

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA  
Facultad de Ciencias y Humanidades



Epidemiología molecular de la Leishmaniosis cutánea en  
Guatemala durante el período 1980-2017 por medio del método  
*PCR-RFLP/hsp70*

Trabajo de graduación en modalidad de tesis presentado por  
Cristian José Ruiz Calderón  
para optar al grado académico de Licenciado en Bioquímica y Microbiología

Guatemala

2018



Epidemiología molecular de la Leishmaniosis cutánea en  
Guatemala durante el período 1980-2017 por medio del método  
PCR-RFLP/*hsp70*

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA  
Facultad de Ciencias y Humanidades



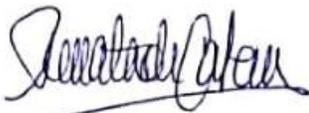
Epidemiología molecular de la Leishmaniosis cutánea en  
Guatemala durante el período 1980-2017 por medio del método  
PCR-RFLP/*hsp70*

Trabajo de graduación en modalidad de tesis presentado por  
Cristian José Ruiz Calderón  
para optar al grado académico de Licenciado en Bioquímica y Microbiología

Guatemala

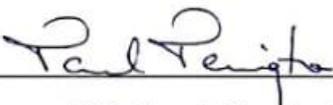
2018

Vo. Bo.:

(f)   
MSc. Renata Mendizábal de Cabrera

Tribunal Examinador:

(f)   
MSc. Renata Mendizábal de Cabrera

(f)   
PhD. Pamela Pennington

(f)   
PhD. Daya Lau

Fecha de aprobación: Guatemala, 5 de diciembre de 2018.

## AGRADECIMIENTOS

A Dios por permitirme llegar hasta este momento de mi vida

A mis padres y hermana menor: José Ruiz, Maricela Calderón y Masiel Ruiz, por su comprensión, amor incondicional, apoyo en mis decisiones y por creer siempre en mí

A la Fundación Juan Bautista Gutiérrez por toda la ayuda brindada durante estos cinco años de mucho aprendizaje, análisis introspectivo y consolidación de amistades

A mi asesora, Renata Mendizábal por siempre estar dispuesta a ayudarme en cada situación que se presentó dentro y fuera del laboratorio durante este año y por darme la oportunidad de trabajar a su lado

Al Centro de Estudios en Salud de la Universidad del Valle de Guatemala, por el apoyo económico, tanto con los reactivos como con el equipo utilizado para desarrollar esta investigación

Al equipo del Centro de Estudios en Salud, Lic. Carlos Serrano, Aurora Paniagua, Julio Illescas y Nazario López, por su apoyo en diferentes etapas del desarrollo de este trabajo de graduación

Al estudiante de la licenciatura en Bioquímica y Microbiología, Carlos Enríquez, por su constante apoyo en varios procedimientos necesarios para el procesamiento de las muestras analizadas en este trabajo

A todos los catedráticos del Departamento de Bioquímica y Microbiología y del Departamento de Biología, que, con su entusiasmo por la ciencia, me han mantenido motivado a lo largo de estos cinco años y me impulsan a ser mejor científico y sobre todo, un mejor ser humano. Con especial cariño a PhD. Dalia Lau, PhD. Diego Archila, Lic. Gonzalo Mejía, PhD. Krisztina Ríos, Lic. Elena Dardón y Lic. Andrés Ávalos

A mi directora de carrera, PhD. Pamela Pennington por sus consejos y supervisión a lo largo de la carrera, especialmente con el camino que iniciará después de la culminación de la licenciatura

A la MSc. Yunuen Soto, por su valiosa ayuda en el desarrollo del análisis *in silico*, de vital importancia para la elección de las enzimas necesarias para que el proyecto tuviera éxito

A la MSc. Ingrid Yurrita y Lic. Ana Luisa Mendizábal por permitirme trabajar tanto tiempo en el área de Química Analítica como de Análisis Instrumental. De ellas aprendí a siempre mostrar una actitud positiva frente a cualquier situación y a trabajar con la precisión necesaria para obtener los mejores resultados

A mis compañeras de promoción: Gaby, Paula, Ana Lucía, Quetzaly, Mariana, Elena y Katia por compartir tantas experiencias dentro y fuera del ámbito universitario y por consolidar amistades que perdurarán más allá del mundo de la ciencia

A mi grupo de amigos del Centro Universitario Ciudad Vieja: Romeo Mont, Bryan Chan, Allan Tun, Sergio De León, Christian Alvarado, Kervin Cardona, Carlos Figueroa y Manolo Capilla, por todas las experiencias compartidas y por ser los hermanos de los que nunca he dejado de sentir un compañerismo entrañable

A mis amigos y colegas auxiliares, Lic. Carlo Martínez, Lic. Jorge Chang, Ing. Alejandro Súchite, Mynor Ordoñez y Leonel Corado. Por haber formado a uno de los grupos de auxiliares que definitivamente pasará a la historia y por contribuir con mi formación como persona y como estudiante. De Carlo aprendí a reírme de mis errores y a tomar el sarcasmo como una virtud, de Chang aprendí a perder el miedo y lanzarse directo hacia lo que nos apasiona. De Súchite, aprendí a ayudar a los demás de la forma más incondicional posible y de Mynor y Leonel, aprendí a mantener una actitud positiva y que todo (casi siempre) se puede resolver con una plática y un poco de café

A todos los auxiliados que tuve la oportunidad de conocer en tres años y medio como auxiliar, por su curiosidad, por ayudarme a seguir aprendiendo y permitirme enseñarles un poco de lo que sé

A mis amigos Bioquímicos que ya son licenciados, Diane Ávalos, Andrea Cuadra, Santiago Rodas, Pablo De León, Guido Rossi y Sergio Sánchez (farmacéutico) que siempre han estado dispuestos a darme consejos y me han ayudado a crecer como persona

Muy especialmente, a mi novia, María Fernanda Poitevin, por su carácter, amor, y por siempre estar para mí cuando la necesito

# ÍNDICE

LISTA DE CUADROS.....	xiv
LISTA DE FIGURAS.....	xv
RESUMEN .....	xvi
I. INTRODUCCIÓN .....	1
II. OBJETIVOS .....	2
A. Objetivo general.....	2
B. Objetivos específicos.....	2
III. JUSTIFICACIÓN .....	3
IV. MARCO TEÓRICO .....	5
A. Generalidades de la enfermedad.....	5
B. Tipos de Leishmaniosis .....	5
1. Leishmaniosis visceral.....	5
2. Leishmaniosis cutánea.....	6
3. Leishmaniosis mucocutánea .....	8
4. Leishmaniosis cutánea diseminada.....	8
C. Ciclo de vida del parásito .....	10
1. Etapa en el insecto vector .....	10
2. Etapa en el hospedero mamífero .....	11
D. Distribución de la leishmaniosis cutánea .....	12
1. Nivel mundial .....	12
2. América .....	13
3. Guatemala.....	14
E. Diversidad genética .....	15
F. Organismos vectores .....	17
G. Animales reservorios.....	18
H. Tratamiento de la Leishmaniosis.....	19
1. Evaluación previa .....	19
2. Antimoniales pentavalentes.....	19
3. Anfotericina B .....	20
4. Pentamidina .....	20

5.	Tratamientos alternativos .....	20
I.	Diagnóstico .....	21
1.	Microscopía.....	21
2.	Cultivo <i>in vitro</i> .....	22
3.	Métodos moleculares.....	23
a.	MLEE (Electroforesis de enzimas multilocus) .....	23
b.	PCR y qPCR.....	23
c.	Análisis de polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP) .....	23
4.	Otros métodos.....	25
V.	METODOLOGÍA .....	26
A.	Sitio de estudio.....	26
B.	Sujetos de estudio.....	26
C.	Diseño, enfoque y tipo de investigación.....	26
D.	Tipo y tamaño de muestra .....	26
E.	Criterios de inclusión .....	28
F.	Variables .....	28
G.	Hipótesis.....	29
1.	Hipótesis nulas .....	29
2.	Hipótesis alternativas .....	29
H.	Instrumentos de medición .....	30
I.	Procedimiento .....	30
1.	Consideraciones éticas.....	31
2.	Análisis <i>in silico</i> para RFLP.....	32
3.	Extracción de ADN .....	33
4.	PCR anidado.....	33
5.	RFLP .....	35
6.	Electroforesis.....	35
a.	Electroforesis de productos de amplificación .....	35
b.	Electroforesis de productos de digestión para RFLP.....	35
7.	Validación de resultados por secuenciación .....	36
J.	Análisis de datos .....	36
1.	Análisis de patrones de restricción .....	36
2.	Elaboración de una serie de tiempo para proporción de especies de <i>Leishmania</i> sp.....	36

3.	Regresión logística multinomial .....	37
4.	Construcción de árbol filogenético .....	37
VI.	RESULTADOS .....	38
A.	Características de la muestra .....	38
B.	Análisis <i>in silico</i> para RFLP .....	38
C.	Extracción de ADN .....	43
D.	PCR anidado.....	43
E.	RFLP .....	44
F.	Validación de resultados de RFLP por secuenciación y análisis de homología (BLASTn) .....	47
G.	Elaboración de una serie de tiempo para proporción de especies de <i>Leishmania</i> sp.....	48
H.	Desarrollo de una regresión logística multinomial.....	49
I.	Construcción de árbol filogenético.....	51
VII.	DISCUSIÓN .....	54
VIII.	CONCLUSIONES .....	61
IX.	RECOMENDACIONES .....	62
X.	BIBLIOGRAFÍA.....	63
XI.	ANEXOS .....	71

## LISTA DE CUADROS

Cuadro 1: Cuadro comparativo de los tratamientos recomendados para Leishmaniosis cutánea.....	21
Cuadro 2: Distribución de las muestras seleccionadas para el estudio, tomadas previamente por el equipo de trabajo del CES-UVG en estudios y jornadas de diagnóstico. ....	27
Cuadro 3: Conceptualización y operacionalización de variables. ....	28
Cuadro 4: Primers para la amplificación de los fragmentos de ADN de interés. ....	35
Cuadro 5: Distribución en departamento y en década de las muestras con un resultado positivo por PCR. .	43
Cuadro 6: Resultados de la secuenciación y análisis de similitud de las muestras seleccionadas. ....	47

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Niños infectados con el parásito causante de Leishmaniosis visceral (kala-azar) .....	6
Figura 2: Úlcera producida por una infección de Leishmaniosis cutánea ( <i>Leishmania major</i> ).....	7
Figura 3: Especies de parásitos del género <i>Leishmania</i> causantes de la forma cutánea de la enfermedad.....	7
Figura 4: Manifestación clínica de la Leishmaniosis mucocutánea.....	9
Figura 5: Lesiones causadas por Leishmaniosis cutánea diseminada.....	9
Figura 6: Esquema del intestino donde se indica la formación de morfotipos de <i>Leishmania</i> .....	11
Figura 7: Ciclo de vida de los parásitos del género <i>Leishmania</i> durante su estadía en el insecto vector y en los hospederos mamíferos. ....	12
Figura 8: Distribución de Leishmaniosis cutánea alrededor del mundo.....	13
Figura 9: Distribución de los casos de Leishmaniosis cutánea reportados durante 2016 en América Latina	14
Figura 10: Indicador compuesto de la Leishmaniosis cutánea y mucocutánea en Guatemala. ....	15
Figura 11: Clasificación de los grupos existentes dentro del complejo <i>Leishmania</i> . ....	17
Figura 12: Mosca <i>Phlebotomus papatasi</i> alimentándose de sangre humana.....	18
Figura 13: Mamíferos identificados como reservorios de parásitos del género <i>Leishmania</i> .....	19
Figura 14: Amastigotes de <i>Leishmania</i> sp. en una muestra de tejido de una lesión, teñida con Giemsa. ....	22
Figura 15: Etapas de una reacción en cadena de la polimerasa (PCR). ....	24
Figura 16: Fórmula para la determinación del número de muestra para proporciones y población finita. ....	27
Figura 17: Diagrama de flujo de estandarización de la metodología para la caracterización de <i>Leishmania</i> en Guatemala mediante PCR-RFLP.....	31
Figura 18: Algoritmo de restricción propuesto y optimizado en otros estudios de tipificación de <i>Leishmania</i> . ....	32
Figura 19: Ubicación de los primers utilizados para amplificar los segmentos del marcador <i>hsp70</i> . ....	34
Figura 20: Alineamiento de las secuencias de <i>Leishmania</i> utilizadas para identificar sitios de restricción. .	39
Figura 21: Algoritmo de restricción propuesto para el fragmento N del marcador <i>hsp70</i> . ....	42
Figura 22: Productos del PCR anidado para el fragmento N del gen <i>hsp70</i> (593 bp), separados en un gel de agarosa al 1.5% (p/v).....	44
Figura 23: Patrones de restricción del fragmento N del gen <i>hsp70</i> (593 bp), generados por el corte con la enzima <i>BsaII</i> y separados en un gel de agarosa al 3.0% (p/v). ....	45
Figura 24: Patrones de restricción del fragmento N del gen <i>hsp70</i> (593 bp), generados por el corte con la enzima <i>BsaII</i> y separados en un gel de agarosa al 3.0% (p/v), mostrando la presencia potencial de infecciones mixtas. ....	46
Figura 25: Patrones de restricción del fragmento N (593 bp) del gen <i>hsp70</i> generados por el corte con la enzima <i>HaeIII-RsaI</i> y separados en un gel de agarosa al 3.0 % (p/v), mostrando la presencia potencial de <i>L. peruviana</i> .....	46
Figura 26: Serie de tiempo para las proporciones de las especies del género <i>Leishmania</i> más frecuentes entre las muestras analizadas.....	49
Figura 27: Indicadores de calidad del modelo de regresión logística multinomial generado. ....	50
Figura 28: Parámetros del modelo generado y sus predicciones sobre la identidad de la especie de <i>Leishmania</i> responsable de una infección. ....	51
Figura 29: Árbol filogenético construido con las secuencias de las muestras analizadas, por medio del método estadístico Maximum likelihood. ....	53

## RESUMEN

La Leishmaniosis es una enfermedad parasitaria desatendida presente en todos los continentes, pero que se encuentra mayoritariamente en la región tropical, en la que se incluye a Guatemala. La mayoría de los estudios que se han realizado sobre la enfermedad en este país son epidemiológicos y ensayos clínicos con fármacos y tratamientos alternativos, la mayoría de los cuales utilizan métodos parasitológicos y mediante enzimas de restricción para la caracterización de los parásitos. Debido a la necesidad de ampliar y actualizar la historia natural de la enfermedad y a la falta de identificación de los parásitos por técnicas moleculares, se realizó un análisis combinado de PCR-RFLP para determinar la especie de los parásitos presentes en 191 muestras de raspados de lesiones de leishmaniosis cutánea recolectadas durante el período 1980-2017. Para el PCR se amplificó el gen *hsp70* y se aplicó un algoritmo de restricción propuesto en un estudio anterior. Se obtuvo un 64% de amplificación (122/191 muestras) para el marcador *hsp70* y patrones de restricción para el 98% de las muestras positivas. De estas, se envió a secuenciar un 30% para validar los resultados. De acuerdo con los resultados, la mayor parte de las muestras analizadas corresponden a *Leishmania braziliensis* (86.7%), seguido de una combinación de *Leishmania guyanensis/Leishmania panamensis* (3.33%), así como un 8.33% de muestras que presentaron un patrón que sugiere una infección mixta. Mientras que el porcentaje restante (1.64%) engloba muestras que se identificaron como *Leishmania naiffi*, *Leishmania peruviana* y una especie no confirmada que podría ser una variante de *L. braziliensis*. No se identificó *L. mexicana*, reportada en otros estudios. Se recomienda utilizar productos de amplificación de un fragmento de mayor tamaño y compararlos con los resultados obtenidos con el fragmento N, utilizado en este estudio.

# I. INTRODUCCIÓN

La Leishmaniosis es una enfermedad transmitida por vectores que puede tener cuatro variantes principales, la forma cutánea que puede dividirse en mucocutánea y diseminada y la forma visceral, este estudio se enfocará en la forma cutánea por ser la más variante de mayor importancia clínica en el país. La Leishmaniosis cutánea ha sido estudiada en Guatemala por medio de investigaciones enfocadas en la epidemiología y evaluación de tratamientos para la enfermedad. Sin embargo, se cuenta con poca información sobre la presencia de las especies de parásitos causantes y, además, los métodos de diagnóstico utilizados han sido principalmente microscopía y ensayos enzimáticos. Estos métodos son poco específicos y pueden tener falsos positivos para la identificación de los parásitos, por lo que no son idóneos para mantener un apropiado monitoreo y manejo de la enfermedad, debido a que el tratamiento y desarrollo de esta depende de la especie del parásito. Esto implicaría que, sin un método confiable para la identificación del agente causal de la enfermedad, se podrían administrar tratamientos inadecuados para los pacientes. Por estas razones, se plantea realizar la estandarización de un método molecular que es más sensible y específico que los métodos previamente mencionados y que podría determinar más fácilmente la identidad del parásito, de manera que se pudiera brindar un tratamiento adecuado y brindar información actualizada sobre las especies del género *Leishmania* presentes en el país o que pudieran ser importadas.

Actualmente se tienen registros sobre la presencia de tres especies (*Leishmania braziliensis*, *Leishmania panamensis*, *Leishmania mexicana*) responsables de las infecciones en Guatemala, aunque la infección por *L. panamensis* no ha sido confirmada por un método molecular. Con este estudio se pretende identificar las especies de parásitos presentes en muestras tomadas durante otros estudios o actividades de diagnóstico (especialmente comprobar la presencia de *L. panamensis* en Guatemala). De igual forma, la literatura reporta que la proporción de las especies de *Leishmania* en el país corresponde a un 70% para *L. braziliensis* y el restante 30% para *L. mexicana*, por lo que también se pretende comprobar si esta proporción se ha mantenido durante el tiempo en el que se han tomado estas muestras. Además, se procurará evaluar si existe una asociación entre la especie del parásito y las manifestaciones clínicas de la infección (específicamente el número y área de las lesiones) y también realizar el análisis de las relaciones filogenéticas existentes entre las especies que se detecten en Guatemala y las especies reportadas internacionalmente.

---

<sup>1</sup>RFLP = Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (por sus siglas en inglés).

## II. OBJETIVOS

### A. Objetivo general

Describir la epidemiología molecular de la Leishmaniosis cutánea en Guatemala en el período 1980-2017.

### B. Objetivos específicos

1. Desarrollar una metodología en base a RFLP para la identificación de las especies de parásitos causantes de Leishmaniosis cutánea en Guatemala (casos autóctonos e importados) a partir de muestras de raspados de lesiones.
2. Identificar las especies de parásitos causantes de la Leishmaniosis cutánea en Guatemala por medio de una metodología PCR-RFLP en muestras recolectadas en el periodo 1980-2017 y determinar su proporción.
3. Inferir las relaciones evolutivas entre los parásitos responsables de la Leishmaniosis cutánea en Guatemala y los reportados en otras regiones endémicas del mundo, a partir de la secuencia del gen *hsp70*.
4. Determinar si existe asociación entre la especie de parásito responsable de la infección y las características clínicas de la misma.

### III. JUSTIFICACIÓN

La Leishmaniosis cutánea es una de las variantes de la Leishmaniosis, que afecta anualmente entre 0.6 y 1.2 millones de personas en todo el mundo (OMS, 2017). En Guatemala, durante 2016, la incidencia combinada de las formas cutánea y mucosa de la enfermedad fue de 27.46 casos por cada 100,000 habitantes (PAHO/WHO, 2018). La mayor parte de las infecciones cutáneas en nuestro país son causadas por *Leishmania braziliensis* o *Leishmania mexicana*. Las infecciones por *L. braziliensis* se caracterizan por un crecimiento rápido de la lesión que puede ser resuelto con una terapia con antimoniales. En contraste, las infecciones causadas por *L. mexicana* se caracterizan por crecer lentamente y resolver inicialmente sin tratamiento, pero que recurren a pesar de la administración de antimoniales (Herwaldt *et al.*, 1992).

Actualmente se cuenta con poca información sobre la presencia de las especies de los parásitos causantes de la leishmaniosis cutánea en Guatemala (Herwaldt *et al.*, 1992), y si la diversidad de estas ha cambiado a lo largo del tiempo. También se sospecha de la presencia de especies no confirmadas para Guatemala como *Leishmania panamensis*, de la que existe un único reporte en una muestra procesada mediante electroforesis de isoenzimas (comunicación personal, R. Mendizábal). Por lo tanto es necesario diseñar una metodología que permita identificar entre parásitos de diferentes especies, preferiblemente a través de pruebas moleculares (Montalvo *et al.*, 2012) que son mucho más sensibles y de menor costo que las que requieren el cultivo de los parásitos. Además, debido a los efectos de la globalización, también se debe de tomar en cuenta en la metodología la identificación de infecciones importadas, causadas por parásitos de otras especies, e incluso posibles infecciones mixtas (Monroy-Ostria *et al.*, 2014).

Es importante determinar la especie del parásito causante de la enfermedad en un paciente, porque se ha demostrado que la prognosis, desarrollo de la enfermedad y respuesta al tratamiento varían según la especie del parásito (Montalvo *et al.*, 2012). Para la tipificación de los parásitos se han desarrollado varios métodos que se pueden dividir en metodologías dependientes del cultivo de los parásitos, métodos basados en PCR y los métodos diseñados para la detección de un antígeno específico (Van der Auwera y Dujardin, 2015). En la primera categoría, la técnica principal es la electroforesis de enzimas multilocus, considerada por muchos años el estándar de oro de la tipificación de *Leishmania* sp. Sin embargo, presenta la desventaja que se necesita cultivar los parásitos para poder aplicarla. Además, el método es lento, laborioso y costoso, debido a que se necesita usar entre 10-20 enzimas para obtener distintos perfiles electroforéticos (Oshaghi *et al.*, 2009).

Por otra parte, los métodos moleculares más explorados han sido los basados en PCR's, esto debido a la posibilidad de un método específico y sensible para estudiar la mayoría de las especies de estos parásitos. Se han desarrollado protocolos de amplificación para genes del ADN ribosomal como el fragmento 5.8 S o las regiones de los espaciadores transcritos internos (ITS1 e ITS2, por sus siglas en inglés), para las secuencias del gen *hsp70* que codifica para la proteína de choque térmico (HSP, por sus siglas en inglés), para fragmentos del citocromo b y del ADN mitocondrial (cinetoplasto). Sin dejar a un lado, la aplicación de

qPCR, la secuenciación de fragmentos amplificados y el análisis por RFLP (Van der Auwera *et al.*, 2016; Van der Auwera y Dujardin, 2015). Por último, existen métodos que están diseñados para la detección de antígenos como la glicoproteína 63 (GP63), la cisteína proteinasa B (CPB) y la proteína de choque térmico 70 (HSP70), que se caracterizan por ser factores de virulencia y por tener una alta capacidad antigénica (Van der Auwera y Dujardin, 2015). Recientemente, se ha explorado la tipificación de *Leishmania* por medio de espectrometría de masas, sin embargo la técnica también necesita del cultivo de los parásitos y carece de reproducibilidad entre laboratorios (Mouri *et al.*, 2014).

