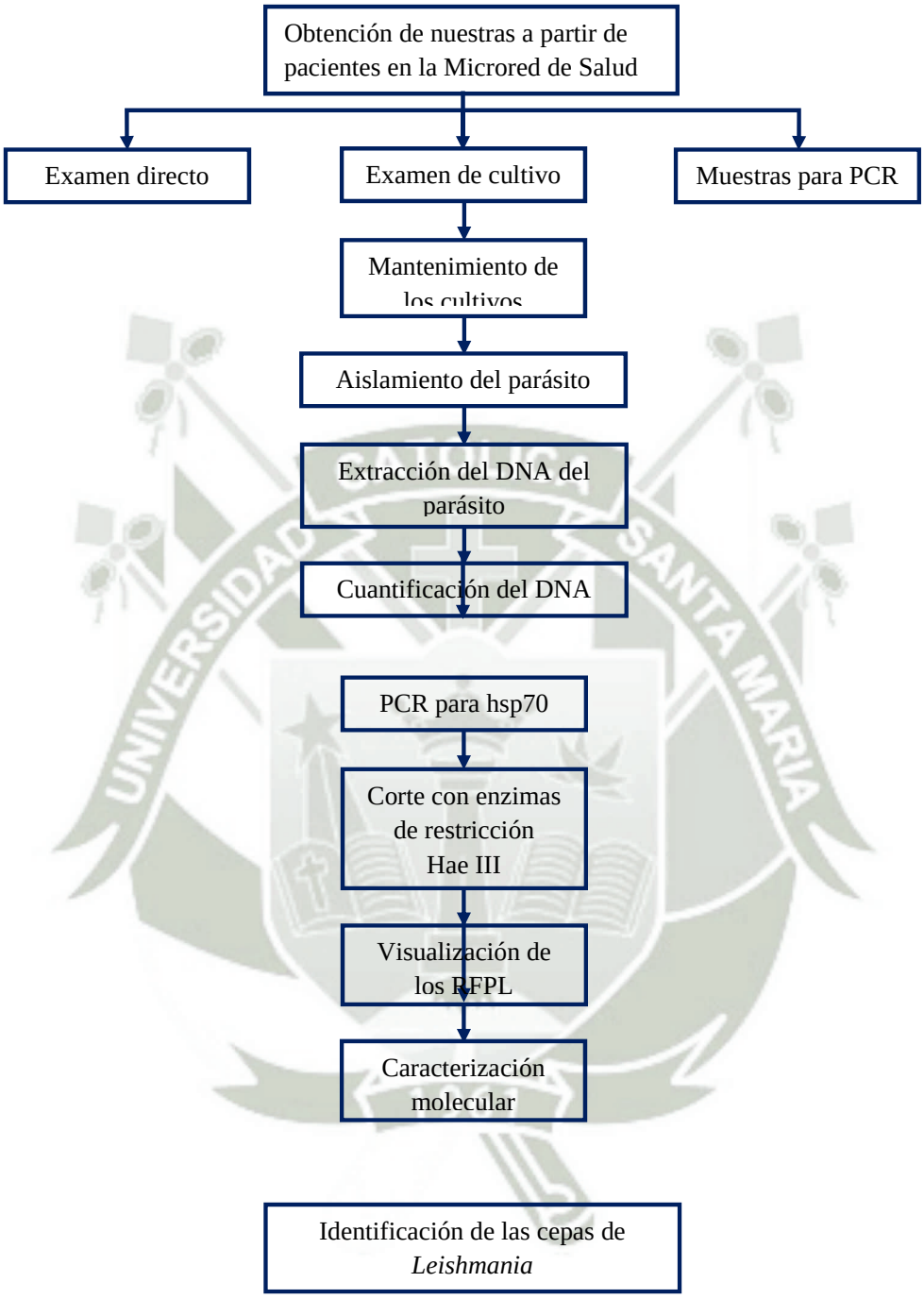
Los productos obtenidos en los geles de agarosa serán evaluados mediante el software *Quantity One,* este software nos permitirá medir no solo el tamaño molecular de las bandas del gel si no también nos permitirá conocer su concentración. En el caso particular de nuestro trabajo solo determinaremos el tamaño molecular. Primero se identificara a las bandas de los marcadores de tamaño molecular comercial utilizado, en nuestro caso se utilizara marcadores de la casa Promega y Roche. Con ayuda del programa informático se asignaran los tamaños que corresponde a cada banda de DNA, una vez definidos estos tamaños el programa informático calculara el tamaño molecular de las bandas de DNA presente en cada carril del gel y de este modo podemos conocer el tamaño de cada producto de digestión.

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE TESIS UCSM

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

FLUJOGRAMA N°1: ESQUEMA DE TRABAJO



Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

IV.- CRONOGRAMA DE TRABAJO

	2011									2012				
	ABR	MAY	JUN	JUL	AGO	SET	OCT	NOV	DIC	ENE	FEB	MAR	ABR	MAY
Revisión Bibliográfica	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X			
Intervención en la zona de estudio		X		X	X	X	X	X						
Diagnostico de los Pacientes con Leishmaniosis		X	X	X	X	X	X	X	X					
Caracterización molecular			X	X	X	X	X	X	X	X				
Análisis de resultados											X	X	X	
Informe Final														X

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

V. Bibliografía Básica

1. WORLD HEALD ORGANIZATION, Working to overcome the global impact of neglected tropical disease. First WHOreport on neglected tropical diseases. 2010

2. WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO) Expert Committes. Control of Leishmaniosis. Geneva 1990

3. CUBA, A. Diagnostico parasitológico de la Leishmaniasis tegumentaria americana. Rev. Med. Exp. 2000:17 (1-4).

4. ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE SALUD Leishmaniosis and Leishmaniasis/HIV co-infection. WHO/CDS/CR/2000.