Los métodos de diagnóstico utilizados en Guatemala han sido principalmente métodos tradicionales como microscopía (Arana *et al.*, 1994; Blaylock y Wortmann, 2012; Carreira *et al.*, 1995; Soto *et al.*, 2004), cultivo *in vitro* de parásitos, electroforesis de isoenzimas (Vion y Behin, 1988) y ELISA (Rizzo *et al.*, 2015), los cuales a excepción del último requieren del cultivo de los parásitos y como se mencionó anteriormente, esto conlleva una mayor inversión de tiempo y dinero. Sin embargo, ya se han realizado estudios sobre métodos basados en PCR y hasta se ha implementado este tipo de metodología en algunos casos como estudios con PCR de tiempo final y con PCR tiempo real (Hernandez-Montes *et al.*, 1998; Miranda *et al.*, 2012; Wortmann *et al.*, 2007). No existen reportes sobre estudios que hayan explorado la diversidad de *Leishmania* en Guatemala, debido a que la mayoría de los mismos se han enfocado en la epidemiología y tratamientos para la Leishmaniosis (Arana *et al.*, 2001; Mendizabal *et al.*, 2015; Arana *et al.*, 1992; Pozuelos *et al.*, 1990; Ryan *et al.*, 2003).

Este proyecto plantea desarrollar una metodología que pueda ser utilizada por los servicios públicos de salud del país para la tipificación de parásitos de *Leishmania* sp. Por esta razón, utiliza se plantea utilizar un kit de extracción de ADN comercial a diferencia de procedimientos que se han desarrollado como un extracción basada en agua o un buffer de lisis y la aplicación de calor (Volpini *et al.*, 2006; Motazedian *et al.*, 2002). Esta estandarización ayudaría al Ministerio de Salud Pública de Guatemala y a otros entes de salud de la región Centroamericana para realizar un diagnóstico rápido y sensible en muestras procedentes de las comunidades que se encuentran en áreas endémicas para la leishmaniosis cutánea o de visitantes de estas comunidades, para poder proponer el monitoreo y adquirir el tratamiento adecuado para tratar su enfermedad.

Por otra parte, la estandarización también conllevaría el diseño de un nuevo algoritmo de restricción para determinar la especie de los parásitos de *Leishmania* presentes en Guatemala y provenientes de otras regiones endémicas del mundo, sin enfocarse en las diferentes cepas que puedan existir. Se ha reportado la existencia de una alta diversidad molecular en poblaciones de los parásitos causantes de leishmaniosis en Brasil (Ishikawa *et al.*, 2002), cuyas causas se desconocen, y existe poca información respecto a si existe correlación entre la variabilidad genética de *Leishmania* sp. y las características eco-epidemiológicas de la enfermedad. Se plantea la hipótesis que la ubicación geográfica, los animales reservorios y los vectores asociados a los ciclos de vida de estos parásitos podrían contribuir a la existencia de esta alta variabilidad genética, pero no se cuenta con estudios concluyentes al respecto (Cupolillo *et al.*, 2003).

## IV. MARCO TEÓRICO

### A. Generalidades de la enfermedad

La Leishmaniosis es una enfermedad causada por parásitos del género *Leishmania*, los cuales son dispersados por la mordedura de una mosca hembra flebótoma infectada con estos protozoos. Se encuentra tanto en el viejo (algunas regiones de Asia, el medio este africano y el sur de Europa) como el Nuevo Mundo (parte de México, Centro América y América del Sur) (CDC, 2013). La leishmaniosis se encuentra en el grupo de las enfermedades tropicales desatendidas (NTD's por sus siglas en inglés), las cuales afectan a las personas más pobres del mundo y están asociadas directamente a la desnutrición, desplazamiento de poblaciones, pobre infraestructura de las viviendas, un sistema inmune debilitado y falta de recursos económicos. Además, esta enfermedad también tiene relación con la urbanización y cambios en el medio ambiente como deforestación, construcción de represas y sistemas de irrigación. Las formas más conocidas de esta enfermedad son la leishmaniosis visceral y la cutánea que puede ser mucocutánea o diseminada, cada una con su sintomatología y condiciones eco-epidemiológicas. Se estima que aparecen entre 0.7 a 1.0 millones de nuevos casos y que ocurren entre 20,000-30,000 muertes cada año (WHO, 2018). Afortunadamente solo una pequeña proporción de personas infectadas con los parásitos llega a desarrollar la enfermedad, debido a las defensas inmunológicas (sistema de complemento especialmente) humanas que eliminan la mayor parte de los protozoos invasores (Nylén y Gautam, 2010).

### B. Tipos de Leishmaniosis

#### 1. Leishmaniosis visceral

La Leishmaniosis visceral (VL) es la segunda enfermedad parasitaria más mortal (solo detrás de malaria). Se estima que es responsable por al menos 20,000 muertes cada año y se encuentra concentrada (con el 90% de los casos) en 6 países: Bangladesh, India, Etiopía, Sudán, Sudáfrica y Brasil (Davidson, 2017). Esta variante de la leishmaniosis es causada por los parásitos *Leishmania donovani* en África e India, *Leishmania infantum* en la cuenca del Mediterráneo y *Leishmania chagasi* en el Nuevo Mundo (Buckner y Schwartz, 2017).

Es frecuente que la enfermedad sea resuelta sin el desarrollo clínico de síntomas, sin embargo, luego de un período de incubación de entre 2-6 meses, comienzan a manifestarse una sintomatología que consta de fiebre, crecimiento del hígado y del bazo, pérdida de peso, bajos conteos de glóbulos rojos (anemia), blancos (leucopenia) y plaquetas (trombocitopenia) y para las personas con colores de piel claro, puede desarrollarse una coloración grisácea, que le da su otro nombre a la enfermedad: “kala-azar”, que en Hindi significa “fiebre negra”, tal y como se muestra en la Figura 1 (CDC 2013; Buckner y Schwartz, 2017).

Figura 1: Niños infectados con el parásito causante de Leishmaniosis visceral (kala-azar)



(Magill, 2013)

## 2. Leishmaniosis cutánea

La forma cutánea es otra variante de la Leishmaniosis que se caracteriza por ser provocada por los parásitos *Leishmania major*, *Leishmania tropica*, *Leishmania aethiopica* y *Leishmania infantum*, para el Viejo Mundo. Existe una mayor cantidad de especies equivalentes que provocan este mal en el Nuevo Mundo y se muestran en el Cuadro 1 (Buckner y Schwartz, 2017). Es la forma más común de la leishmaniosis y sus síntomas se enfocan en la aparición de llagas en la piel, mayoritariamente úlceras en las partes expuestas del cuerpo, que terminan siendo cicatrices para toda la vida o algún tipo de desfiguración (WHO, 2018). Las manifestaciones clínicas de la enfermedad pueden dividirse según las especies del Nuevo y Viejo Mundo. Para el caso de las primeras el tiempo de incubación de la enfermedad es de 2-8 semanas, pero puede llegar a alcanzar 3 años. El primer signo de leishmaniosis es el enrojecimiento del área de la mordedura que se convierte en una pápula y posteriormente puede permanecer como una placa aplanada, o evolucionar en un nódulo cubierto de escamas. Estas comienzan siendo secas y se van humedeciendo hasta caerse; conforme la lesión crece exuda líquido seroso y termina cubierta por una costra gruesa con un patrón de decoloración característica, tal y como se puede observar en la Figura 2 (Magill, 2013).

Figura 2: Úlcera producida por una infección de Leishmaniosis cutánea (*Leishmania major*).



(Magill, 2013)

Figura 3: Especies de parásitos del género *Leishmania* causantes de la forma cutánea de la enfermedad.

Cuadro 39.1 Leishmaniasis cutánea del Nuevo Mundo	
Subgénero	Especies comunes
<i>Viannia</i>	<i>L. (V.) brasiliensis</i>
	<i>L. (V.) guyanensis</i>
	<i>L. (V.) panamensis</i>
	<i>L. (V.) peruviana</i>
<i>Mexicana</i>	<i>L. mexicana</i>
	<i>L. amazonensis</i>
	<i>L. venezuelensis</i>

(Modificado de Buckner y Schwartz, 2017)

### 3. Leishmaniosis mucocutánea

Es la forma menos común de la enfermedad con relación a las variantes visceral y cutánea. Este tipo de leishmaniosis puede resultar como una secuela de una infección generada por un parásito causante de leishmaniosis cutánea en regiones de Latinoamérica. Existen especies de estos protozoos que pueden propagarse desde la piel y causar llagas en las membranas mucosas de la nariz, boca y garganta, generando eventualmente la destrucción parcial o total de las mismas (Figura 4) (CDC, 2013; WHO, 2018).

En contraste con la forma cutánea, la Leishmaniosis mucocutánea es potencialmente letal y requiere tratamiento definitivo (Murray *et al.*, 2005). Más del 90% de los casos de esta leishmaniosis ocurren en Bolivia, Brasil, Etiopía y Perú (WHO, 2018), debido a que las especies causantes pertenecen al subgénero *Viannia*, que se encuentra mayoritariamente en América como *Leishmania braziliensis*, *Leishmania amazonensis*, *Leishmania panamensis* y *Leishmania guyanensis*. La evolución de la enfermedad cutánea hacia la variante mucocutánea depende de una combinación entre la inmunidad mediada por las células del hospedero y la virulencia del parásito, aunque se desconoce exactamente qué factores determinarán si el hospedero desarrolla o no la enfermedad (David y Craft, 2009).

### 4. Leishmaniosis cutánea diseminada

Esta variante de la forma cutánea de la enfermedad se caracteriza por presentar varias lesiones en forma de úlceras extensas. Se ha descrito en infecciones causadas por *L. braziliensis*, *L. panamensis*, *L. guyanensis* y *L. amazonensis*, en donde puede haber hasta cientos de lesiones cutáneas que afecten o no a las mucosas, pero que si pueden diseminarse en todo el tegumento (exceptuando cuero cabelludo, genitales, regiones axilar e inguinal), como se puede observar en la Figura 5 (OMS, 2010). La leishmaniasis cutánea diseminada está asociada con un tratamiento pobre, recaídas y pacientes inmunocomprometidos, donde la respuesta inmune que predomina es de tipo Th2 no protectora y existen registros de que las lesiones responden de forma parcial al tratamiento con antimoniales (Giavedoni *et al.*, 2014).

Figura 4: Manifestación clínica de la Leishmaniosis mucocutánea.



(Magill, 2013)

Figura 5: Lesiones causadas por Leishmaniosis cutánea diseminada.



(Giavedoni *et al.*, 2014)

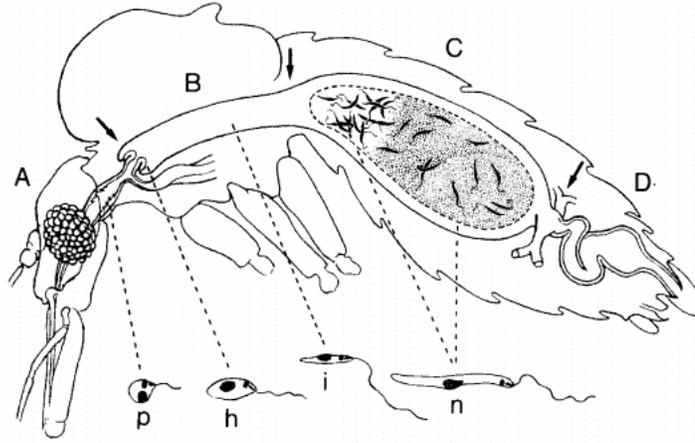
## C. Ciclo de vida del parásito

El ciclo de vida de los parásitos del género *Leishmania* se caracteriza por ser digenético, lo que quiere decir que alterna su desarrollo en dos etapas, una en un hospedero mamífero y otra en un insecto vector. Todas las especies de la familia de estos parásitos (Trypanosomatidae) se caracterizan por poseer un cinetoplasto, una estructura formada por ADN concentrado en forma circular o enrejada, dentro de la mitocondria y asociado cercanamente a la estructura basal del flagelo. Además, en cada organismo presenta un morfotipo específico, cuando se encuentra dentro del insecto los parásitos son conocidos como promastigotes y cuando se encuentra dentro de la células del mamífero infectado se les llaman amastigotes (Folgueira *et al.*, 2007). Los promastigotes son células alargadas que se caracterizan por poseer un flagelo, mientras los amastigotes son células con forma oblonga que son más pequeños en relación a los promastigotes y que carecen de flagelo (Vannier-Santos *et al.*, 2002).

### 1. Etapa en el insecto vector

El desarrollo de los parásitos del género *Leishmania* inicia cuando un insecto vector muerde a un vertebrado infectado con la enfermedad. El desarrollo de las formas de estos parásitos sucede en varias regiones del intestino del insecto y se detalla en la Figura 4. La sangre extraída por el insecto contiene amastigotes que son llevados al intestino medio abdominal del insecto y envueltos en una membrana peritrófica. Los amastigotes se convierten en promastigotes prociclicos (ovoides, pequeños y poco móviles) luego de 18-24 horas, y se dividen rápidamente antes de transformarse en promastigotes conocidos como nectomonadas de 3-4 días después de alimentarse (Sacks, 2001). Antes de que toda la sangre se digiera, la membrana peritrónica se desintegra y los parásitos se movilizan hacia el intestino medio torácico y la válvula cardíaca. Algunas nectomonadas permanecen en la parte abdominal luego de la excreción de desechos, donde se siguen dividiendo (se adhieren al intestino medio de la sección torácica) y se transforman en células más pequeñas y anchas llamadas haptomonadas, cerca de la válvula cardíaca (Schlein, 1993). Posteriormente, algunas haptomonadas llegan al esófago y faringe, donde se convierte en paramastigotes. En otro camino de desarrollo, las nectomonadas se dividen en la parte torácica del intestino medio y se transforman en células infectivas y motiles conocidas como promastigotes, con un cuerpo más pequeño y un flagelo más largo en comparación con las otras fases (Vannier-Santos *et al.*, 2002).

Figura 6: Esquema del intestino donde se indica la formación de morfotipos de *Leishmania*



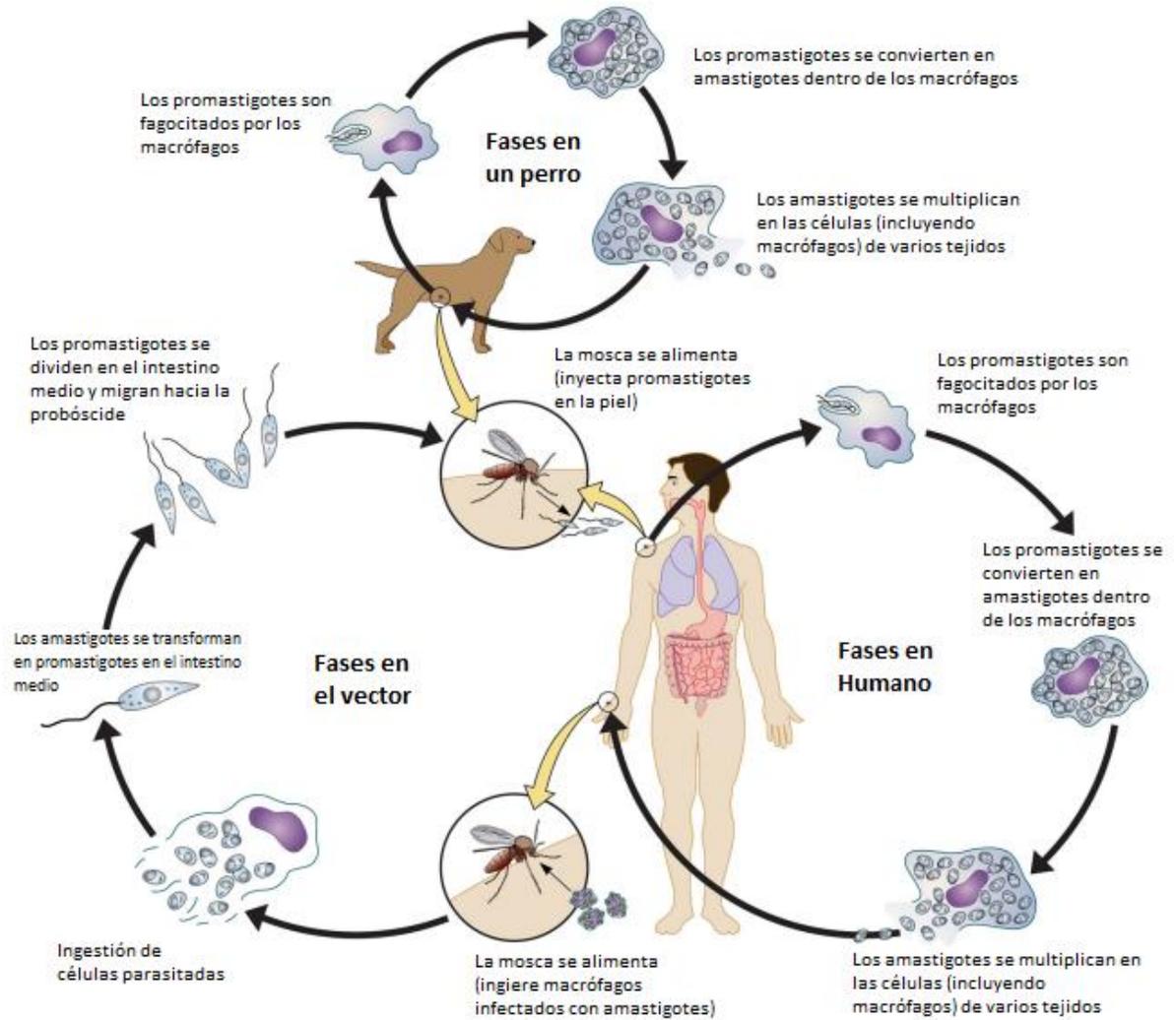
(Schlein, 1993)

Las flechas señalan la división del intestino en A) intestino proximal, B) intestino medio torácico, C) intestino medio abdominal, D) intestino distal. La sangre (región sombreada) en el intestino medio abdominal se encuentra dentro de la membrana peritrófica (línea punteada). Los tipos de promastigotes son nectomonadas (n), promastigotes infecciosos (i), haptomonadas (h) y paramastigotes (p).

## 2. Etapa en el hospedero mamífero

Esta etapa inicia cuando un vector muerde a un hospedero mamífero, que puede ser desde un perro hasta un ser humano. El insecto inyecta promastigotes durante su alimentación y al ingresar, estas células parasitarias son reconocidas por células mononucleares y polimorfonucleares con capacidad fagocítica (Ej: macrófagos y neutrófilos) (Vannier-Santos *et al.*, 2002). Los parásitos son fagocitados por estas células del sistema inmune dentro de los cuales se desarrollan en amastigotes. Este tipo de célula cuenta con mecanismos para sobrevivir dentro de los fagolisosomas (fusión de la vesícula que contiene al amastigote con el contenido de lisosomas) y comienza a reproducirse por fisión binaria. Eventualmente, la cantidad de amastigotes es tan grande que la célula se rompe y libera a los parásitos que pueden ser nuevamente fagocitados y repetir el ciclo (Figura 5) (Esch y Petersen, 2013).

Figura 7: Ciclo de vida de los parásitos del género *Leishmania* durante su estadía en el insecto vector y en los hospederos mamíferos.



(Modificado de Cláudia *et al.*, 2017)

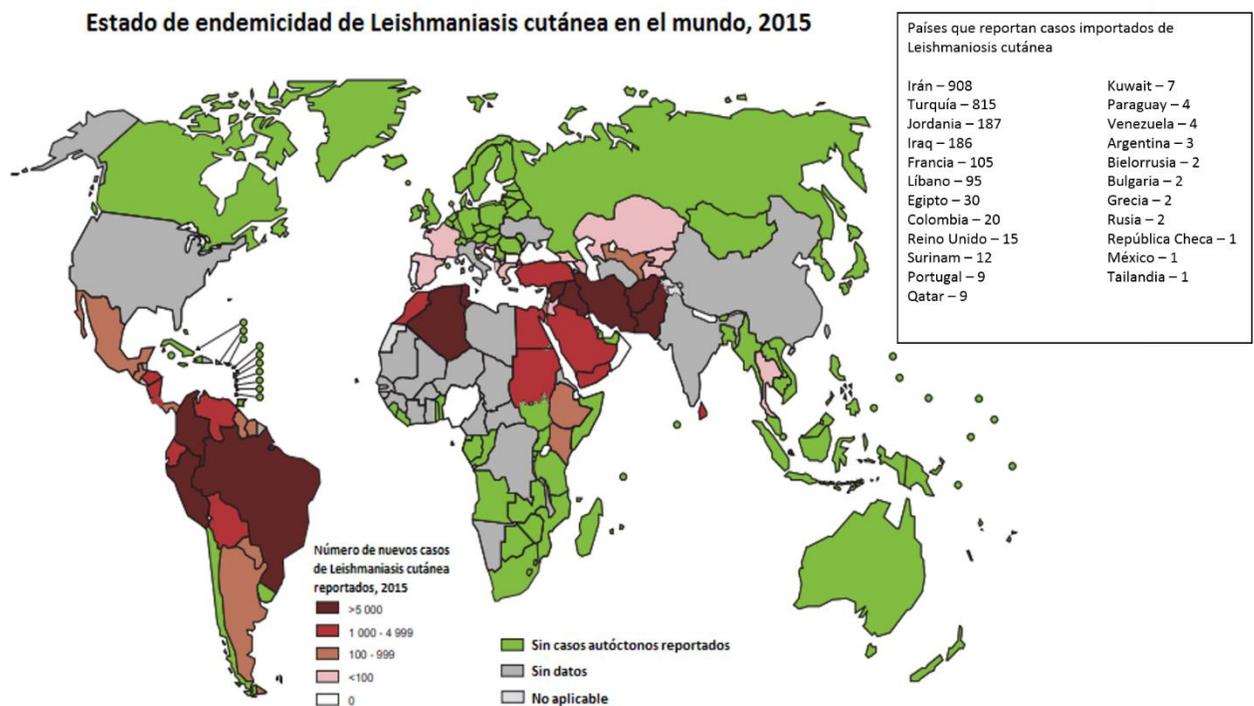
## D. Distribución de la leishmaniosis cutánea

### 1. Nivel mundial

La Leishmaniosis se distribuye en 97 países, en todos los continentes con excepción de Australia y la Antártida, siendo la forma cutánea la más común (Figura 8) (WHO, 2018). Según la especie de parásito, la enfermedad cutánea prevalente en el Viejo Mundo incluye a *L. major*, *L. tropica*, *L. aethiopica* y *L. infantum*, cuya área de endemismo abarca la cuenca del Mediterráneo, China, medio este, Asia Central, el norte de África y regiones rurales de Etiopía y Kenia. En contraste, la leishmaniosis cutánea del Nuevo Mundo se

encuentra concentrada en áreas de la mayor parte de América Central y América del Sur (con excepción del sur de Texas y República Dominicana), donde habitan las especies de *Leishmania* de los complejos *L. viannia* y *L. mexicana* (Buckner y Schwartz, 2017). Recientemente, se ha registrado un aumento significativo de los casos de la enfermedad que se deben al transporte, turismo y operaciones militares, mayoritariamente en países del noroeste de Europa y el norte de Estados Unidos (Devi *et al.*, 2014).

Figura 8: Distribución de Leishmaniosis cutánea alrededor del mundo.



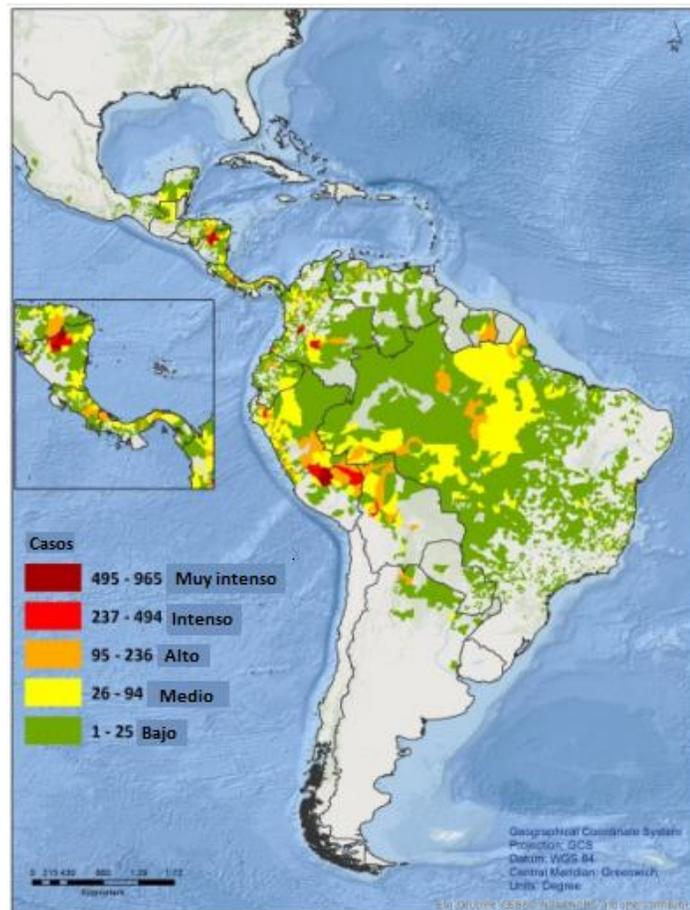
(WHO, 2017)

## 2. América

La Leishmaniosis cutánea es endémica en 18 países del continente americano. Sin embargo, las cifras reportadas excluyen a la Guyana Francesa, cuyos datos se reportan integrados con los de Francia). De esta región 17 países reportaron un total de 892,846 casos de la enfermedad durante 2001-2016. Se observó una reducción de los casos durante 2009-2015, pero durante 2016 se registró un aumento del 6.15% en relación con el año anterior (incrementos del 66% en América Central y 27% para los Andes). Los países que han reportado la mayor cantidad de casos en los últimos años han sido Brasil, Colombia, Nicaragua y Perú, que representan el 74.3% de los casos (lo cual se puede visualizar en la Figura 7) (PAHO/WHO, 2018). Existen estudios donde se estimó que la incidencia global de los países del continente corresponde a 17.42 casos por

cada 100,000 habitantes. Durante 2001-2011, se observó que los países con la mayor incidencia de la enfermedad fueron Nicaragua y Panamá, aunque el mayor número de casos ocurrió en Brasil y Colombia (Maia-Elkhoury *et al.*, 2016).

Figura 9: Distribución de los casos de Leishmaniosis cutánea reportados durante 2016 en América Latina



(PAHO/WHO, 2018).

### 3. Guatemala

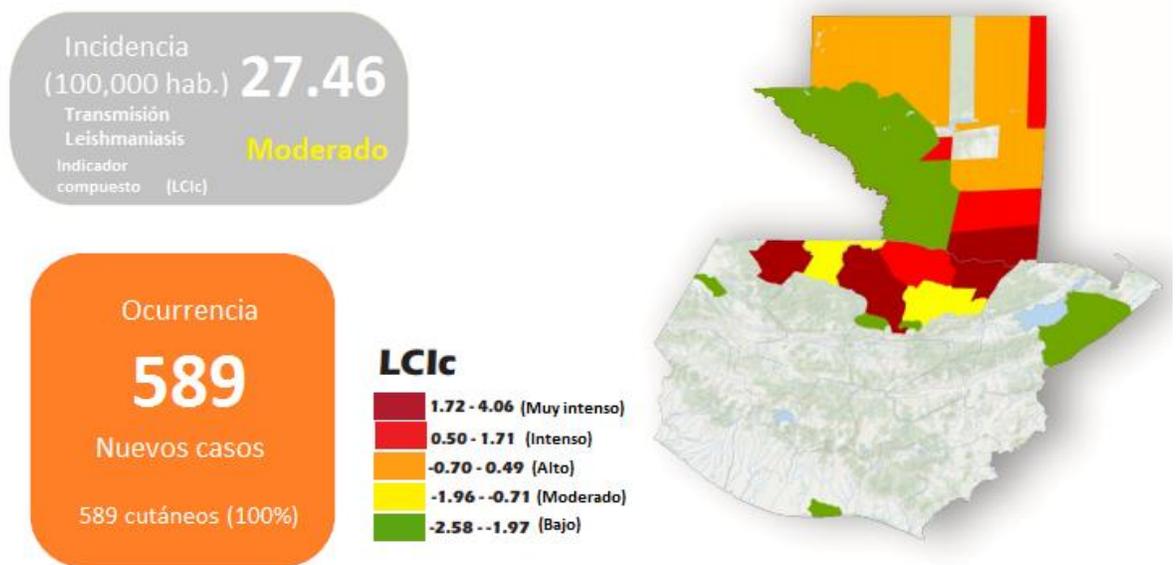
La Leishmaniosis cutánea es la forma de la enfermedad más común en Guatemala y fue descrita por primera vez en 1928. Entre 2000-2007, el 84.7% de los casos registrados correspondieron a personas mayores a 10 años, y la mayoría (67%) en hombres. Los factores relacionados con el riesgo de contraer la enfermedad fueron la transmisión fuera del hogar (zonas boscosas) y la ocurrencia en hombres mayores de 10 años (en trabajadores en áreas boscosas y rurales) (Morales, 2008).

La incidencia reportada en 2008 fue 0.1 casos por cada 100,000 habitantes con 4,262,387 personas en riesgo, distribuidas en 6 departamentos (Petén, Alta y Baja Verapaz, El Quiché, Izabal y Jalapa) (Morales,

2008). Ha existido un cambio significativo en la incidencia de la enfermedad, debido a que en 2016 se reportó que esta era de 27.46 casos por 100,000 habitantes (Figura 8) (PAHO/WHO, 2018). Sin embargo, este cambio puede estar sesgado como en el caso de otro estudio realizado en Guatemala, en el que se determinó que la vigilancia pasiva puede subestimar la verdadera ocurrencia de la enfermedad, incluso por un factor tan grande como 1 en 20 (Copeland *et al.*, 1990).

Se ha reportado que las especies de parásitos que son responsables de la enfermedad en Guatemala corresponden a la *L. braziliensis*, *L. mexicana* y *L. panamensis* (Herwaldt *et al.*, 1992). También existe registro de *L. infantum*, pero esta solo provoca leishmaniosis visceral (Morales, 2008). En el caso de *L. panamensis*, solo existe un registro de la presencia de la especie, el cual fue identificado mediante electroforesis de isoenzimas (Navin *et al.*, 1988).

Figura 10: Indicador compuesto de la leishmaniosis cutánea y mucocutánea en Guatemala.



(Modificado de PAHO/WHO, 2018)

## E. Diversidad genética

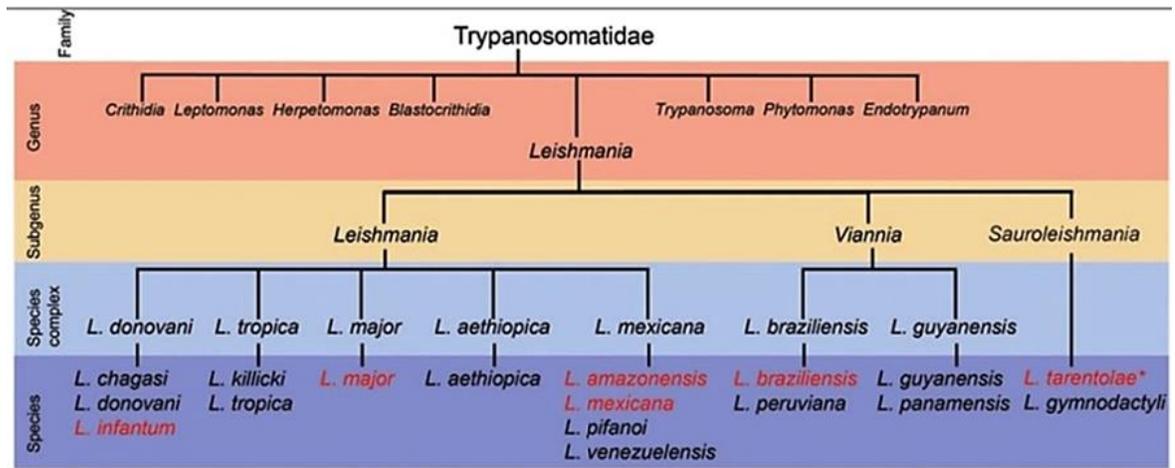
La familia Trypanosomatidae engloba a los géneros *Leishmania*, *Endotrypanum*, *Trypanosoma* y al menos cuatro géneros de parásitos que afecta a invertebrados. Los géneros más relacionados son *Leishmania* y *Endotrypanum*, ambos transmitidos por la mordedura de moscas flebótomas, pero este último está restringido solo a perezosos neotropicales, mientras los parásitos de *Leishmania* afectan a varios mamíferos (incluido el ser humano) y reptiles y tienen una distribución mucho más amplia que abarca regiones tropicales

y neotropicales. El sub-género *Sauroleishmania* es la categoría taxonómica donde se encuentran los parásitos de *Leishmania* responsables de infecciones en reptiles. Las especies de los parásitos de *Leishmania* que infectan mamíferos se dividen en dos grupos (subgéneros), los que se desarrollan dentro del intestino medio y la parte superior del tracto digestivo de las moscas vectores que pertenecen al subgénero L. (*Leishmania*) y los que experimentan una fase de desarrollo extra dentro del intestino posterior, que corresponden al subgénero L. (*Viannia*) (Cupolillo *et al.*, 2000).

Además, las especies del Nuevo Mundo son L. (*Viannia*) y las del Viejo Mundo son L. (*Leishmania*), aunque existen excepciones como *L. infantum* que pertenece originalmente al Viejo Mundo, pero ya se encuentra distribuida en el Nuevo Mundo. Un estudio sugiere el género *Leishmania* se originó durante el Mesozoico y que sus subgéneros se separaron junto con América del Sur y África, para posteriormente diversificarse junto con las especies de moscas vectores del Nuevo Mundo (*Lutzomya*) y del Viejo Mundo (*Phlebotomus*) (Thomaz-Soccol *et al.*, 1993). Dentro del género existen complejos de especies y subespecies, los cuales se detallan en la clasificación del mismo, de la Figura 9. Los principales son *L. donovani* (*L. donovani*, *L. infantum* y *L. chagasi* y *L. archibaldi*), *L. tropica* (*L. tropica*, *L. major* y *L. aethiopica*), *L. mexicana* (*L. mexicana*, *L. garnhami* y *L. amazonensis*), *L. braziliensis* (*L. peruviana* y *L. braziliensis*), *L. guyanensis* (*L. panamensis* y *L. guyanensis*, *L. naiffi* y *L. lainsoni*) (Chauhan *et al.*, 2015).

Se ha reportado la existencia de heterogeneidad genética en especies de *Leishmania* del Nuevo Mundo, siendo ésta extensiva para algunos clones ampliamente distribuidos y otros individuos aparentemente únicos y ubicados en sitios de endemismo (Cupolillo *et al.*, 1998). También se ha determinado que existe un alto grado de endogamia en las poblaciones de *L. braziliensis*, y que hay una alta heterogeneidad en las poblaciones de este parásito entre países (Perú y Bolivia para este estudio), lo que evidencia la existencia de una estructura poblacional fuerte a escala microgeográfica (Rougeron *et al.*, 2009). Por su parte, en el sureste de Francia, se llevó a cabo la caracterización de *L. infantum* en la que se obtuvo 121 genotipos (91 únicas y 30 repetidos), lo cual sugirió una alta diversidad genética (Pomares *et al.*, 2016). Esta variabilidad genética es uno de los factores a considerar, ya que la identificación de las especies de *Leishmania* es necesaria para poder definir el tratamiento a seguir para los pacientes afectados (Aronson *et al.*, 2016).

Figura 11: Clasificación de los grupos existentes dentro del complejo *Leishmania*.



En este diagrama se observa los diferentes géneros, subgéneros y complejos de especies que pertenecen a la familia Trypanosomatidae (separados por colores). Las especies que aparecen en rojo corresponden a los parásitos cuyos genomas fueron empleados en un estudio filogenético realizado por Real *et al.*, 2013.

## F. Organismos vectores

Un vector es un organismo que transporta un agente patogénico y lo transmite a otro organismo. La leishmaniasis es transmitida por la mordedura de una mosca flebótoma. Se conocen más de 600 especies de estos insectos, divididos en cinco géneros: *Phlebotomus* y *Sergentomyia* en el Viejo Mundo y *Lutzomyia*, *Brumptomyia* y *Warileya* en el Nuevo Mundo. Sin embargo, las especies transmisoras pertenecen únicamente los géneros *Phlebotomus* y *Lutzomyia* (Ready, 2013). Alrededor de 30 especies se han relacionado con la enfermedad, la cual se transmite únicamente por medio de la mosca hembra, que necesita la sangre para el desarrollo de sus huevos. La mosca se infecta al succionar sangre de un reservorio infectado y luego de un período de incubación, los parásitos se desarrollan dentro del insecto (WHO, 2018).

Estos insectos miden entre 2-3 mm de longitud, poseen antenas filiformes y alas en formas de “V” (Figura 10). El hábitat de estos insectos varía, con especies que habitan en regiones desérticas y otras en regiones boscosas. Aunque, estas moscas son más abundantes en zonas con vegetación (OGE, 2000). La hembra coloca sus huevos en madrigueras de roedores, cortezas de árboles, basura doméstica; básicamente, donde las larvas puedan tener acceso a la materia orgánica, calor y humedad que necesitan para desarrollarse. En Guatemala, las 5 especies de vectores principales del género *Lutzomyia*, que han sido reportadas son: *L. olmeca olmeca*, *L. ovallesi*, *L. panamensis*, *L. ylephiletor* y *L. trapidoi*, además de algunos casos en los que se ha encontrado parásitos en *L. shannoni* y *L. cruciata* (Rowton *et al.*, 1991; WHO, 2018).

Figura 12: Mosca *Phlebotomus papatasi* alimentándose de sangre humana.



(CDC, 2017)

## G. Animales reservorios

Un reservorio puede ser definido como un sistema complejo formado por una o más especies que preservan a un agente patógeno en la naturaleza (Roque y Jansen, 2014). Se tiene registro de varios animales silvestres y domésticos que sirven de reservorios para las especies de *Leishmania* del Nuevo Mundo. Existe una relación ecológica entre el parásito y el reservorio, tanto que en algunos casos, las mismas especies de vectores y mamíferos están asociados como vectores y reservorios de una especie de parásito (OGE, 2000).

Los animales silvestres infectados con los parásitos se muestran asintomáticos respecto a la infección, aunque esta sea prolongada. Sin embargo, las infecciones en caballos, perros y humanos generan reacciones severas y cambios patológicos en órganos. En la mayoría de los casos, más de un mamífero sirve como hospedero, pero pocos son el reservorio principal, mientras que el resto son únicamente hospederos accidentales y no juegan ningún rol en el ciclo de transmisión de la enfermedad. El descubrimiento de nuevos hospederos simpátricos con el reservorio principal puede indicar que los parásitos poseen una gran diversidad genética y una resistencia inmunogenética en los hospederos principales (Rotureau, 2006). Existe evidencia de infecciones de *Leishmania*, en 7 órdenes de mamíferos, con nichos y comportamientos diferentes, lo cual genera que los reservorios sean bastante variables. Estos órdenes son Didelphimorphia (zarigüeyas), Pilosa (osos hormigueros, tamandúas y perezosos), Cingulata (armadillos), Rodentia (roedores), Carnivora (mamíferos carnívoros en general), Primates (primates no humanos) y Chiroptera (murciélagos) (Figura 11) (Roque y Jansen, 2014).

Figura 13: Mamíferos identificados como reservorios de parásitos del género *Leishmania*.



(Roque y Jansen, 2014).

## H. Tratamiento de la Leishmaniosis

### 1. Evaluación previa

Previo a administrar un tratamiento determinado, es necesario personalizar la evaluación de cada cuadro clínico. Se debe de tomar en cuenta la forma de leishmaniosis que está afectando, la especie del parásito que lo está causando, la severidad potencial del caso y la salud en general del paciente. Por lo general, la leishmaniosis cutánea se cura sola, incluso sin tratamiento. Sin embargo, este proceso puede durar meses o hasta años y las llagas tienden a dejar cicatrices de por vida. Además, otro riesgo a considerar es la probabilidad del desarrollo de leishmaniosis mucocutánea, debido a la dispersión de los parásitos hacia la boca o garganta. Por este motivo, se debe asegurar un adecuado tratamiento que prevenga las secuelas u otras formas de la enfermedad (CDC, 2013). El tratamiento de primera línea para la leishmaniosis cutánea consiste en compuestos de antimoniato pentavalente (SbV), amfotericina b y pentamidina; otros tratamientos alternos incluyen miltesfosina y azoles como el ketoconazol (Aronson *et al.*, 2016).

### 2. Antimoniales pentavalentes

Los principales medicamentos basados en antimoniales pentavalentes son el antimonato de meglumina (Glucantime®) y el estibogluconato de sodio o (Pentostam®). El mecanismo de acción de estos compuestos consiste en la interferencia de rutas metabólicas como la glucólisis, la oxidación de ácidos grasos y el

funcionamiento de la topoisomerasa Tipo I. Estos fármacos son empleados para tratar todos los tipos de leishmaniosis, pero su efectividad depende de la forma de la enfermedad, la especie del parásito y la región geográfica, siendo efectivos para *L. major* y *L. tropica*, *L. braziliensis*, *L. panamensis* y *L. guyanensis* (Arana, 2007; Kobets *et al.*, 2012). La desventaja de los antimoniales recae en sus efectos tóxicos que pueden provocar cardiotoxicidad, fallo renal, mialgia artralgia y en que no pueden ser aplicados a mujeres embarazadas y personas con enfermedades renales y cardíacas (Goto y Lindoso, 2010).

### 3. Amfotericina B

Es un antifúngico aislado a partir de *Streptomyces nodosus* que presenta actividad leishmanicida. Este medicamento actúa sobre el ergosterol (componente de la membrana celular del parásito), generando una entrada de iones que desequilibra el balance osmótico y mata al parásito (Goto y Lindoso, 2010). Las desventajas de la amfotericina B son que es poco soluble en agua, su biodisponibilidad es baja y puede causar daño renal (Kobets *et al.*, 2012).

### 4. Pentamidina

Este medicamento se utilizaba para tratar la leishmaniosis visceral en la India, pero fue abandonado debido a que perdió su eficacia y generaba efectos secundarios como daño renal, cardiopatía, un estado similar a diabetes mellitus e hipoglicemia (Kobets *et al.*, 2012). Sin embargo, ha sido utilizado con éxito en algunos lugares del Nuevo Mundo para tratar leishmaniosis cutánea (Soto-Mancipe, Grogl, y Berman, 1993). Su mecanismo de acción consiste en interferir la síntesis de ADN y modificar la morfología del cinetoplasto, promoviendo la fragmentación de la membrana de la mitocondria (Goto y Lindoso, 2010).

### 5. Tratamientos alternativos

Existen otros medicamentos que pueden emplearse para tratar la leishmaniosis como la miltefosina y la paromomicina, entre otros. La miltefosina es un tratamiento oral para la enfermedad que genera apoptosis en los promastigotes. Sin embargo, presenta efectos secundarios como problemas gastrointestinales y daño renal (Goto y Lindoso, 2010). Por su parte, la paromomicina es un antibiótico que se aplica de forma tópica y daña al parásito interfiriendo con el funcionamiento de la mitocondria y los ribosomas. No es muy efectiva para leishmaniosis cutánea (sí para la forma visceral) y los efectos secundarios incluyen náuseas, diarrea, vómitos, salpullido y vértigo (Wang y Fisher, 1977).

También existen formas de tratar la enfermedad que no involucran el consumo de medicamentos, estos son la termoterapia y la fototerapia. La primera se basa en la aplicación de calor sobre el área afectada por medio de compresas calientes, irradiación con luz ultravioleta o infrarroja o con instrumentos que calientan la herida, de forma que los parásitos mueran. Es un método barato y sin efectos secundarios, además, presenta resultados similares al tratamiento con antimoniales (López *et al.*, 2012). Otra metodología que puede utilizarse es la fototerapia, que consiste en la aplicación de dispositivos fotosensibilizantes sobre la úlcera. Existen moléculas dentro de las células parasitarias que absorben la luz y transfieren esta energía para liberar

oxígeno, el exceso de este último ocasiona la muerte de los parásitos, con una efectividad del 90% en el caso particular de *Leishmania major* (Asilian y Davami, 2006).

Cuadro 1: Cuadro comparativo de los tratamientos recomendados para Leishmaniosis cutánea.