5. BAÑULS A, HIDE M, PRUGNOLLE F. Leishmania and Leishmaniosis. A parasite genetic update and advances in taxonomy, Epidemiology and pathogenecity in human. Adv. Parasitol 2007

6. WORLD HEALD ORGANIZATION, Working to overcome the global impact of neglected tropical disease. First WHOreport on neglected tropical diseases. 2010.

7. WORLD HEALD ORGANIZATION, Working to overcome the global impact of neglected tropical disease. First WHOreport on neglected tropical diseases. 2010.

8. GONZALES U et al. Interventions for American cutaneous and mucocutaneous leishmaniosis. Cochrane Library. 2009.

9. RENACE Boletín epidemiológico Nº53 2009. Pp 1001-1004.

10. RENACE. Boletín epidemiológico 2013. http:/www.dge.gob/vigilancia/sala/2013/SE02/leishmaniasis.pdf

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

11. BAÑULS A, HIDE M, PRUGNOLLE F. Leishmania and Leishmaniosis. A parasite genetic update and advances in taxonomy, Epidemiology and pathogenecity in human. Adv. Parasitol 2007

12. IVENS AC et al**.** The genome of the kinetoplastid parasite *Leishmania major*. Science 2005;309:436-42

13. FLEGOTOV PN et al. The *Leishmania major* maxicircle divergent region is variable in different isolates and cell types. Mol Biochem Parasitol 2006;146:173-79.

14. FOLGUEIRA C. et al. Genomic organization and expression of the Hsp70 loccus in New and Old World Leishmania species. Parasitology 2007.pp 369-377

15. INSTITUTO NACIONAL DE SALUD Leishmaniosis, localización, diagnostico y vigilancia epidemiológica. Serie Nº8, 2000.

16. EVANS DA. Handbook on isolation, characterization and cryopreservation of Leishmania. 1989.

17. IVENS AC et al**.** The genome of the kinetoplastid parasite *Leishmania major*. Science 2005;309:436-42

18. VICTOR K et al. The gp63 gene locus, a target for genetic characterization of Leishmania belonging to subgenus Viannia. *Parasitology*. 1998

19. NOYES HA et al. Gene locus, a target for genetic characterization of Leishmania belonging to subgenus Viannia. *Parasitology*. 1998

20. MIRANDA H. ALFFARO A. LORA C 2003, Estudio comparado de métodos de diagnostico de la leishmaniosis y caracterización molecular

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

de los agentes etiológicos de la Libertad. Folia Dermatologica Peruana. 14(2) 2003: pp 18-23

21. CABALLERO M. Caracterización isoenzimática de cepas de *Leishmania sp.,* aisladas a partir de pacientes y vectores provenientes del distrito de Echarate- provincia de la Convención- Cusco. [Tesis de licenciatura]. Universidad Nacional de san Antonio Abad del Cusco.2008. Tesis de licenciatura.

22. DA SILVA LA, DE SOUSA S, DA GRACA GC, PORROZZI R, CUPOLILLO E. Sequence analysis and PCR-RFLP profiling of the hsp70 gene as a valuable tool for identifying Leishmania species associated with human leishmaniasis in Brazil. Inf. Genet. Evol. 2010. Pp77-83.

23. MONTALVO M Tipificación de especies de Leishmania de importancia medica basado en el gen que codifica la proteína Hsp 70 citoplasmática `(Tesis doctoral en Ciencias de la Salud) Inst. Med. Tropical Pedro Kuori. Habana 2011.

24. PÉREZ E. Caracterización molecular mediante RAPD de cepas de Leishmania aisladas de pacientes de la Micro red de Kiteni. (Tesis de licenciatura) Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad de San Antonio Abad del Cusco. 2011.

25. INEI Censo Nacional y Departamental de la provincia de La Convención 2007.

26. DIRESA Población proyectada 2011

27. SAMBROOK, J. RUSELL D. Molecular cloning. manual de laboratorio. Segunda Edición. Cold Spring Harbor Laboratory Press 1989

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis

REPOSITORIO DE
TESIS UCSM

UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE SANTA MARÍA

28. LLANOS-CUENTAS A, TULLIANO G, ARAUJO-CASTILLO R, MIRANDA-VERASTEGUI C, SANTAMARIA-CASTRELLON G, ET AL. Clinical and parasite species risk factors for pentavalent antimonial treatment failure in cutaneous leishmaniasis in Peru. Clin Infect Dis. 2008;46:223– 231

29. MINSA “Diagnóstico y tratamiento de la leishmaniosis en el Perú” NTS (2006).

Publicación autorizada con fines académicos e investigativos
En su investigación no olvide referenciar esta tesis