<b>Tratamiento</b>	<b>Especies objetivo</b>	<b>Efectos secundarios</b>	<b>Cita</b>
<b>Antimoniales pentavalentes</b>	<i>L. major</i> y <i>L. tropica</i> , <i>L. braziliensis</i> , <i>L. panamensis</i> y <i>L. guyanensis</i>	Alta toxicidad cardíaca, fallo renal, mialgia y artralgia	(Gonçalves y Costa, 2018) (Arana, 2007) (Kobets <i>et al.</i> , 2012) (Goto y Lindoso, 2010)
<b>Amfotericina B</b>	<i>L. braziliensis</i> , <i>L. infantum</i> y <i>L. donovani</i>	Daño renal y hepático, descenso en niveles de potasio	(Kobets <i>et al.</i> , 2012) (Guery <i>et al.</i> , 2017).
<b>Pentamidina</b>	<i>L. braziliensis</i> , <i>L. panamensis</i> y <i>L. Mexicana</i>	Hipotensión, hipoglicemia y problemas gastrointestinales, daño renal, cardiopatía	(Soto-Mancipe <i>et al.</i> , 1993) (Kobets <i>et al.</i> , 2012).
<b>Miltefosina</b>	<i>L. panamensis</i>	Problemas gastrointestinales y daño renal	(Goto y Lindoso, 2010) (Soto <i>et al.</i> , 2004)
<b>Termoterapia</b>	Todas, pero principalmente <i>L. braziliensis</i> y <i>L. mexicana</i>	Quemaduras de segundo y tercer grado	(Gonçalves y Costa, 2018)
<b>Fototerapia</b>	<i>L. major</i>	Ninguno reportado	(Asilian y Davami, 2006)

## I. Diagnóstico

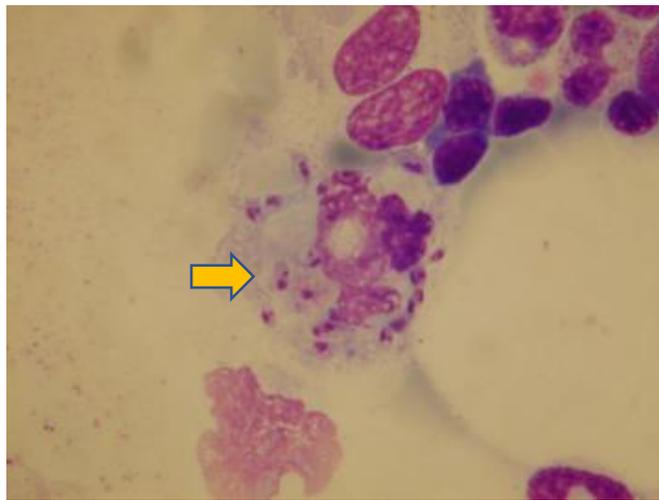
### 1. Microscopía

Esta técnica consiste en la observación de los parásitos en su forma de amastigotes (indicados con una flecha amarilla en la Figura 12) en un extendido de tejido de una lesión bajo un microscopio con un aumento de 1000 X (Weina *et al.*, 2004). Las tinciones empleadas con mayor frecuencia son la de hematoxilina y

eosina o la de Giemsa, pero principalmente se utiliza Giemsa, después de que la muestra ha sido fijada con metanol (Kobets *et al.*, 2012).

Ésta es la metodología más fácil y rápida para visualizar los parásitos de *Leishmania* debido a que es posible detectar y cuantificar los parásitos de forma directa. El método es considerado el estándar de oro del diagnóstico de la leishmaniosis cutánea por su alta especificidad. No obstante, es imposible identificar al parásito a nivel de especies con este método, debido a que no existen diferencias morfológicas identificables (Aronson *et al.*, 2016; Kobets *et al.*, 2012).

Figura 14: Amastigotes de *Leishmania* sp. en una muestra de tejido de una lesión, teñida con Giemsa.



(De Vries *et al.*, 2015)

## 2. Cultivo *in vitro*

El cultivo *in vitro* de los parásitos es un proceso complejo en el que se desea multiplicar estos organismos, obtenidos a partir de parásitos aislados de lesiones, luego de un proceso de incubación en un medio nutritivo como el medio Novy-MacNeal-Nicolle (NNN). Sin embargo, este procedimiento es difícil, requiere cierta pericia técnica, tiene tendencia a contaminarse y consume mucho tiempo (los parásitos pueden tardar semanas en crecer). Además, la sensibilidad del cultivo es por lo general baja y altamente variable (De Vries *et al.*, 2015). Es útil como un medio para reproducir los parásitos y que puedan utilizar en otros procedimientos para la identificación o el almacenamiento de muestras (Kobets *et al.*, 2012).

### 3. Métodos moleculares

#### a. MLEE (Electroforesis de enzimas multilocus)

La metodología MLEE consiste en analizar perfiles de electroforesis de enzimas extraídas a partir de los parásitos. Es considerado el estándar de oro de la tipificación de *Leishmania*, debido a que fue la técnica utilizada en los primeros estudios filogenéticos de este género. El método necesita de la preparación previa de cultivos de los parásitos y de la extracción de las enzimas a partir de los promastigotes (Kobets *et al.*, 2012).

Por lo general se utilizan 15 enzimas (basado en un método desarrollado en Montpellier, Francia) para describir una especie, entre las que se pueden mencionar la malato deshidrogenasa, la enzima mállica, isocitrato deshidrogenasa, 6-fosfogluconato deshidrogenasa y la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, entre otras. Los extractos enzimáticos son analizados por electroforesis y se registra la distancia que cada banda perteneciente a una enzima migra desde el origen, de forma que se obtiene en grupo de bandas con un patrón específico, conocido como zimodemo. Este perfil electroforético es utilizado para determinar la especie del parásito al compararlo con cepas de referencia. Sin embargo, debido a que requiere el cultivo del parásito, suele ser un método costoso que consume mucho tiempo (Rioux *et al.*, 1990; Kobets *et al.*, 2012).

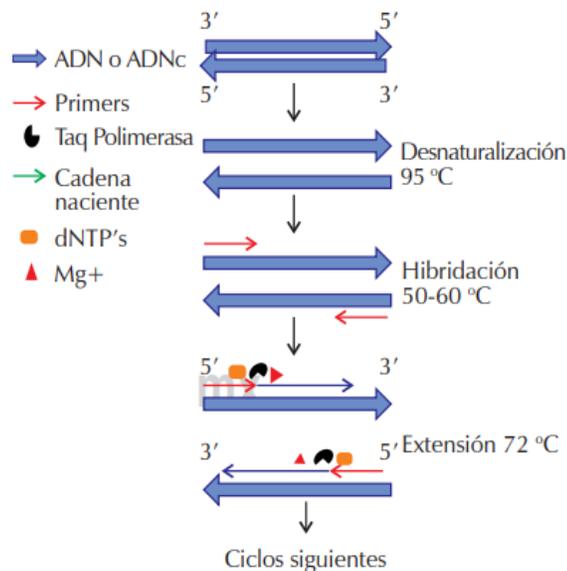
#### b. PCR y qPCR

Un PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa, por sus siglas en inglés) es una reacción enzimática que se utiliza para producir copias de una secuencia de ADN de interés. Utiliza una enzima Polimerasa (Comúnmente *Taq* Polimerasa) que amplifica o genera las copias de ADN, un buffer de reacción para mantener las condiciones de la reacción estables (pH principalmente), cloruro de magnesio (el magnesio es cofactor que promueve el funcionamiento de la enzima), nucleótidos, que son las unidades que usa la enzima para sintetizar los nuevos fragmentos de ADN, agua, un par de cebadores (*primers*), que son secuencias de nucleótidos que definen la secuencia que se va a amplificar y el ADN que será usado como plantilla para generar las demás. Este método se divide en tres etapas (desnaturalización, hibridación y extensión) que se identifican según la temperatura a la que ocurren (Figura 13). Se emplea un equipo llamado termociclador, que se encarga de controlar las temperaturas de cada etapa, de forma que se pueda optimizar cada procedimiento según se requiera (Tamay de Dios *et al.*, 2013).

Esta herramienta cuenta con la especificidad y sensibilidad suficiente para diferenciar entre especies de organismos, por lo cual ha ganado campo en estudios epidemiológicos. Además, es posible obtener resultados rápidos (menos de 1 día), trabajando con muestras cuya viabilidad sería un problema para otras técnicas (Montalvo *et al.*, 2008). Las muestras utilizadas en un PCR no tienen que estar estériles ni en una concentración tan alta como para otras técnicas (MLEE, por ejemplo), lo cual facilita su manejo. La mayor desventaja de esta metodología es la falta de protocolos estandarizados (Kobets *et al.*, 2012).

El PCR tiene dos modalidades que han sido exploradas para mejorar la especificidad y robustez de la técnica, las cuales son el PCR anidado y el PCR de tiempo real (qPCR). Un PCR anidado es un PCR que utiliza dos pares de *primers* y dos rondas de amplificación de ADN. Es decir, es un PCR que emplea el producto de la primera amplificación como el ADN plantilla de la segunda amplificación, lo cual incrementa la sensibilidad de la técnica. Por ejemplo, para estudios con *Leishmania*, la primera amplificación se realiza con *primers* universales que flanquean el gen *hsp70* y amplifican una región conservada entre todas las especies, mientras la segunda amplificación utiliza *primers* más específicos que los anteriores para amplificar secuencias únicas para cada especie o cepa (Kobets *et al.*, 2012).

Figura 15: Etapas de una reacción en cadena de la polimerasa (PCR).



(Tamay de Dios *et al.*, 2013).

El desarrollo del PCR de tiempo real ha permitido un diagnóstico aún más específico, reduciendo el tiempo y labor del experimentador. Esta modalidad del PCR utiliza los elementos de la metodología convencional, pero agrega el uso de un marcador fluorescente, conocido como sonda, que emite una radiación que es detectada por el equipo (termociclador) y permite cuantificar el producto que se está amplificando. Esta técnica ya ha sido utilizada para detectar el ADN de parásitos de *Leishmania* (Schulz *et al.*, 2003). En los estudios realizados con leishmaniosis, las regiones del ADN parasitario más empleadas han sido ADN del cinetoplasto (ADNk), el gen del citocromo b (*cytb*) mitocondrial (Asato *et al.*, 2009; Luyo-Acero *et al.*, 2004), el gen *hsp70* (Fraga *et al.*, 2010), y la región ITS1 (*Internal transcribed spacer*, en inglés) ubicada entre las regiones genómicas del ARN ribosomal 18S y 5.1S (Cupolillo *et al.*, 1995).

Para la detección de estos parásitos por PCR (especialmente qPCR), se ha utilizado el material del quinoplasto. Sin embargo, este no puede ser utilizado para su identificación, puesto que se carece de una metodología especie-específica, a diferencia del trabajo realizado con el gen *hsp70* (Bensoussan *et al.*, y 2006). El gen *hsp70* es la herramienta de mayor importancia en la tipificación de *Leishmania* debido a que ha demostrado ser un marcador confiable para determinar la especie del parásito y explicar las relaciones filogenéticas entre estos. Esta capacidad se debe a que se trata de una secuencia altamente conservadas entre las especies de *Leishmania*, por lo que es un blanco para detectar cambios evolutivos (Fraga *et al.*, 2010; Fraga *et al.*, 2013; Montalvo *et al.*, 2012).

### c. Análisis de polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP).

Esta técnica consiste en la digestión de ADN (un producto de PCR, por ejemplo) con enzimas de restricción para obtener fragmentos de longitud variable (dependiendo de los polimorfismos de la secuencia y del sitio de restricción reconocido por la enzima) que pueden ser separados y analizados por medio de una electroforesis en gel de agarosa. Esta metodología ha demostrado ser confiable y sensible para la adecuada determinación de la especie de los parásitos del género *Leishmania* y su efectividad compete con la del estándar de oro, la MLEE (Kobets *et al.*, 2012). La combinación de un PCR con RFLP y con secuenciación es una forma robusta y sensible para realizar estudios de filogenia e identificación de especies, utilizando el ADN del cinetoplasto (Bhattarai *et al.*, 2010), como el gen *hsp70* (Montalvo *et al.*, 2010, 2012; Van der Auwera *et al.*, 2013).

## 4. Otros métodos

También existen otros métodos basados en la detección de antígenos presentes en los parásitos causantes de la leishmaniosis. La detección de los mismos se realiza por medio de un ensayo enzimático conocido como ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay, en inglés). A través de esta técnica y con el uso de anticuerpos, es posible la detección de proteínas como la glicoproteína 63 (GP63), la cisteína proteinasa B (CPB) y la proteína de choque térmico 70 (HSP70), que son factores de virulencia del parásito y poseen una fuerte capacidad antigénica (Van der Auwera y Dujardin, 2015). Otro estudio también ha reportado la posibilidad de tipificar a los parásitos por medio de métodos analíticos como la espectrometría de masas, sin embargo la técnica necesita de los parásitos (previamente cultivados) y no es una técnica fácil de estandarizar entre laboratorios (Mouri *et al.*, 2014).

## V. METODOLOGÍA

### A. Sitio de estudio

Se trabajó con muestras procedentes de los departamentos de Guatemala: Petén, Alta Verapaz, Baja Verapaz, Izabal y Quiché, 5 de los 6 en los que se ha reportado una mayor cantidad de personas en riesgo de adquirir la enfermedad (Morales, 2008).

### B. Sujetos de estudio

Las muestras con las que se trabajó fueron proporcionadas por el laboratorio de Leishmaniosis del Centro de Estudios en Saludos de la Universidad del Valle de Guatemala (CES-UVG). Las mismas fueron recolectadas por el centro en actividades previas de investigación o diagnóstico y consisten en raspados de lesiones cutáneas de pacientes infectados con Leishmaniosis cutánea.

### C. Diseño, enfoque y tipo de investigación

La presente investigación se caracterizó por tener un enfoque cuantitativo debido a que se planteó una hipótesis que fue probada por medio de la recolección y análisis de los datos. El alcance de esta fue descriptivo, puesto que se plantea realizar la descripción de los cambios que han sucedido en la diversidad y proporción de especies de parásitos del género *Leishmania* sp. a lo largo de un período muestreado.

El diseño de este estudio fue no experimental, de corte transversal debido a que no se manipularon deliberadamente las variables para observar el comportamiento de un fenómeno, ni hubo una asignación aleatoria de los sujetos de estudio. Además, se documentó la proporción de especies y la diversidad en momentos temporales específicos sin dar seguimiento a los mismos sujetos.

### D. Tipo y tamaño de muestra

Se utilizó un método de muestreo probabilístico estratificado para definir el tamaño de la muestra a seleccionar. Debido a que las muestras colectadas están divididas en períodos de tiempo, se utilizó la modalidad proporcional, de forma que la distribución fuese acorde y representativa al tamaño de cada periodo de tiempo. El tamaño muestral por estrato fue calculado utilizando la fórmula para determinar proporciones de una población finita (Figura 16). Se trabajó con un nivel de confianza del 95% y un error de estimación del 10%. De igual forma, la probabilidad de ocurrencia del evento fue tomada como 0.7 para *L. braziliensis* y 0.3 para *L. mexicana*, los valores que fueron reportados por un estudio realizado por Herwaldt y colaboradores en Guatemala en 1992.

Figura 16: Fórmula para la determinación del número de muestra para proporciones y población finita.

$$n = \frac{P(1 - P)z_{\frac{\alpha}{2}}^2 N}{P(1 - P)z_{\frac{\alpha}{2}}^2 + e^2(N - 1)}$$

(Valdivieso *et al.*, 2011)

Donde:

P = Probabilidad de que sea *L. braziliensis*, es decir 0.7

1-P = Probabilidad de que sea *L. mexicana*, es decir 0.3

N = Número de muestras por período

e= error de estimación

Z= Estimador Z al 95% de confianza

El tamaño de la muestra a seleccionar, tomando en cuenta los parámetros anteriores, fue de 191 individuos, seleccionados de forma estratificada de acuerdo al número de muestras por periodo de tiempo y sitio de procedencia de los pacientes. Las muestras seleccionadas por sito y periodo de tiempo son las que se muestran en el Cuadro 1.

Cuadro 2: Distribución de las muestras seleccionadas para el estudio, tomadas previamente por el equipo de trabajo del CES-UVG en estudios y jornadas de diagnóstico.

Departamento	Décadas				Total por departamento
	1980-1989	1990-1999	2000-2009	2010-2017	
<b>Alta Verapaz</b>	4	8	6	17	35
<b>Baja Verapaz</b>	3	8	1	0	12
<b>Petén</b>	7	57	57	0	121
<b>Izabal</b>	2	6	8	1	17
<b>Quiché</b>	0	5	0	1	6
<b>Total por década</b>	16	84	72	19	191

## E. Criterios de inclusión

Se trabajó únicamente con las muestras que tuvieron un resultado parasitológico positivo para leishmaniosis, que tuvieran al menos cuatro láminas disponibles y que poseen datos generales del paciente como sexo, edad, sitio de procedencia año de colecta, número de lesiones, área de la lesión, tiempo de evolución de la lesión y tratamientos previos.

## F. Variables

Cuadro 3: Conceptualización y operacionalización de variables.

<b>Variable</b>	<b>Definición</b>	<b>Clasificación (Por naturaleza y escala de medición)</b>	<b>Unidades de medición</b>
Sexo	Condición orgánica que distingue a los seres humanos como hombre y mujer.	Cualitativa, nominal	1. Mujer 2. Hombre
Edad	Duración de la existencia de un ser vivo, medida en unidades de tiempo. Indicador: años cumplidos	Cuantitativa, razón ordinal	Cantidad de años cumplidos
Número de lesiones	Cantidad de heridas causadas por la enfermedad	Cuantitativa, razón	Cantidad de heridas
Área de lesiones	Espacio ocupado por la herida generada por el parásito, medida en centímetros (obtenida multiplicado el largo por el ancho de la herida)	Cuantitativa, razón	Área ocupada por la herida
Tiempo de evolución de la lesión	Duración de la presencia de la enfermedad en el paciente	Cuantitativa, nominal	Cantidad de meses
Tratamientos previos	Medios empleados por el paciente con el objetivo de buscar la cura o Alivio de la enfermedad	Cualitativa, ordinal	Identidad de los tratamientos empleadas por el paciente
Resultado parasitológico	Resultado de la observación de la muestra por microscopía óptica. Indicador: Presencia o ausencia de parásitos.	Cualitativa, nominal	Cantidad de signos “+”.

Variable	Definición	Clasificación (Por naturaleza y escala de medición)	Unidades de medición
Resultado por PCR	Resultado de la amplificación por PCR del material genético extraído de las muestras. Indicador: Presencia o ausencia de AND de los parásitos.	Cualitativa, nominal	1. Positivo 2. Negativo
Resultado por RFLP	Resultado objetivo de la digestión de productos de amplificación (de las muestras) con enzimas de restricción. Indicador: Similitud del patrón.	Cualitativa, nominal	1. <i>L. braziliensis</i> 2. <i>L. mexicana</i> 3. <i>L. panamensis</i>
Año de colecta	Año en el que fue tomada la muestra de la 29esión al participante	Cualitativa, nominal	Año (entre 1980 y 2017)

## G. Hipótesis

### 1. Hipótesis nulas

Ho1: La proporción de especies del género *Leishmania* sp. (0.7 para *L. braziliensis* y 0.3 para *L. mexicana*) no ha variado a lo largo de los años muestreados

Ho2: No existen especies agrupadas en clados diferentes a las especies de parásitos de Guatemala y las reportadas internacionalmente.

Ho3: No existe asociación entre la especie de parásito responsable de la infección y las características clínicas de la misma.

### 2. Hipótesis alternativas

Ha1: La proporción de especies del género *Leishmania* sp. (0.7 para *L. braziliensis* y 0.3 para *L. mexicana*) ha variado a lo largo de los años muestreados

Ha2: Existen especies agrupadas en clados diferentes a las especies de parásitos de Guatemala y las reportadas internacionalmente.

Ha3: Existe asociación entre la especie de parásito responsable de la infección y las características clínicas de la misma.

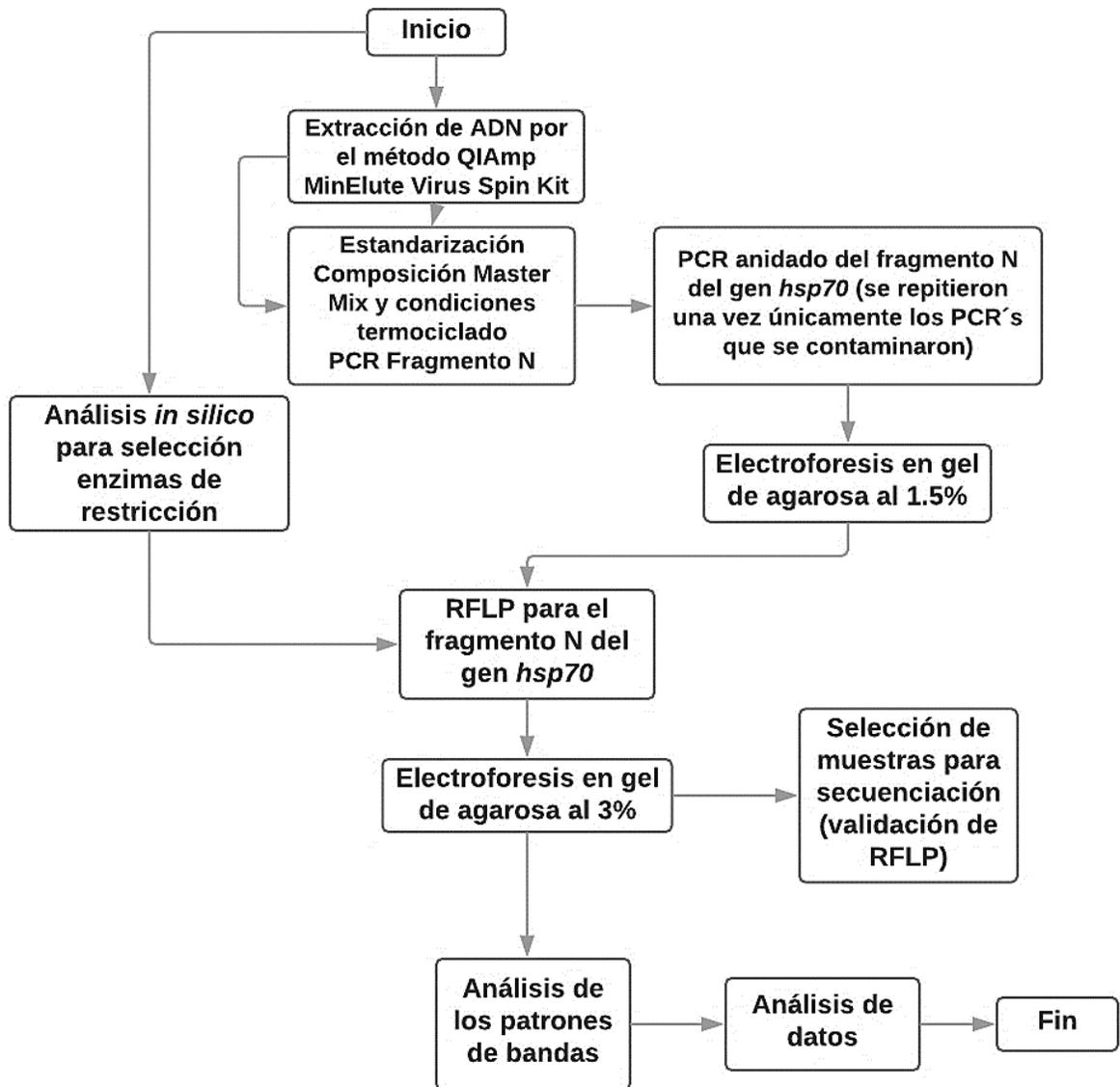
## H. Instrumentos de medición

Debido a que este estudio no involucró la recolección de datos a partir de encuestas o fichas de campo, no se empleó ningún instrumento de medición.

## I. Procedimiento

Se realizó un análisis *in silico* para el desarrollo de un nuevo algoritmo para RFLP a partir de secuencias codificantes para la proteína HSP70 disponibles en la base de datos GenBank y de un estudio previo (Juárez, 2017). Luego se llevó a cabo una extracción de ADN a partir de muestras de raspados de lesiones teñidas con Giemsa. Posteriormente, se realizó la amplificación de la secuencia del gen codificante para la proteína HSP70 (PCR anidado para fragmento N). Finalmente, se realizó la identificación de los parásitos a través del análisis de RFPL de los amplicones obtenidos. En la Figura 17 se muestra un diagrama de flujo de la metodología que se siguió.

Figura 17: Diagrama de flujo de estandarización de la metodología para la caracterización de *Leishmania* en Guatemala mediante PCR-RFLP.



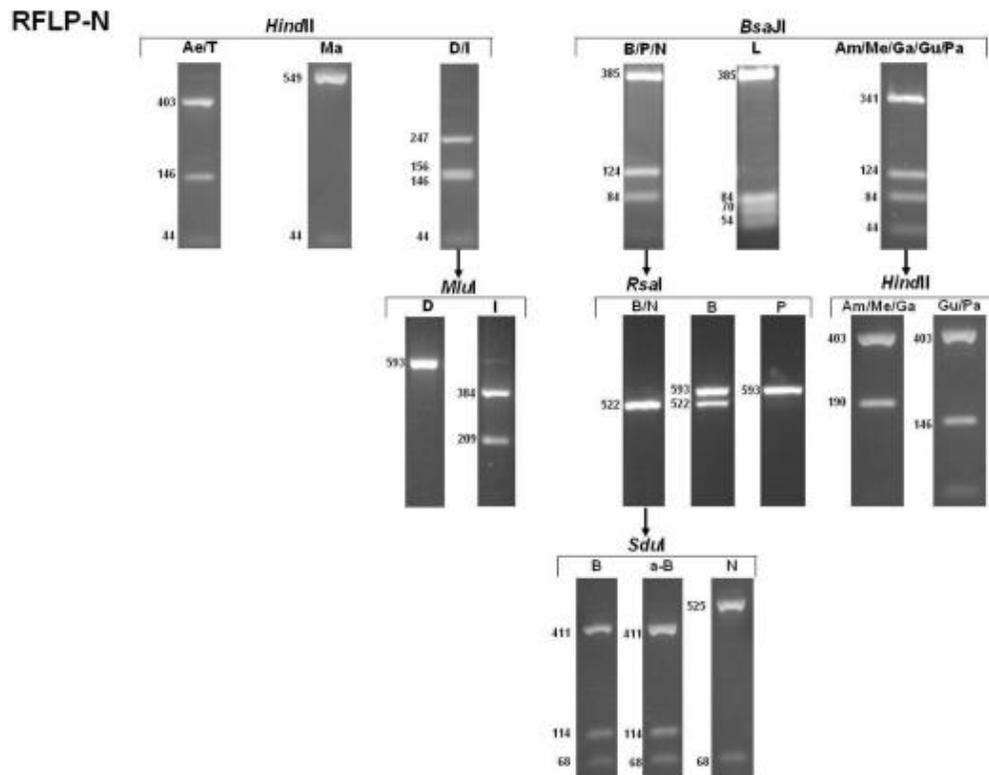
## 1. Consideraciones éticas

Durante el desarrollo de este estudio, el estudiante no tuvo contacto con los participantes de los que se obtuvo las muestras, dado que se utilizaron muestras recolectadas tanto durante actividades de diagnóstico en estaciones de campo o comunidades de las regiones endémicas de Petén y Alta Verapaz, como en investigaciones realizadas por el grupo de leishmaniasis del Centro de Estudios en Salud de la UVG. No se realizó una recolección de muestras adicionales. Además, se trabajó con una base de datos que incluía solamente los códigos de las muestras y no se tuvo acceso a información privada identificable de los pacientes que las proporcionaron.

## 2. Análisis *in silico* para RFLP

Para analizar las secuencias del gen *hsp70* de *Leishmania* spp. e identificar sitios de restricción para la elaboración del algoritmo para identificación de especies, se utilizaron los softwares Geneious R11.1, DNASTAR Lasergene 15.2 y MEGA7. Como referencia se utilizaron secuencias obtenidas de la base de datos GenBank y otras secuencias para Guatemala, reportadas en un trabajo previo sobre diversidad genética de *Leishmania* spp (GE-2019, GE-2156 y GE-1485). (Juárez, 2017). Las secuencias utilizadas fueron *Leishmania mexicana amazonensis* (GenBank: EU599090.1), *Leishmania mexicana* (GenBank: EU599091.1) *Leishmania infantum* (GenBank: HF586350.1 y HF586408.1), *Leishmania braziliensis* (GenBank: EU599088.1, FR715990.1 y HF586369.1), *Leishmania guyanensis* (GenBank: EU599093.1), *Leishmania panamensis* (GenBank: EU599094.1), *Leishmania major* (GenBank: HF586398.1), *Leishmania lainsoni* (GenBank: GU071174.1) y *Leishmania naiffi* (GenBank: FN395056.2).

Figura 18: Algoritmo de restricción propuesto y optimizado en otros estudios de tipificación de *Leishmania*.



Ae: *L. aethiopica*; T: *L. tropica*; Ma: *L. major*; D: *L. donovani*; I: *L. infantum*; B: *L. braziliensis*; P: *L. peruviana*; N: *L. naiffi*; L: *L. lainsoni*; Am: *L. amazonensis*; Me: *L. mexicana*; G: *L. garhnami*; Gu: *L. guyanensis*; Pa: *L. panamensis*; a-B: atypical *L. braziliensis*

(IMTA<sub>vH</sub> – ITM, 2013)

### 3. Extracción de ADN

Se llevó a cabo la extracción de ADN para las 191 muestras seleccionadas, obteniéndose el material genético del parásito a partir de láminas de extendido de lesiones teñidas con Giemsa. Para esto se raspó el material de cada lámina con un bisturí estéril y se resuspendió en 200  $\mu$ L de agua grado DEPC (dietilpircarbonato) en un tubo de 1.5 mL. Para extraer el material genético se utilizó el kit comercial QIAamp® MinElute® Virus Spin Kit (Qiagen, catálogo 57704) de acuerdo con las indicaciones del fabricante. Se utilizaron 2  $\mu$ L de cada extracto como ADN plantilla para la amplificación.

Se agregó 25  $\mu$ L de proteasa QIAGEN al tubo con los 200  $\mu$ L de muestra y luego se añadieron 200  $\mu$ L de buffer de lisis AL, se colocaron en un vortex por 15 segundos y se incubaron a 56 °C durante 10 minutos. Se centrifugó el tubo por un corto tiempo (minispin) y se procedió a añadir 250  $\mu$ L de etanol absoluto, se incubó por cinco minutos a temperatura ambiente y se repitió el procedimiento de colocar las muestras en un vórtex y centrifugar brevemente. Se transfirió la mezcla obtenida a una columna QIAamp MinElute (en un tubo de colecta de 2.0 mL) y se centrifugó a 8000 rpm por 1 minuto (Heraeus® Biofuge® Pico)

Luego, se agregaron 500  $\mu$ L de buffer AW1 y se centrifugó nuevamente bajo las mismas condiciones (8000 rpm por 1 minuto) y se colocó la columna en un nuevo tubo. Se repitió este paso utilizando 500  $\mu$ L de buffer AW2. Posteriormente, se agregaron 500  $\mu$ L de etanol absoluto y se centrifugó a 8000 rpm por 1 minuto. Después se colocó la columna en un nuevo tubo de colecta para centrifugarlo a 12.500 rpm por 3 minutos para secar la membrana. Luego, se cambió tubo para incubar las columnas con la tapa abierta durante 15 minutos a 56 °C. Por último, se agregaron 60  $\mu$ L de buffer AVE a la columna, se incubó a temperatura ambiente por 1 minuto y se centrifugó a 12,500 rpm por 1 minuto. Los extractos se almacenaron a -80 °C previo a ser utilizados.

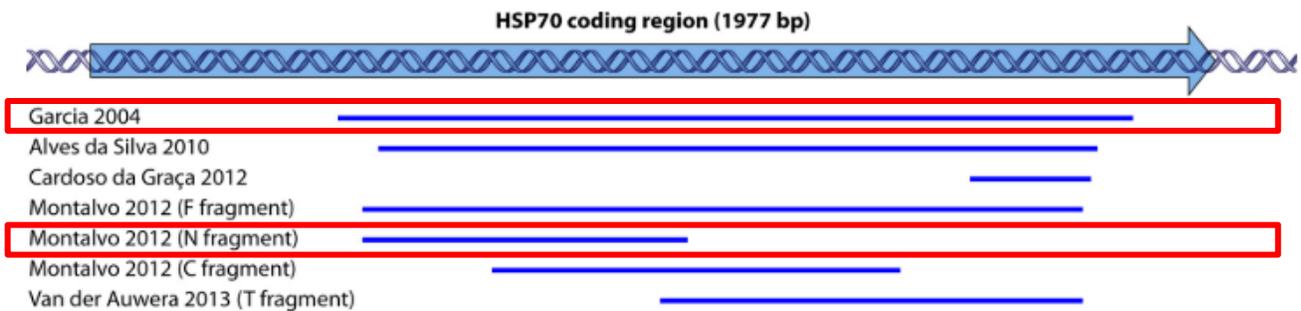
### 4. PCR anidado

Los protocolos de PCR para los fragmentos de 1422 (PCR-G) y 593 (PCR-N) pares de bases (bp) se realizaron en reacciones con un volumen final de 25  $\mu$ L, que contenían 1x buffer de reacción TONBO; 3mM de cloruro de magnesio; 1 mM de deoxinucleósido de trifosfato (dNTP's); 0.8  $\mu$ M de cada primer; 1x solución Q, y 1 U de la enzima Classic ++<sup>TM</sup> Hot Start Taq (2 U para el PCR-N) (TONBO, Lote M501005311731 y REF 31-5010-0250U). Se utilizaron 2  $\mu$ L de ADN para el PCR-G sin importar su concentración y luego se emplearon 4  $\mu$ L del primer producto de amplificación como plantilla para el PCR-N. Para todas amplificaciones se incluyeron controles negativos sin ADN plantilla y un control positivo que consistió en 2  $\mu$ L de ADN de *Leishmania braziliensis* de la cepa M2903 con una concentración de 71.91 ng/ $\mu$ L. Las condiciones de amplificación fueron: desnaturalización inicial a 95 °C por 5 min; seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 94 °C por 40 s; hibridación a 61 °C por 1 min; elongación a 72 °C por 2 min (para el PCR-N fue de 1 min) y una elongación final de 10 min a 72 °C. La amplificación se realizó en un

termociclador MasterCycler 5331 (Eppendorf®). Toda la información sobre la composición de las mezclas de reacción para todos los PCR y las condiciones de amplificación de cada uno se encuentran resumidas en los anexos 4-7. Los *primers* fueron diseñados previamente en otros estudios sobre tipificación de *Leishmania*, los cuales se observan en la Figura 19 (Montalvo *et al.*, 2012; Van der Auwera *et al.*, 2013). Se estandarizó el protocolo de amplificación utilizando como templado 2 µL de ADN para el PCR del fragmento de 1422 bp y 4 µL para el PCR del fragmento de 593 bp.

Los productos de amplificación se almacenaron a -20 °C hasta su digestión. El éxito de la extracción de ADN se evaluó por medio de la amplificación del gen de la Betaglobina humana, con un producto de amplificación esperado de 268 bp (Coutlée *et al.*, 2000). Se prepararon reacciones de 20 µL que contenían 1X buffer de reacción con cloruro de magnesio (1.5 mM) (Roche®); 0.2 mM de una mezcla de dNTP's; 0.8 µM de cada primer y 1.25 U de Taq ADN Polimerasa (Roche®). Se utilizó 1 µL de ADN como plantilla y al igual que en el PCR del marcador *hsp70*, se incluyeron controles sin templado de ADN y un control positivo que consistió en una muestra de médula ósea de un paciente con leishmaniasis visceral. Las condiciones de amplificación fueron: desnaturalización inicial a 95 °C por 3 min; seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 95 °C por 35 s; hibridación a 57 °C por 35 s; elongación a 72 °C por 1 min y una elongación final de 10 min a 72 °C. La amplificación se realizó en un termociclador MasterCycler 5331 (Eppendorf®). En el Cuadro 3 se presentan todos los pares de *primers* que fueron utilizados en este estudio.

Figura 19: Ubicación de los *primers* utilizados para amplificar los segmentos del marcador *hsp70*.



(Van der Auwera y Dujardin, 2015)

El par de *primers* que fueron propuestos por García y colaboradores en 2004 se utilizó para la amplificación de un fragmento de 1422 bp del gen *hsp70*. Mientras, los *primers* que amplifican un fragmento de menor tamaño (593 bp) corresponden al fragmento N, desarrollado por Montalvo y colaboradores en 2012.

Cuadro 4: *Primers* para la amplificación de los fragmentos de ADN de interés.

Gen amplificado	Nombre	Secuencia (5'-3')	Anillamiento (pares de bases)	Longitud	Cita
Fragmento G del gen <i>hsp70</i>	HSP70-sen	GACGGTGCCTGCCTACTTCAA	435-455	21	Montalvo <i>et al.</i> , 2012
	HSP70-ant	CCGCCATGCTCTGGTACATC	1856-1836	21	
Fragmento N del gen <i>hsp70</i>	HSP70-F25	GGACGCCGGCAGGATTCT	480-498	19	
	HSP70-R617	CGAAGAAGTCCGATACGAGGGA	1072-1051	22	
B-globina humana	GH <sub>2</sub> O (forward)	GAAGAGCCAAGGACAGGTAC	-----	20	Coutlée <i>et al.</i> , 2000
	PCO <sub>4</sub> (reverse)	CCACTTCATCCACGTTACC	-----	20	

## 5. RFLP

El análisis por RFLP se realizó utilizando los 122 amplicones obtenidos del fragmento N (593 pb). Las digestiones se llevaron a cabo en un volumen final de 20 µL que contenían 5 µL del amplicón en buffer de reacción CutSmart (New England Biolabs) 1X, 4U *Bsa*II (New England Biolabs) y 4U *Rsa*I (New England Biolabs). Las reacciones se incubaron por 3 horas a 37 °C, excepto por *Bsa*II que se incubó a 55 °C. Se realizaron las digestiones de las 122 muestras con *Bsa*II y para 6 muestras con *Rsa*I. Se utilizó la enzima *Hae*III para la digestión de tres muestras (GE-1683, GE-360 y GE-271) que no mostraban un patrón de restricción definitivo con la enzima *Bsa*II.

Se guardaron los productos de restricción a 4 °C y se visualizaron los patrones en un gel de agarosa como se describe en la sección 6. b. Se compararon los patrones obtenidos con los reportados para las diferentes especies de parásitos responsables de la leishmaniosis cutánea.

## 6. Electroforesis

### a. Electroforesis de productos de amplificación

Los productos de PCR se separaron por electroforesis en gel de agarosa. Para esto, se prepararon geles de agarosa al 1.5% (p/v), utilizando 0.75 g de agarosa (Agarosa tipo I, VWR lote 0176C250) y 50 mL de buffer Tris-Borato-EDTA (TBE) 1X (Invitrogen) conteniendo 0.3X de GelRed o SYBR Green (Anexo 9) (Huang *et al.*, 2010). Se cargaron 3 µL del marcador de masa molecular de 100 bp (fragmento de 593 pb) o 1 Kb (fragmento 1,422 pb) + 1 µL de buffer de carga 6X. Para las muestras, se cargó una mezcla de 4 µL del producto de amplificación + 1 µL de buffer de carga 6 X. La electroforesis se realizó con buffer TBE 1X a 17 voltios/cm por 30 minutos. Posteriormente, se visualizó el gel bajo luz UV (302 nm) en un transiluminador con sistema de documentación fotográfica integrado (Sistema PhotoDoc-It, UVP).

## b. Electroforesis de productos de digestión para RFLP

Los productos de la digestión con enzimas de restricción se separaron en geles de agarosa al 3.0 % (3.0 g de agarosa disuelta en 100 mL de buffer TBE), conteniendo 0.3 X de GelRed o SYBR Green (Huang *et al.*, 2010).

Se colocaron 5  $\mu$ L de la escalera de masa molecular de 100 bp (Promega) + 1  $\mu$ L de buffer de carga 6X (Promega) y luego se agregaron 10  $\mu$ L de los productos de digestión en cada pozo (con 1  $\mu$ L del mismo buffer de carga anterior) y se dejó correr el gel a 6.25 voltios/centímetro durante 3 horas (Cámara de electroforesis Thermo Scientific) en buffer TBE 0.5 X (Sanderson, Araki, Lilley, Guerrero, & Lewis, 2014). Finalmente, se visualizaron los patrones de bandas obtenidas bajo luz UV (302 nm) en un transiluminador (Sistema PhotoDoc-It, UVP) y se registró el resultado con una fotografía.

## 7. Validación de resultados por secuenciación

Un 30% de las muestras a las que se les realizó el análisis de PCR-RFLP también se secuenciaron (Macrogen, Inc. en Corea del Sur). Estas muestras se seleccionaron según los patrones obtenidos, dando prioridad las muestras con patrones no reportados por otros estudios que utilizaran este método combinado de PCR con RFLP. El resto de muestras se eligieron de forma aleatoria. Posteriormente, se hizo un alineamiento de las secuencias obtenidas para observar las similitudes entre estas.

## J. Análisis de datos

### 1. Análisis de patrones de restricción

Se analizaron las fotografías de geles de agarosa con el software Gel Analyzer 2010 para determinar los tamaños de los fragmentos, resultado de las digestiones enzimáticas. De acuerdo con este patrón se pudo diferenciar entre las especies de parásitos responsables de leishmaniosis cutánea en las regiones e intervalos de tiempo muestreados. Se colocó un marcador de masa molecular para validar el tamaño de los fragmentos obtenidos y que los mismos correspondieran a los esperados luego de su digestión con enzimas de restricción.

### 2. Elaboración de una serie de tiempo para proporción de especies de *Leishmania* sp.

Se generó una serie de tiempo comparando la proporción de especies encontradas en los diferentes períodos muestreados. Se trabajó con datos de todos los años muestreados dentro del período que va desde los 80's hasta la actualidad (1980-1989, 1990-1999, 2000-2009, 2010-actualidad) y se analizaron los datos por cada año, de forma que se pudiera inferir si los cambios que pudieron influenciar en la distribución de estos parásitos. Este análisis fue desarrollado utilizando el software GraphPad Prism 6. Luego de obtener los productos de PCR, se realizó una prueba de chi cuadrado con el software R versión 3.3.2. para evaluar el

sesgo en las muestras con un resultado positivo para la amplificación del fragmento de 593 bp del marcador *hsp70*.

### 3. Regresión logística multinomial

Se realizó también una regresión logística multinomial para determinar la posibilidad de predecir la especie de parásito responsable de la infección en base a variables recolectadas con las muestras. Las variables por considerar fueron el área de las lesiones y el tiempo de evolución de estas. Este análisis también se desarrolló utilizando el complemento XLSTAT para Microsoft Excel de Office 365. Las categorías posibles para designar una especie de parásitos fueron *L. braziliensis*, *L. guyanensis*/*L. panamensis*, Infección mixta e Indeterminada.

### 4. Construcción de árbol filogenético

Se obtuvieron las secuencias sentido y antisentido de los productos de amplificación y se utilizó el software MEGA7 para generar las secuencias consenso. Posteriormente, se utilizó un BLASTn (*Basic Local Alignment Search Tool*, por sus siglas en inglés) para realizar un análisis de similitud con secuencias de *Leishmania* sp. reportadas en bases de datos internacionales. Se compararon las variantes genéticas identificadas en cada complejo de especies (*L. braziliensis* y *L. mexicana*) contra especies reportadas en bases de datos internacionales, para estudiar sus relaciones evolutivas. Para esto se construyó un árbol filogenético a partir de los datos obtenidos de la secuenciación, las secuencias obtenidas a partir del GenBank mencionadas anteriormente y tres secuencias del estudio de Juárez en 2017 (GE-1485, GE-2019 y GE-2156). Para la elaboración del árbol se utilizó el algoritmo estadístico “Maximum likelihood”, utilizando el software MEGA 7, aplicando el modelo de sustitución de Tamura-Nei.

## VI. RESULTADOS

### A. Características de la muestra

Las 191 muestras analizadas en este estudio provinieron de personas con infecciones activas de leishmaniosis cutánea con un rango de edad de 3-90 años, con una mediana de 21 años, y el 91% (174/191) fue de sexo masculino. Se analizó al menos una muestra por año del periodo de 1987 a 2017, con excepción en los años 1991, 2004 y 2012. Según la ubicación geográfica el 63% (121/191) de las muestras analizadas fueron infecciones captadas en Petén, un 18% (35/191) en Alta Verapaz y el 18% (35/191) en los departamentos de Baja Verapaz, Izabal y Quiché. La media de tiempo de evolución de las lesiones fue de 90 días y el área promedio de 7.0 cm<sup>2</sup>. La información individual de las muestras utilizadas se presenta en el Anexo 2.

### B. Análisis *in silico* para RFLP

Según este análisis y a algoritmos reportados previamente para América (Fraga *et al.*, 2012, 2013, Montalvo *et al.*, 2008, 2012; Montalvo *et al.*, 2010; Van der Auwera *et al.*, 2016), se identificaron las siguientes enzimas como candidatas para el diseño del algoritmo: *BsaII*, *HincII*, *BccI*, *HaeIII*, *RsaI*, *MluI* y *SduI*. Según el análisis *in silico*, las enzimas que permitirían separar a las especies de interés en el continente americano y que generarían una cantidad adecuada de bandas (entre 2-5 fragmentos) con un tamaño adecuado para su visualización (no menos de 50 bp) serían *BsaII*, *BccI* e *HincII*. Se prefirió el uso de *HincII* en lugar de *BccI* porque la primera generaba una menor cantidad de bandas en el análisis *in silico*. Sin embargo, al realizar los cortes con *HincII* no se obtuvieron los patrones esperados según el análisis *in silico*, por lo que se realizó el corte únicamente con la enzima *BsaII*. No fue posible completar el resto del algoritmo que ya está publicado (Fraga *et al.*, 2013; Garcia *et al.*, 2004; Montalvo *et al.*, 2010, 2012) debido a limitaciones de tiempo.

El alineamiento de las secuencias utilizadas para la identificación de sitios de restricción y el algoritmo propuesto para los patrones de restricción del fragmento N del marcador *hsp70* se pueden visualizar en las Figuras 20 y 21, respectivamente.

Figura 20: Alineamiento de las secuencias de *Leishmania* utilizadas para identificar sitios de restricción.

<i>L. lainsoni</i>	CAACGTCGACTTCCAGGCCAACATCACGCGCGCGCTTCGAGGAGCTGTGCGGCGACCT	429
<i>L. naiffi</i>	CAACGTCGACTTCCAGGCCAACATCACGCGCGCGCTTCGAGGAGCTGTGCGGCGACCT	480
<i>L. braziliensis</i>	CAACGTCGACTTCCAGGCCAACATCACGCGCGCGCTTCGAGGAGCTGTGCGGCGACCT	480
<i>L. braziliensis</i>	CAACGTCGACTTCCAGGCCAACATCACGCGCGCGCTTCGAGGAGCTGTGCGGCGACCT	480
<i>L. braziliensis</i>	CAACGTCGACTTCCAGGCCAACATCACGCGCGCGCTTCGAGGAGCTGTGCGGCGACCT	480
<i>L. guyanensis</i>	CAACGTCGACTTCCAGGCCAACATCACGCGCGCGCTTCGAGGAGCTGTGCGGCGACCT	480
<i>L. panamensis</i>	CAACGTCGACTTCCAGGCCAACATCACGCGCGCGCTTCGAGGAGCTGTGCGGCGACCT	480
<i>L. amazonensis</i>	TAACGTTGACTTCCAGGCCAACATCACGCGCGCGCTTCGAGGAGCTGTGCGGCGACCT	480
<i>L. mexicana</i>	TAACGTTGACTTCCAGGCCAACATCACGCGCGCGCTTCGAGGAGCTGTGCGGCGACCT	480
<i>L. major</i>	GAACATTGACTTCCAGGCCAACATCACGCGCGCGCTTCGAGGAGCTGTGCGGCGACCT	437
<i>L. infantum</i>	GAACGTTGACTTCCAGGCCAACATCACGCGCGCGCTTCGAGGAGCTGTGCGGCGACCT	480
<i>L. infantum</i>	GAACGTTGACTTCCAGGCCAACATCACGCGCGCGCTTCGAGGAGCTGTGCGGCGACCT	437
	*** * ***** ***** *****	
<i>L. lainsoni</i>	GTTCCGCAGCACCATGCAGCCGGTGGAGCGCGTGTGCAGGACGCGAAGATGGACAAGCG	489
<i>L. naiffi</i>	GTTYCGCAGCACAATGCAGCCGGTGGAGCGCGTGTGCAGGACGCGAAGATGGACAAGCG	540
<i>L. braziliensis</i>	GTTCCGCAGCACAATGCAGCCGGTGGAGCGCGTGTGCAGGACGCGAAGATGGACAAGCG	540
<i>L. braziliensis</i>	GTTCCGCAGCACAATGCAGCCGGTGGAGCGCGTGTGCAGGACGCGAAGATGGACAAGCG	540
<i>L. braziliensis</i>	GTTCCGCAGCACAATGCAGCCGGTGGAGCGCGTGTGCAGGACGCGAAGATGGACAAGCG	540
<i>L. guyanensis</i>	GTTCCGCAGCACAATGCAGCCGGTGGAGCGCGTGTGCAGGACGCGAAGATGGACAAGCG	540
<i>L. panamensis</i>	GTTCCGCAGCACAATGCAGCCGGTGGAGCGCGTGTGCAGGACGCGAAGATGGACAAGCG	540
<i>L. amazonensis</i>	GTTCCGCAGCACAATGCAGCCGGTGGAGCGCGTGTGCAGGACGCGAAGATGGACAAGCG	540
<i>L. mexicana</i>	GTTCCGCAGCACAATGCAGCCGGTGGAGCGCGTGTGCAGGACGCGAAGATGGACAAGCG	540
<i>L. major</i>	GTTCCGCAGCACAATGCAGCCGGTGGAGCGCGTGTGCAGGACGCGAAGATGGACAAGCG	497
<i>L. infantum</i>	GTTCCGCAGCACAATGCAGCCGGTGGAGCGCGTGTGCAGGACGCGAAGATGGACAAGCG	540
<i>L. infantum</i>	GTTCCGCAGCACAATGCAGCCGGTGGAGCGCGTGTGCAGGACGCGAAGATGGACAAGCG	497
	*** ***** ** ***** *****	
<i>L. lainsoni</i>	CTCCGTGCACGACGTGGTGTCTGGTGGGCGGGTGCAGCGCATCCCAGAAAGGTGCAGTCCCT	549
<i>L. naiffi</i>	CTCCGTGCACGACGTGGTGTCTGGTGGGCGGGTGCAGCGCATCCCAGAAAGGTGCAGTCCCT	600
<i>L. braziliensis</i>	CTCCGTGCACGACGTGGTGTCTGGTGGGCGGGTGCAGCGCATCCCAGAAAGGTGCAGTCCCT	600
<i>L. braziliensis</i>	CTCCGTGCACGACGTGGTGTCTGGTGGGCGGGTGCAGCGCATCCCAGAAAGGTGCAGTCCCT	600
<i>L. braziliensis</i>	CTCCGTGCACGACGTGGTGTCTGGTGGGCGGGTGCAGCGCATCCCAGAAAGGTGCAGTCCCT	600
<i>L. guyanensis</i>	CTCCGTGCACGACGTGGTGTCTGGTGGGCGGGTGCAGCGCATCCCAGAAAGGTGCAGTCCCT	600
<i>L. panamensis</i>	CTCCGTGCACGACGTGGTGTCTGGTGGGCGGGTGCAGCGCATCCCAGAAAGGTGCAGTCCCT	600
<i>L. amazonensis</i>	CTCCGTGCACGACGTGGTGTCTGGTGGGCGGGTGCAGCGCATCCCAGAAAGGTGCAGTCCCT	600
<i>L. mexicana</i>	CTCCGTGCACGACGTGGTGTCTGGTGGGCGGGTGCAGCGCATCCCAGAAAGGTGCAGTCCCT	600
<i>L. major</i>	CTCCGTGCACGACGTGGTGTCTGGTGGGCGGGTGCAGCGCATCCCAGAAAGGTGCAGTCCCT	557
<i>L. infantum</i>	CTCCGTGCACGACGTGGTGTCTGGTGGGCGGGTGCAGCGCATCCCAGAAAGGTGCAGTCCCT	600
<i>L. infantum</i>	CTCCGTGCACGACGTGGTGTCTGGTGGGCGGGTGCAGCGCATCCCAGAAAGGTGCAGTCCCT	557
	***** *****	
<i>L. lainsoni</i>	CGTGTGCGACTTCTTCGGCGGCAAGGAGCTGAACAAGAGCATCAACCCCGACGAGGCTGT	609
<i>L. naiffi</i>	CGTGTGCGACTTCTTCGGCGGCAAGGAGCTGAACAAGAGTATCAACCCCGACGAGGCTGT	660
<i>L. braziliensis</i>	CGTGTGCGACTTCTTCGGCGGCAAGGAGCTGAACAAGAGCATCAACCCCGACGAGGCTGT	660
<i>L. braziliensis</i>	CGTGTGCGACTTCTTCGGCGGCAAGGAGCTGAACAAGAGCATCAACCCCGACGAGGCTGT	660
<i>L. braziliensis</i>	CGTGTGCGACTTCTTCGGCGGCAAGGAGCTGAACAAGAGCATCAACCCCGACGAGGCTGT	660
<i>L. guyanensis</i>	CGTGTGCGACTTCTTCGGCGGCAAGGAGCTGAACAAGAGCATCAACCCCGACGAGGCTGT	660
<i>L. panamensis</i>	CGTGTGCGACTTCTTCGGCGGCAAGGAGCTGAACAAGAGCATCAACCCCGACGAGGCTGT	660
<i>L. amazonensis</i>	CGTGTGCGACTTCTTCGGCGGCAAGGAGCTGAACAAGAGCATCAACCCCGACGAGGCTGT	660
<i>L. mexicana</i>	CGTGTGCGACTTCTTCGGCGGCAAGGAGCTGAACAAGAGCATCAACCCCGACGAGGCTGT	660
<i>L. major</i>	CGTGTGCGACTTCTTCGGCGGCAAGGAGCTGAACAAGAGCATCAACCCCGACGAGGCTGT	617
<i>L. infantum</i>	CGTGTGCGACTTCTTCGGCGGCAAGGAGCTGAACAAGAGCATCAACCCCGACGAGGCTGT	660
<i>L. infantum</i>	CGTGTGCGACTTCTTCGGCGGCAAGGAGCTGAACAAGAGCATCAACCCCGACGAGGCTGT	617
	***** *****	



<i>L. lainsoni</i>	GACGAAGGACTGCCACCTGCTGGGCACGTTTCGACTTGTCCGGCATCCCGCCAGCGCCGCG	989
<i>L. naiffi</i>	GACGARGGACTGCCACCTGCTGGGCACGTTTCGACTTGTCCGGCATCCCGCCAGCGCCGCG	960
<i>L. braziliensis</i>	GACGAAGGACTGCCACCTGCTGGGCACGTTTCGACTTGTCCGGCATCCCGCCAGCGCCGCG	960
<i>L. braziliensis</i>	GACGAAGGACTGCCACCTGCTGGGCACGTTTCGACTTGTCCGGCATCCCGCCAGCGCCGCG	960
<i>L. guyanensis</i>	GACGAAGGACTGCCACCTGCTGGGCACGTTTCGACTTGTCCGGCATCCCGCCAGCGCCGCG	960
<i>L. panamensis</i>	GACGAAGGACTGCCACCTGCTGGGCACGTTTCGACTTGTCCGGCATCCCGCCAGCGCCGCG	960
<i>L. amazonensis</i>	GACGAAGGACTGCCACCTGCTGGGCACGTTTCGACTTGTCCGGCATCCCGCCAGCGCCGCG	960
<i>L. mexicana</i>	GACGAAGGACTGCCACCTGCTGGGCACGTTTCGACTTGTCCGGCATCCCGCCAGCGCCGCG	960
<i>L. major</i>	GACGAAGGACTGCCACCTGCTGGGCACGTTTCGACTTGTCCGGCATCCCGCCAGCGCCGCG	917
<i>L. infantum</i>	GACGAAGGACTGCCACCTGCTGGGCACGTTTCGACTTGTCCGGCATCCCGCCAGCGCCGCG	960
<i>L. infantum</i>	GACGAAGGACTGCCACCTGCTGGGCACGTTTCGACTTGTCCGGCATCCCGCCAGCGCCGCG	917

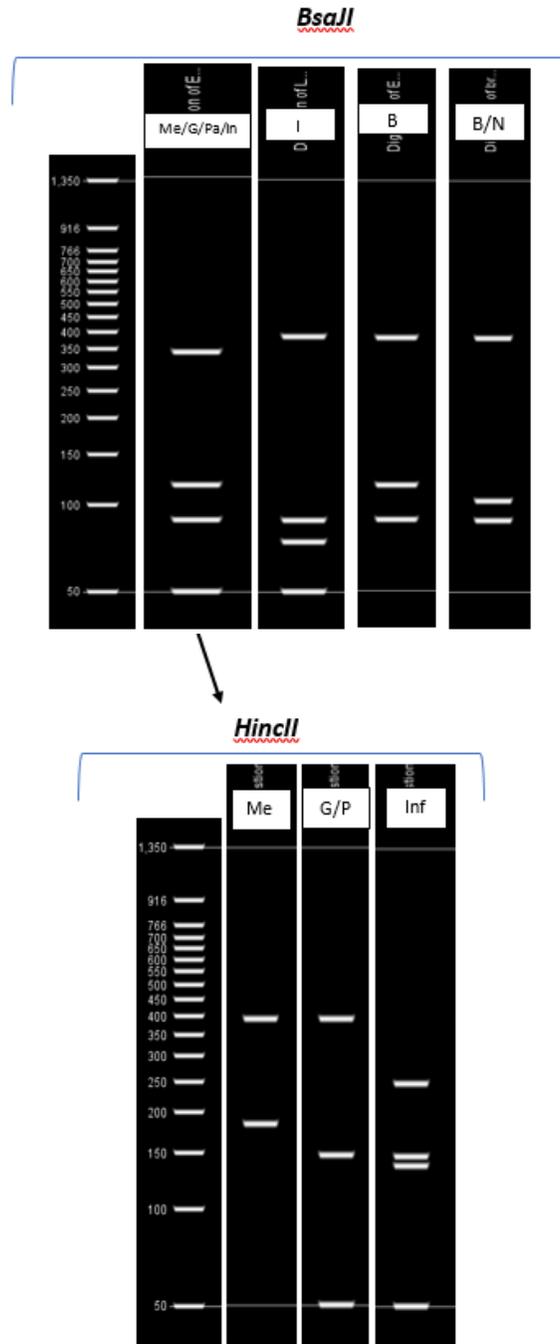
<i>L. lainsoni</i>	CGGCGTGCCGCGAGATCGAGGTGACGTTTCGACCTGGACGCGAACGGCATCCTGAACGTGTC	969
<i>L. naiffi</i>	CGGCGTGCCGCGAGATCGAGGTGACGTTTCGACCTGGACGCGAACGGCATCCTGAACGTGTC	1020
<i>L. braziliensis</i>	CGGCGTGCCGCGAGATCGAGGTGACGTTTCGACCTGGACGCGAACGGCATCCTGAACGTGTC	1020
<i>L. braziliensis</i>	CGGCGTGCCGCGAGATCGAGGTGACGTTTCGACCTGGACGCGAACGGCATCCTGAACGTGTC	1020
<i>L. guyanensis</i>	CGGCGTGCCGCGAGATCGAGGTGACGTTTCGACCTGGACGCGAACGGCATCCTGAACGTGTC	1020
<i>L. panamensis</i>	CGGCGTGCCGCGAGATCGAGGTGACGTTTCGACCTGGACGCGAACGGCATCCTGAACGTGTC	1020
<i>L. amazonensis</i>	CGGCGTGCCGCGAGATCGAGGTGACGTTTCGACCTGGACGCGAACGGCATCCTGAACGTGTC	1020
<i>L. mexicana</i>	CGGCGTGCCGCGAGATCGAGGTGACGTTTCGACCTGGACGCGAACGGCATCCTGAACGTGTC	1020
<i>L. major</i>	CGGCGTACC GCGAGATCGAGGTGACGTTTCGACCTGGACGCGAACGGCATCCTGAACGTGTC	977
<i>L. infantum</i>	CGGTGTGCCGCGAGATCGAGGTGACGTTTCGACCTGGACGCGAACGGCATCCTGAACGTGTC	1020
<i>L. infantum</i>	CGGTGTGCCGCGAGATCGAGGTGACGTTTCGACCTGGACGCGAACGGCATCCTGAACGTGTC	977

Sitio de restricción *Bsa*II

<i>L. lainsoni</i>	CGCGGAGGAGAAAGGGACCGGCAAGCGCAACCATATCACCATCACCAACGACAAGGGCCG	1029
<i>L. naiffi</i>	CGCGGAGGAGAAAGGGACCGGCAAGCGCAATCATATCACCATCACCAACGACAAGGGCCG	1080
<i>L. braziliensis</i>	CGCGGAGGAGAAAGGGAAACCGGCAAGCGCAACCATATCACCATCACCAACGACAAGGGCCG	1080
<i>L. braziliensis</i>	CGCGGAGGAGAAAGGGACCGGCAAGCGCAACCATATCACCATCACCAACGACAAGGGCCG	1080
<i>L. guyanensis</i>	CGCGGAGGAGAAAGGGACCGGCAAGCGCAACCATATCACCATCACCAACGACAAGGGCCG	1080
<i>L. panamensis</i>	CGCGGAGGAGAAAGGGACCGGCAAGCGCAACCATATCACTATCACCAACGACAAGGGCCG	1080
<i>L. amazonensis</i>	CGCGGAGGAGAAAGGGACCGGCAAGCGCAACGAGATCACCATCACTAACGACAAGGGCCG	1080
<i>L. mexicana</i>	CGCGGAGGAGAAAGGGACCGGCAAGCGCAACGAGATCACCATCACCAACGACAAGGGCCG	1080
<i>L. major</i>	CGCGGAGGAGAAAGGGACCGGCAAGCGCAACGAGATCACCATCACCAACGACAAGGGCCG	1037
<i>L. infantum</i>	CGCGGAGGAGAAAGGGACCGGCAAGCGCAACGAGATCACCATCACCAACGACAAGGGCCG	1080
<i>L. infantum</i>	CGCGGAGGAGAAAGGGACCGGCAAGCGCAACGAGATCACCATCACCAACGACAAGGGCCG	1037

<i>L. lainsoni</i>	ACTGAGCAAGGACGAGATCGAGCGCATGGTGAACGATGCGTGAAGTACGAGCAGGCCGA	1089
<i>L. naiffi</i>	ACTGAGCAAGGACGAGATCGAGCGCATGGTGAACGATGCGTGAAGTACGAGCAGGCCGA	1140
<i>L. braziliensis</i>	ACTGAGCAAGGACGAGATCGAGCGCATGGTGAACGATGCGTGAAGTACGAGCAGGCCGA	1140
<i>L. braziliensis</i>	ACTGAGCAAGGACGAGATCGAGCGCATGGTGAACGATGCGTGAAGTACGAGCAGGCCGA	1140
<i>L. guyanensis</i>	ACTGAGCAAGGACGAGATCGAGCGCATGGTGAACGATGCGTGAAGTACGAGCAGGCCGA	1140
<i>L. panamensis</i>	ACTGAGCAAGGACGAGATCGAGCGCATGGTGAACGATGCGTGAAGTACGAGCAGGCCGA	1140
<i>L. amazonensis</i>	GCTGAGCAAGGACGAGATCGAGCGCATGGTGAACGACGCAATGAAGTACGAGGCGGACGA	1140
<i>L. mexicana</i>	GCTGAGCAAGGACGAGATCGAGCGCATGGTGAACGACGCAATGAAGTACGAGGCGGACGA	1140
<i>L. major</i>	GCTGAGCAAGGACGAGATCGAGCGCATGGTGAACGACGCGATGAAGTACGAGGCGGACGA	1097
<i>L. infantum</i>	GCTGAGCAAGGACGAGATCGAGCGCATGGTGAACGACGCGATGAAGTACGAGGCGGACGA	1140
<i>L. infantum</i>	GCTGAGCAAGGACGAGATCGAGCGCATGGTGAACGACGCGATGAAGTACGAGGCGGACGA	1097

Figura 21: Algoritmo de restricción propuesto para el fragmento N del marcador *hsp70*.



Inf: *Leishmania infantum*, Me: *Leishmania mexicana*, B: *Leishmania braziliensis*, N: *Leishmania naiffi*, G: *Leishmania guyanensis*, Pa: *Leishmania panamensis* y L: *Leishmania lainsoni*

### C. Extracción de ADN

Se obtuvo amplificación del marcador *hsp70* para el 64% de las muestras (122/191). Con el control de la extracción de ADN por medio de la amplificación del gen de  $\beta$ -globina humana se obtuvo una amplificación del 32% (62/191).

### D. PCR anidado

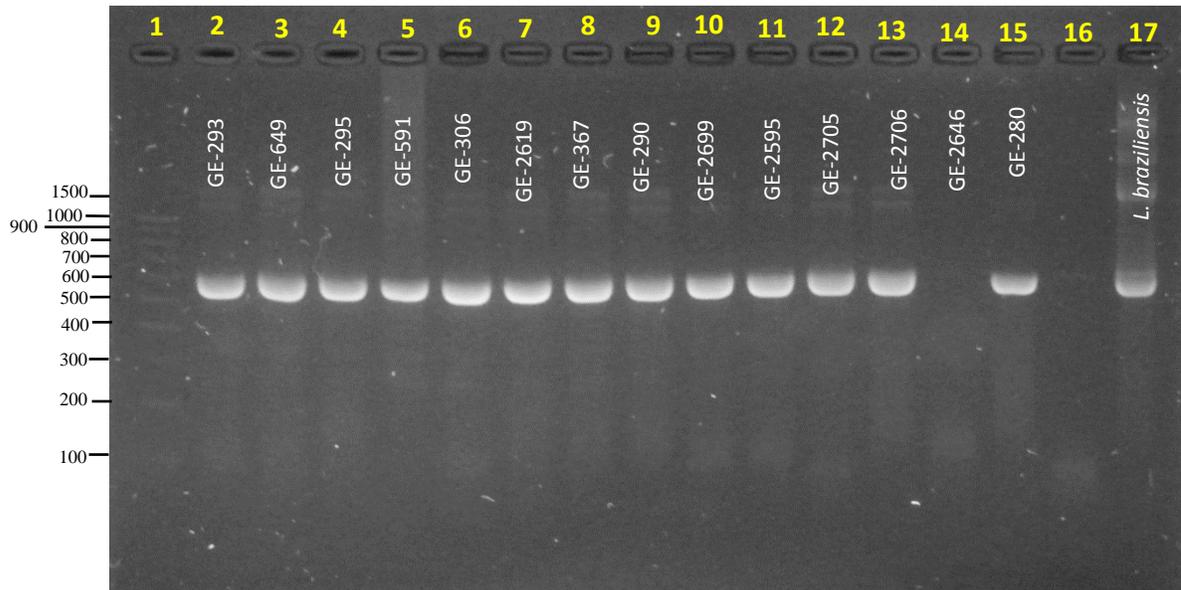
Se realizó la amplificación del fragmento externo (1422 bp) del gen *hsp70*, seguido del fragmento interno (593 bp). Para las 122 muestras que amplificaron se obtuvo un producto del tamaño esperado de 593 bp. Se observó que las muestras para las que no se obtuvo un producto de amplificación visible corresponden a las décadas de 1990-1999 y 2000-2009, las mismas décadas que poseen la mayor cantidad de muestras. La prueba de chi cuadrado (valor  $p = 1.92E-14$ ) evidenció el sesgo existente hacia las décadas antes mencionadas y al departamento de Petén (por tener la mayor cantidad de muestras). Este sesgo se mantuvo después de realizar la amplificación del material genético de las muestras como se puede observar en el Cuadro 5 y también fue corroborado por medio de un chi-cuadrado (valor  $p = 3.19E-10$ ). Además, las muestras también tienen un sesgo en cuanto al sexo de los pacientes, ya que predominantemente fueron tomadas a pacientes de sexo masculino (91%). De igual forma, sí existe una diferencia significativa entre las proporciones de cada década, lo cual se analizó mediante una prueba de Fisher (valor  $p = 1.1E-6$ ). Por último, se comprobó que también existe diferencia significativa entre la amplificación y el tiempo de evolución de la lesión, lo cual se demostró con una prueba de Fisher (valor  $p = 4.4E-3$ ).

Cuadro 5: Distribución en departamento y en década de las muestras con un resultado positivo por PCR.

Departamento	Décadas				Total por departamento
	1980-1989	1990-1999	2000-2009	2010-2017	
<b>Alta Verapaz</b>	4	5	1	15	25
<b>Baja Verapaz</b>	2	4	1	0	7
<b>Petén</b>	7	37	34	0	78
<b>Izabal</b>	2	3	4	1	10
<b>Quiché</b>	0	1	0	1	2
<b>Total por década</b>	15	50	40	17	122

Con estas condiciones se obtuvo bandas definidas e íntegras, que se separaron en geles de agarosa al 1.5%, como se muestra en la Figura 22.

Figura 22: Productos del PCR anidado para el fragmento N del gen *hsp70* (593 bp), separados en un gel de agarosa al 1.5% (p/v).



E: Escalera de masa molecular de 100 bp, pozos 2-15: muestras analizadas, (16) C-: Control de reactivos y (17) C+: Control positivo de *Leishmania braziliensis*.

## E. RFLP

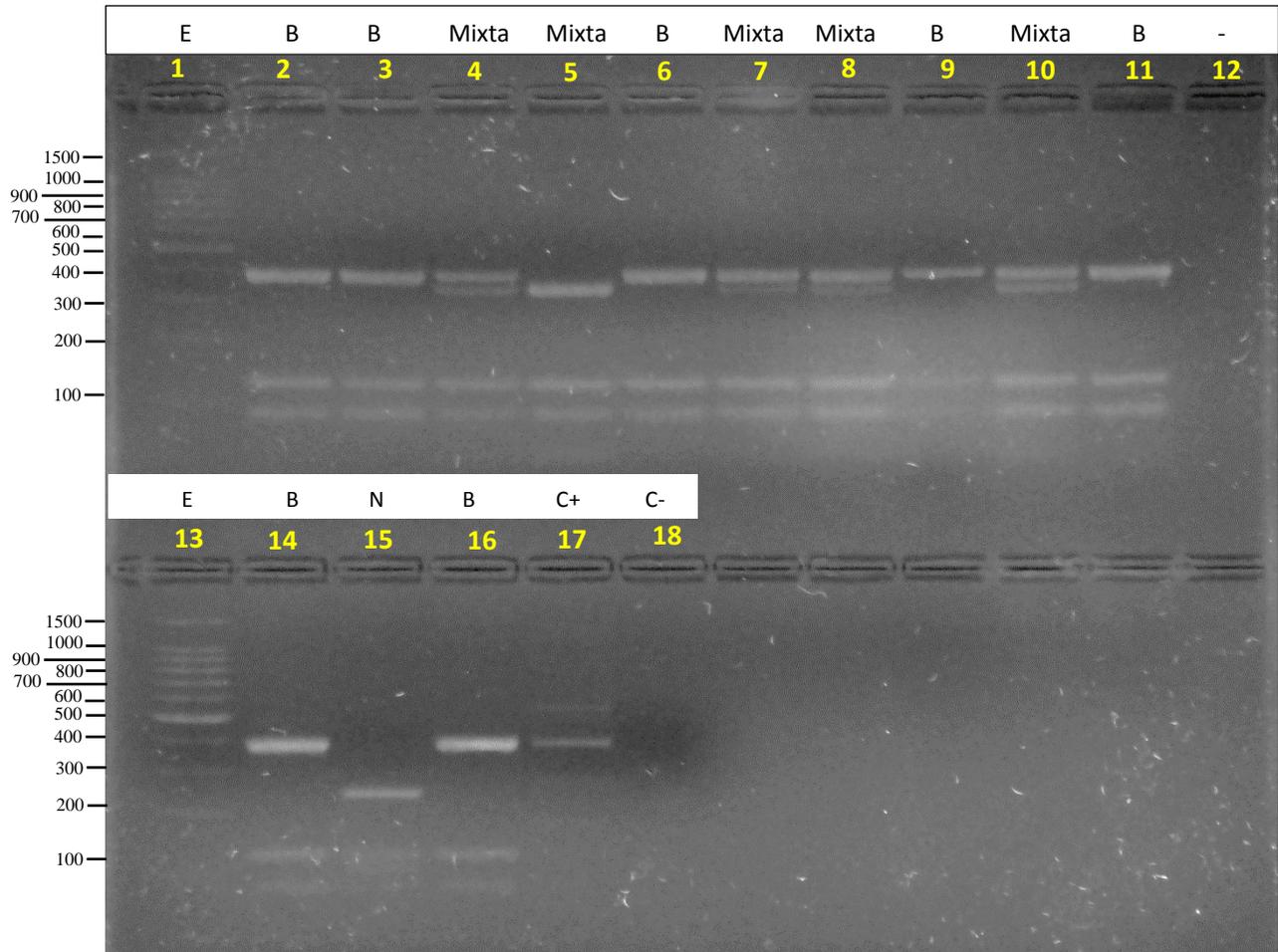
Se realizaron digestiones de los productos de PCR con las enzimas de restricción específicas y se obtuvo producto de restricción de un 98% (120/122) de las muestras analizadas. Se identificaron seis diferentes patrones de restricción, utilizando las enzimas *Bsa*II y *Rsa*I, que corresponden a los reportados previamente para *Leishmania braziliensis*, y se sospecha de la presencia de *Leishmania peruviana* (esta muestra no fue enviada a secuenciar). No se analizaron los resultados de las digestiones con las enzimas *Hae*III y *Hinc*II, ya que estas no tenían la capacidad para diferenciar las muestras que *Bsa*II y *Rsa*I sí.

Sin embargo, los otros patrones no han sido descritos previamente y según los resultados de secuenciación, pertenecen a *Leishmania guyanensis*, y *Leishmania panamensis*, además de un patrón que según el análisis de similitud pertenece a *L. braziliensis*/*L. naiffi*.

De acuerdo con el análisis de restricción se determinó que la especie de parásito más frecuente entre las muestras analizadas fue *L. braziliensis* (B) en un 86.7% (104/120 muestras) (patrones de Figura 23: pozos 2, 3, 6, 9, 11, 14 y 16; Figura 24: pozos 3-6 y 8-12). Además, se obtuvo un 3.33% (4/120 muestras) con un

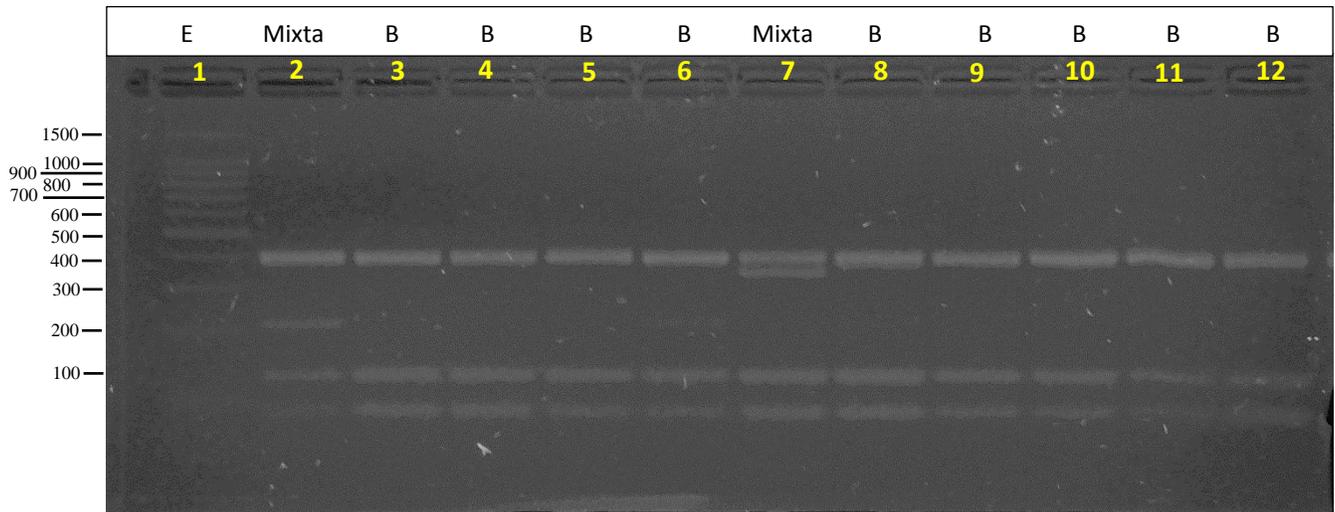
patrón que se reportó como *L. guyanensis*/*L. panamensis*, (G/Pa), dado que la secuencia del fragmento N del marcador *hsp70* no contiene suficiente información para diferenciar estas especies (Figura 23 pozo 5), un 8.33% (10/120 muestras) con un patrón que sugiere la presencia de una infección mixta (Figura 23, pozos 4, 7, 8, 10 y Figura 24, pozos 2 y 7) y dos muestras con un patrón no reportado (N) (Figura 23 pozo 15).

Figura 23: Patrones de restricción del fragmento N del gen *hsp70* (593 bp), generados por el corte con la enzima *Bsa*II y separados en un gel de agarosa al 3.0% (p/v).



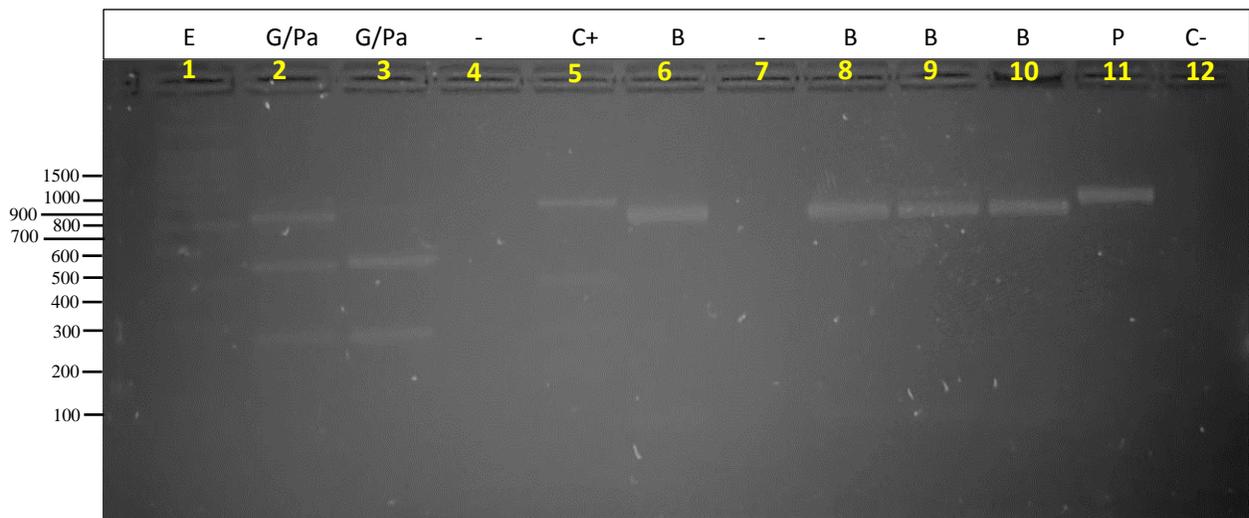
(Pozo 1) E: Escalera de masa molecular de 100 bp, pozos 2-12, muestras (2) GA-1172, (3) GE-979, (4) GE-2591, (5) GE-078, (6) GA-1167, (7) GE-1101, (8) GE-2368, (9) GE-2564, (10) GE-216, (11) GE-2553, (12) pozo sin muestra y pozos 13-18, (13) E: Escalera de masa molecular de 100 bp, muestras (14) GE-1083, (15) GE-1120 y (16) GE-1013, (17) C+: Control positivo de *Leishmania braziliensis* y (18) C-: Control de reactivos.

Figura 24: Patrones de restricción del fragmento N del gen *hsp70* (593 bp), generados por el corte con la enzima *Bsa*II y separados en un gel de agarosa al 3.0% (p/v), mostrando la presencia potencial de infecciones mixtas.



1: Escalera de masa molecular de 100 bp, pozos 2-12 del gel, muestras (2) GE-1088, (3) GE-2727, (4) GE-2438, (5) GA-1008, (6) GA-2631, (7) GE-222, (8) GE-287, (9) GE-396, (10) GE-2323, (11) GA-840 y (12) GE-776.

Figura 25: Patrones de restricción del fragmento N (593 bp) del gen *hsp70* generados por el corte con la enzima *Hae*III-*Rsa*I y separados en un gel de agarosa al 3.0 % (p/v), mostrando la presencia potencial de *L. peruviana*



(Pozo 1) E: Escalera de masa molecular de 100 bp, pozos 2-5 del gel, muestras digeridas con *Hae*III (2) GE-1683, (3) GE-360, (4) GE-271, (5) Control positivo *L. braziliensis*, pozos 6-12, muestras digeridas con *Rsa*I (6) GE-360, (7) GE-1683, (8) GE-2727, (9) GE-2438, (10) GA-1008, (11) GE-2631 y (12) Control de reactivos.

## F. Validación de resultados de RFLP por secuenciación y análisis de homología (BLASTn)

Se enviaron a secuenciar 37/122 (30%) de las 122 muestras para de las que se obtuvo producto de amplificación. Se obtuvo secuencias satisfactorias (>515 bp, 87% de residuos esperados) para un 89% de estas muestras, tanto para las hebras sentido como antisentido. Se obtuvo las secuencias consenso con un tamaño promedio de 555 bp, utilizando el software MEGA7 (Anexo 10) y se realizó el alineamiento de estas secuencias con la herramienta Clustal Omega, donde se pudo visualizar que las secuencias tienen varios polimorfismos de un solo nucleótido (SNP, por sus siglas en inglés). Para cuatro muestras (GE-1120, GE-2619, GE-2699 y GE-1088) no se obtuvo secuencias de calidad satisfactoria, por lo que no se utilizaron para el análisis. Dado que no fue posible obtener una cantidad adecuada de producto amplificación del fragmento G (1422 bp) del gen *hsp70* no fue posible secuenciar este fragmento.

Los resultados para el análisis de similitud, utilizando BLASTn (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), indican que aproximadamente el 85% (28/33) de las muestras secuenciadas corresponden a la especie *L. braziliensis* (Cuadro 6). De igual forma, el análisis sugirió que las muestras GE-118, GE-591, GE-271, GE-095 y GE-222 pertenecen a *L. panamensis* o *L. guyanensis*. Se seleccionó el 79% (26/33) de las secuencias que tuvieran la mejor calidad y mayor tamaño para subirlas a la base de datos GenBank (los números de accesión aparecen junto a cada secuencia en el anexo 10).

Cuadro 6: Resultados de la secuenciación y análisis de similitud mediante el gen *hsp70* de las muestras de leishmaniasis seleccionadas.

Número de muestra	Código	Identidad según BLASTn	Tamaño de la secuencia consenso (bp)	Porcentaje de identidad
1	GA-1172	<i>L. braziliensis/L. naiffi</i>	565	95%
2	GE-078	<i>L. braziliensis/L. naiffi</i>	567	99%
3	GE-216	<i>L. braziliensis/L. naiffi</i>	571	98%
4	GE-189	<i>L. braziliensis/L. naiffi</i>	570	99%
5	GA-1166	<i>L. braziliensis/L. naiffi</i>	565	99%
6	GE-100	<i>L. braziliensis/L. naiffi</i>	570	99%
7	GE-118	<i>L. panamensis/L. guyanensis</i>	571	99%
8	GE-162	<i>L. braziliensis/L. naiffi</i>	570	99%
9	GA-1174	<i>L. braziliensis/L. naiffi</i>	573	99%
10	GE-422	<i>L. braziliensis/L. naiffi</i>	563	99%
11	GA-973	<i>L. braziliensis/L. naiffi</i>	570	99%

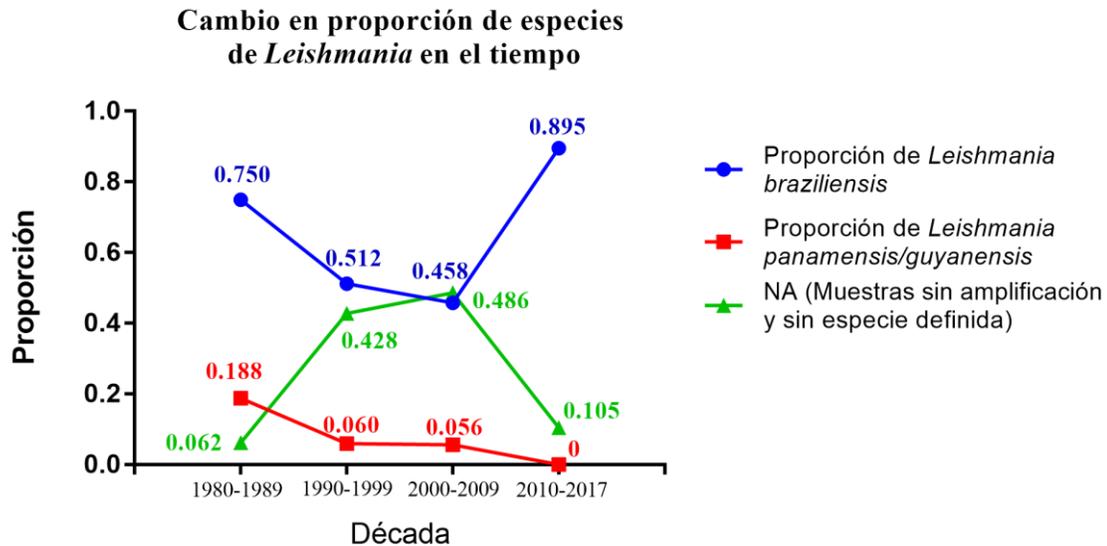
Número de muestra	Código	Identidad según BLASTn	Tamaño de la secuencia consenso (bp)	Porcentaje de identidad
12	GE-293	<i>L. braziliensis/L. naiiffi</i>	572	99%
13	GE-649	<i>L. braziliensis/L. naiiffi</i>	564	99%
14	GE-295	<i>L. braziliensis/L. naiiffi</i>	566	99%
15	GE-591	<i>L. panamensis/L. guyanensis</i>	574	96%
16	GE-306	<i>L. braziliensis/L. naiiffi</i>	567	99%
17	GE-367	<i>L. braziliensis/L. naiiffi</i>	567	99%
18	GE-290	<i>L. braziliensis/L. naiiffi</i>	573	99%
19	GE-2595	<i>L. braziliensis/L. naiiffi</i>	580	98%
20	GE-2705	<i>L. braziliensis/L. naiiffi</i>	570	99%
21	GE-2706	<i>L. braziliensis/L. naiiffi</i>	574	99%
22	GE-280	<i>L. braziliensis/L. naiiffi</i>	540	99%
23	GE-258	<i>L. braziliensis/L. naiiffi</i>	565	99%
24	GE-2732	<i>L. braziliensis/L. naiiffi</i>	571	99%
25	GE-1273	<i>L. braziliensis/L. naiiffi</i>	568	99%
26	GE-2708	<i>L. braziliensis/L. naiiffi</i>	569	99%
27	GE-2543	<i>L. braziliensis/L. naiiffi</i>	535	99%
28	GE-454	<i>L. braziliensis/L. naiiffi</i>	559	99%
29	GE-2447	<i>L. braziliensis/L. naiiffi</i>	568	99%
30	GE-2602	<i>L. naiiffi</i>	570	97%
31	GE-271	<i>L. panamensis/L. guyanensis</i>	571	96%
32	GE-095	<i>L. panamensis/L. guyanensis</i>	578	98%
33	GE-222	<i>L. panamensis/L. guyanensis</i>	569	99%

## G. Elaboración de una serie de tiempo para proporción de especies de *Leishmania sp.*

Se generaron dos series de tiempo con base en los resultados del análisis RFLP para las especies más frecuentes para las que se obtuvo un patrón de restricción. La mayor proporción global y por década se observó en *Leishmania braziliensis* y como se puede ver en la Figura 18, a pesar de disminuir proporcionalmente un 39% en el período 1990-2009, aumentó un 95% en el último período (2010-2017).

Por su parte, para las especies con patrones correspondientes a *L. panamensis/L. guyanensis*, se determinó que potencialmente ha estado presente en Guatemala desde la década de los 80's y ha ido disminuyendo su prevalencia hasta no tener casos detectados para el último período (2010-2017) en el grupo de muestras analizado.

Figura 26: Serie de tiempo para las proporciones de las especies del género *Leishmania* más frecuentes entre las muestras analizadas.



## H. Desarrollo de una regresión logística multinomial

Los resultados obtenidos por el análisis con el complemento XLSTAT mostraron un modelo con una calidad pobre y sin capacidad para predecir la especie del parásito en base al tiempo de evolución y el área de las lesiones. Los indicadores que se muestran en Figura 27 son equivalentes a la determinación de un  $R^2$  y a un análisis de varianza de una regresión lineal. El valor de mayor interés es el valor de la prueba de Chi-cuadrado en la tasa logarítmica (*log ratio*). Esta prueba evalúa si la información de las variables es significativa para que el modelo pueda explicar el valor de la variable dependiente (en este caso, la especie del parásito). Debido a que el valor es considerablemente mayor a 0.0001 (0.025), se determinó que al menos una de las variables incluidas en el modelo no aporta información significativa para que el modelo tenga capacidad de predecir la especie de parásito en base al área y evolución de las lesiones.

Por su parte, el parámetro  $-2\log$  mide qué tan bien se ajusta el modelo a los datos (entre menor sea el valor, mejor es el ajuste). Para el estudio se obtuvo 108.624 lo que indica que el modelo no se ajusta tan bien a los valores de las variables consideradas. Además, los coeficientes de determinaciones de Cox and Shell y Nagelkerke indicaron que un poco más del 1% (1.17-1.77%) de la variación experimentada por la variable dependiente (especie del parásito) es explicada por las variables independientes incluidas en el modelo (tiempo de evolución y área de la lesión).

Figura 27: Indicadores de calidad del modelo de regresión logística multinomial generado.

Variables	Evol (Meses)	Área (cm2)	
Evol (Meses)	<b>1.000</b>	-0.029	
Área (cm2)	-0.029	<b>1.000</b>	
<b>Regresión de la variable Especie:</b>			
Estadísticos de bondad del ajuste (Variable Especie):			
Estadístico	Independiente	Completo	
Observaciones	120	120	
Suma de los pesos	120.000	120.000	
GL	119	111	
-2 Log(Verosimilitud)	123.050	108.624	
R <sup>2</sup> (McFadden)	0.000	0.117	
R <sup>2</sup> (Cox and Snell)	0.000	0.113	
R <sup>2</sup> (Nagelkerke)	0.000	0.177	
AIC	129.050	126.624	
SBC	137.413	151.712	
Iteraciones	0	16	
<b>Prueba de la hipótesis nula H0: Y=0.017 (Variable Especie):</b>			
Estadístico	GL	Chi-cuadrado	Pr > Chi <sup>2</sup>
-2 Log(Verosimilitud)	6	14.426	0.025
Score	6	44.623	< 0.0001
Wald	6	5.879	0.437

Existen errores estándar altos asociados a los coeficientes de los modelos generados con los datos (en la mayoría de los casos mayores a los valores de los coeficientes, a excepción de los valores de los interceptos), como se puede observar en la primera parte de la Figura 28, donde por ejemplo el intercepto de la categoría *Leishmania panamensis/L. guyanensis* tiene un valor de -1.660 y un error asociado de 1.013, lo cual indica más de un 50% de variación para ese parámetro.

Otro aspecto importante es que, según los parámetros generados, no existe congruencia en cuanto a que cualquiera de las variables evaluadas (área y tiempo de evolución de las lesiones) tenga mayor influencia en la especie del parásito. Esto se puede observar en la columna del Chi-cuadrado de Wald, donde se observa que la variable más importante para predecir la presencia de una infección mixta o una infección causada por *L. guyanensis/L. panamensis*, es el área de la lesión.

Los problemas para explicar la variación en la variable dependiente (especie del parásito) y la baja calidad del modelo se evidenciaron cuando éste es empleado para determinar la especie responsable de una infección, en función de las variables elegidas. Como se observa en la tabla de clasificación para muestra (segunda parte de la Figura 28), el modelo básicamente asignó todas las infecciones a la especie *Leishmania braziliensis*, para la que se reporta un porcentaje de acierto del 100%, mientras para el resto de las especies demostró ser poco robusto, debido a que no pudo predecir ninguna de las muestras que se sospecha corresponden a infecciones mixtas o *L. panamensis/L. guyanensis* y obtuvo 50% de acierto para la categoría Indefinido (corresponde al patrón que no ha sido reportado y para el que no se obtuvo una buena calidad en la secuenciación) que únicamente posee dos datos.

Figura 28: Parámetros del modelo generado y sus predicciones sobre la identidad de la especie de *Leishmania* responsable de una infección.

Parámetros del modelo (Variable Especie):							
Categoría	Fuente	Valor	Error estándar	Chi-cuadrado de Wald	Pr > Chi <sup>2</sup>	Wald Límite inf. (95%)	Wald Límite sup. (95%)
Indeterminada	Intercepción	-3.493	1.396	6.260	0.012	-6.229	-0.757
	Evol (Meses)	0.015	0.011	1.856	0.173	-0.007	0.037
	Área (cm2)	-0.318	0.363	0.768	0.381	-1.030	0.394
Infección mixta	Intercepción	-2.554	0.511	25.023	< 0.0001	-3.555	-1.554
	Evol (Meses)	-0.030	0.083	0.133	0.715	-0.192	0.132
	Área (cm2)	0.040	0.031	1.672	0.196	-0.020	0.099
<i>L. panamensis/L. guyanensis</i>	Intercepción	-1.660	1.013	2.688	0.101	-3.645	0.324
	Evol (Meses)	-0.248	0.324	0.585	0.444	-0.883	0.387
	Área (cm2)	-0.209	0.188	1.236	0.266	-0.578	0.160

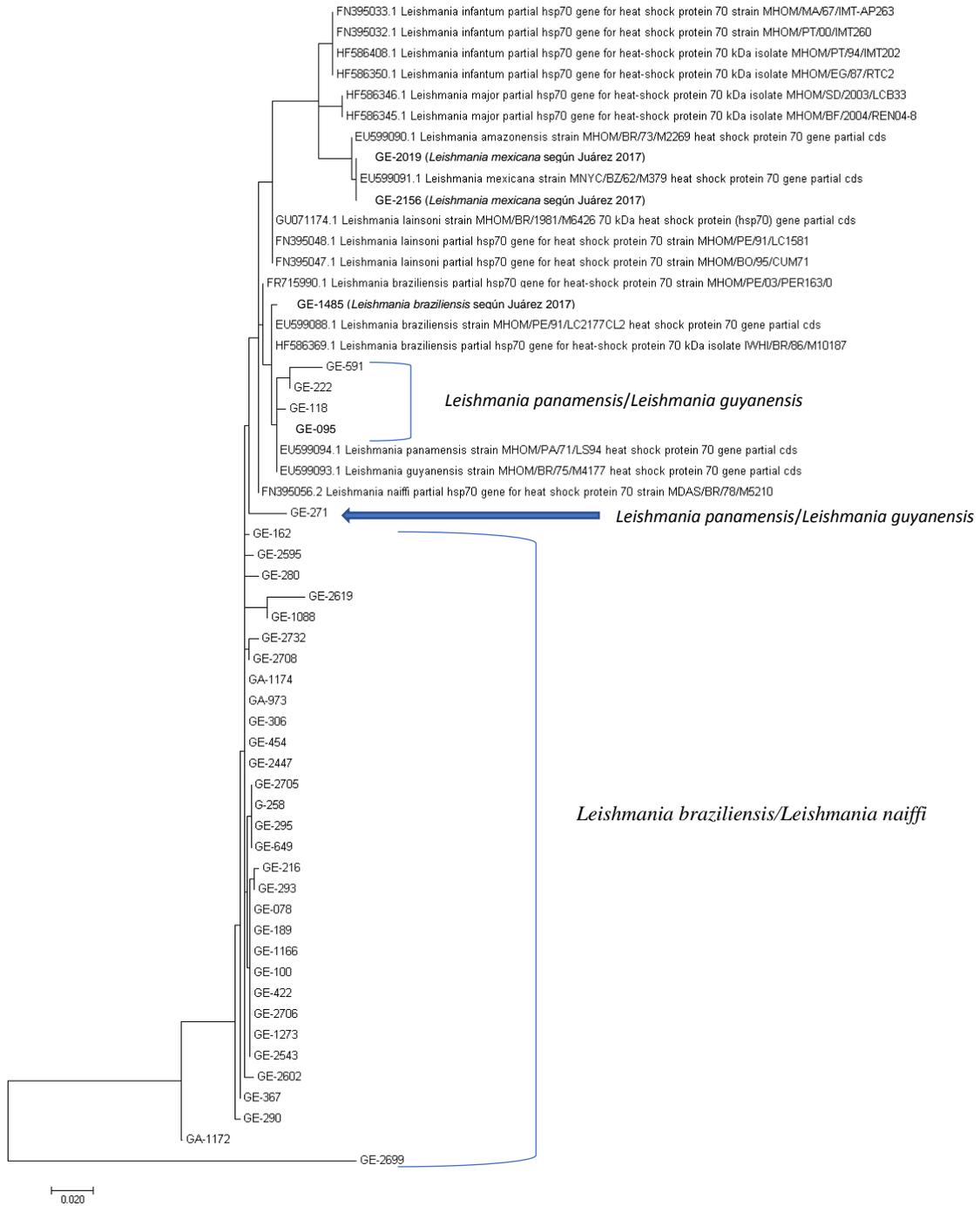
Tabla de clasificación para la muestra de aprendizaje (Variable Especie):						
Especie	B	I	Mixta	P	Total	% correcto
<i>L. braziliensis</i>	104	0	0	0	104	100.00%
Indeterminada	1	1	0	0	2	50.00%
Infección Mixta	10	0	0	0	10	0.00%
<i>L. panamensis/L. guyanensis</i>	4	0	0	0	4	0.00%
<b>Total</b>	<b>119</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>120</b>	<b>37.50%</b>

## I. Construcción de árbol filogenético

Los resultados obtenidos con el árbol concuerdan con el análisis de homología realizado con BLASTn. Se obtuvieron patrones que demuestra la presencia de infecciones mixtas, como se puede observar en la Figura 23, pozos 4, 7, 8, 10 y Figura 24, pozos 2 y 7. La muestra identificada por BLASTn, como *Leishmania naiffi*, no se incluyó en los resultados finales (Cuadro 6) debido a la baja calidad de la secuencia. Tampoco se pudo determinar la presencia de *L. mexicana* en las muestras analizadas. Sin embargo, se necesita de la secuencia del fragmento de 1422 bp para confirmar definitivamente la ausencia de esta especie e igualmente, definir la especie del parásito de las muestras que no amplificaron. En el caso de *L. braziliensis*, se

identificaron 31 muestras, aunque es necesario realizar un corte adicional con enzimas de restricción para evaluar si es posible separar entre estas especies como sucedió entre *L. panamensis* y *L. guyanensis*. Esto debido a que como se puede ver en el árbol (Figura 29), las muestras identificadas como *L. braziliensis*/*L. naiffi* se encuentran divididas en varios grupos, cuya separación podría esclarecerse más si se detectan patrones que de restricción que evidencien la presencia de *L. naiffi* o variantes genéticas de *L. braziliensis*.

Figura 29: Árbol filogenético construido con las secuencias de las muestras analizadas, por medio del método estadístico Maximum likelihood.



## VII. DISCUSIÓN

Con este estudio se optimizó un método combinado de PCR anidado - RFLP para la identificación de la especie de *Leishmania* responsable de infecciones de leishmaniosis cutánea en Guatemala. Con la metodología estandarizada se obtuvo el 64% (122/191 muestras) de amplificación de un fragmento de 593 bp del gen *hsp70*, para muestras de extendidos de material de las lesiones de pacientes con leishmaniosis cutánea, teñidos con Giemsa. Se obtuvieron patrones de restricción para el 98% (120/122) de las muestras con la enzima de restricción *BsaI*. Los patrones, de acuerdo con los reportados en estudios anteriores, indicaron la presencia de *Leishmania braziliensis*, aunque también se obtuvieron tres patrones de restricción no reportados previamente. La validación del 30% de las muestras analizadas con RFLP mediante secuenciación permitió identificar que dos de los patrones no reportados podrían corresponder a *Leishmania panamensis* y *Leishmania guyanensis*, además de un patrón que indicaría la presencia de una variante de *L. braziliensis* o *Leishmania naiffi*. Se obtuvieron patrones de restricción que sugieren la presencia de una infección mixta, ya que la suma de los fragmentos generados excede al tamaño original del fragmento (593 bp). Además, una de las 6 muestras que fueron digeridas posteriormente con la enzima *RsaI*, mostró un patrón que corresponde según estudios anteriores a *Leishmania peruviana*, (3 mostraron el patrón correspondiente a *L. braziliensis* y para los 2 restantes, no se obtuvo patrón de restricción) por lo que se sospecha de la presencia de esta especie entre las muestras analizadas.

Se realizó una serie de tiempo para visualizar los cambios entre la proporción de especies en lugar de una prueba para determinar si hay diferencias entre las décadas muestreadas. Esto se hizo de esta forma debido a que se observó un sesgo en la cantidad de muestras obtenidas para las décadas 1990-1999 y 2000-2009 y provenientes de Petén (tienen la mayor cantidad de muestras), por lo cual una prueba estadística no tendría la robustez necesaria para proveer de resultados confiables. Los resultados obtenidos a partir del análisis de las 120 muestras amplificadas demuestran que la proporción entre las especies del género *Leishmania* ha cambiado a lo largo del período muestreado. Como se puede observar en la Figura 24, la proporción de *Leishmania braziliensis* ha variado desde ser responsable del 75% de las infecciones en la década de 1980, hasta ser la causante del 89.5% en el período 2010-2017. Además, ninguna muestra fue corroborada como *Leishmania mexicana* por medio de RFLP y secuenciación, por lo que no se puede determinar si hubo un cambio en el tiempo para la proporción de esta especie, aunque también es posible que las muestras que no amplificaron sean *L. mexicana*, lo cual coincidiría con la proporción de esta especie anteriormente registrada. Por otra parte, los patrones de restricción no reportados, que según los resultados de secuenciación pertenecen a *Leishmania panamensis/Leishmania guyanensis*, mostraron una disminución en su proporción hasta desaparecer en la última década. Por lo tanto, las proporciones obtenidas difieren de los valores esperados, establecidos por Herwaldt y colaboradores en 1992. De esta cuenta, se rechaza la primera hipótesis nula de este estudio, ya que se comprobó que las proporciones entre especies de *Leishmania*

han variado a lo largo del período muestreado. Además, los resultados sugieren la presencia de *Leishmania panamensis* en Guatemala, la cual no ha sido confirmada en el país; el único registro de la presencia de esta especie corresponde a un análisis de electroforesis de isoenzimas realizado por Navin y colaboradores en 1988, el cual no pudo ser confirmado. Sin embargo, esto se podrá confirmar hasta secuenciar el fragmento de 1422 bp que tiene una mayor resolución y podría diferenciar entre *L. panamensis* y *L. guyanensis*.

De igual forma, se determinó que las muestras analizadas en este estudio se encuentran agrupadas en los mismos clados que las especies a las que corresponden. Es decir, todas las muestras que según los resultados por secuenciación corresponden a *Leishmania braziliensis*, se ubican junto a las secuencias obtenidas de las bases de datos internacionales que están confirmadas para esa misma especie. Se puede observar que el grado de variación genética entre los grupos de especies es bajo (promedio de 0.020 sustituciones por posición). Sin embargo, existen dos muestras que están más relacionadas entre sí que en comparación al resto (GA-1172 y GE-2699), lo cual podría deberse a la existencia de variantes de *Leishmania braziliensis*. Por otra parte, se puede observar que las muestras identificadas como *Leishmania panamensis/Leishmania guyanensis* se encuentran agrupadas con las secuencias del Genbank para estas especies, pero en medio de dos grupos formados por individuos de *Leishmania braziliensis*. Esto podría deberse a que la secuencia codificante de la proteína HSP70 tiene una capacidad menor para distinguir entre los complejos de especies que forman parte del subgénero Viannia (Fraga *et al.*, 2010), debido a que su ubicación geográfica pudo haber permitido un flujo genético mayor por parte del ancestro común. Sin embargo, la resolución del análisis con esta secuencia puede mejorarse adicionando al análisis otro loci como *hsp20* (Fraga *et al.*, 2013). Esto también demuestra que la amplificación del fragmento G del gen *hsp70* (1422 bp) es necesaria para validar los resultados obtenidos por el fragmento N (593 bp), ya que el fragmento G proporciona más información y permitiría confirmar los resultados de las especies que no están reportadas para Guatemala. En este caso, se acepta la hipótesis nula ya que las secuencias de las muestras analizadas están agrupadas en los clados que les corresponden, junto con las secuencias obtenidas en bases de datos internacionales (Genbank).

Por otra parte, también se realizó una regresión logística multinomial para determinar la existencia de una asociación entre la especie del parásito y las características clínicas de la infección. Se incluyeron en el modelo únicamente las variables evolución de la lesión (días) y área de la lesión (cm<sup>2</sup>) debido a que las variables sexo y lugar de origen presentaban sesgos, ya que la mayor parte de los datos provenían de pacientes de sexo masculino del departamento de Petén. Esto debido a que durante mucho tiempo se tomaron muestras en una clínica localizada en la ciudad de Poptún, por lo que existe un sesgo hacia esta región, como se puede observar en el Cuadro 1. Como se puede observar en la sección de resultados, el modelo no fue capaz de predecir correctamente la especie del parásito en base al tiempo de evolución y el área de la lesión. El modelo asignó a 119 de las 120 muestras analizadas como *Leishmania braziliensis*, cuando, de acuerdo con el análisis preliminar, en realidad 15 del total corresponden a otras especies. Esto podría deberse a que la mayoría de

los datos corresponden a una especie (86.7%) y las diferencias entre las manifestaciones clínicas de éstas son tan sutiles que el modelo no puede detectarlas. Se necesita de una muestra considerablemente mayor para poder predecir la especie causante de la enfermedad en base a estas variables. Por lo tanto, no es posible determinar si existe una asociación entre la especie del parásito causante de la infección y las manifestaciones clínicas evaluadas. De igual forma, tampoco se puede tomar una decisión en cuanto a rechazar la hipótesis nula, debido a que es necesario realizar más pruebas con una muestra mayor, como en el caso del estudio realizado en 1992 por Herwaldt y colaboradores, donde utilizaron una muestra de 324 personas y sí detectaron que las lesiones generadas por *Leishmania braziliensis* tuvieron un área total mayor.

Entre las limitaciones que se presentaron en el estudio está que las muestras provenían mayoritariamente del departamento de Petén y fueron recolectadas en las décadas de 1990-1999 y 2000-2009, con lo cual hay un sesgo en el sitio de origen de la infección (las diferencias se muestran en el Cuadro 1 y fueron comprobadas por una prueba chi-cuadrado). También se comprobó que existe una diferencia significativa entre la amplificación, la década en que se colectó la muestra y el tiempo de evolución de la lesión. Esto indica que conforme el tiempo pasa el nivel de la parasitemia puede disminuir y puede ser más difícil detectar a los parásitos (comprobado por medio de dos pruebas de Fisher, con valores p de  $1.1E-6$  para la proporción de muestras amplificadas por cada década y un valor de  $4.4E-3$  para la relación entre el tiempo de evolución de la lesión y la amplificación de la muestra). Además, otro sesgo presente en las muestras fue que la mayoría fue tomada a pacientes de sexo masculino (91%), esto debido a que éstos están más expuestos a ser mordidos por el vector cuando salen a trabajar o a realizar actividades en sitios de reposo del mismo, mientras las mujeres tienden a quedarse más en los hogares y desempeñar labores domésticas (Morales, 2008). De igual forma, cuando se seleccionaron las muestras, se tomaron láminas únicamente de las muestras que cumplieron con los criterios de inclusión ya establecidos (resultado parasitológico positivo por microscopía, información de sexo, edad, sitio de procedencia, año de colecta, área de lesiones, evolución de la lesión y además, que se tuviera al menos 4 láminas del mismo paciente), lo cual redujo las muestras disponibles para el análisis. Es probable que la aplicación de estos criterios de inclusión inevitablemente introdujera aún más sesgo en los datos y por este motivo también se podría explicar la ausencia del diagnóstico de *L. mexicana* en las muestras, ya que como se ha reportado, es una especie considerablemente menos abundante en comparación con *L. braziliensis* (un 30% de la primera, contra un 70% para *L. braziliensis*) al menos para Guatemala. En contraste con nuestro país, en México la especie causante de Leishmaniosis cutánea mayoritaria era *L. mexicana* y fue hasta 1987 en un estudio desarrollo por Velasco-Castrejón (1989), que se detectaron los primeros casos de *L. braziliensis*. Por último, se calculó el tamaño de muestra de acuerdo con los recursos financieros disponibles. Uno de los parámetros que se modificó para el cálculo del tamaño de muestra fue el error de estimación, que se fijó en un 10%. Con este error de estimación, se asume que el tamaño de muestra seleccionada se encontrará en un intervalo donde la variación máxima permitida será del 10%.

Como ya se mencionó anteriormente, se obtuvieron varios resultados no esperados entre los que resaltan la identificación de patrones de restricción generados por cortes con la enzima *Bsa*II que no están reportados en estudios previos y que por resultados de secuenciación podrían corresponder a *L. panamensis*, *L. guyanensis* y otra especie o variante que no pudo ser identificada, ya que no se obtuvo una secuencia con la calidad necesaria (solo una hebra y con señal de fondo). Además, de que los patrones de restricción sugieren la presencia de una infección mixta que según el análisis RFLP consistiría en una infección causada por *L. braziliensis* y otra especie de *Leishmania*. De igual forma, como se puede ver en la sección de resultados, los patrones de restricción obtenidos no coinciden con los patrones del análisis *in silico*, lo cual indica que las secuencias de las muestras analizadas son diferentes (como se puede observar en el alineamiento de estas secuencias en el anexo 11) y también señala la posible presencia de infecciones mixtas, por lo que se recomendaría adaptar una metodología para hacerla específica para las especies de Guatemala, ya que parte de la metodología empleada se basó en estudios realizados en Sudamérica (Fraga *et al.*, 2012, 2010, 2013; Montalvo *et al.*, 2016; Montalvo *et al.*, 2008, 2010, 2012; Montalvo *et al.*, 2010) o realizar una clonación del material genético. Además, no se obtuvieron muestras que se pudieran identificar como *L. mexicana*, debido a que probablemente el muestreo fue afectado, en general, por los criterios de selección propuestos. Además, también es probable que las láminas para las que no se obtuvo amplificación pertenezcan a *L. mexicana*, debido a que como se puede ver en la Figura 26, la proporción de muestras sin amplificar es similar a la proporción esperada para esta especie. Por estas razones, se puede afirmar que los resultados obtenidos no son generalizables y se necesita de más estudios con un mayor tamaño de muestra y que se trabaje una metodología basada en secuencias obtenidas en muestras de Guatemala, de manera que se desarrolle un algoritmo de restricción específico para el país.

La principal forma de diagnóstico de leishmaniosis cutánea en Guatemala consiste en la elaboración de láminas con extendidos de tejido de las lesiones que, luego de ser fijadas con metanol y teñidas con Giemsa, se observan al microscopio (Aronson *et al.*, 2016). Sin embargo, el tiempo, la preparación y las condiciones de almacenamiento de las muestras pueden llegar a ser un obstáculo para emplear estas láminas como fuente de ADN para pruebas moleculares, debido a que el material genético puede estar fragmentado, lo cual dificulta la amplificación de segmentos específicos (Ribeiro, Peres, & Pina-Neto, 2004; Straube & Juen, 2013). Por esto, en investigaciones como esta, se prefiere realizar la amplificación de segmentos pequeños de los genes de interés. En el caso de *Leishmania*, realizar la amplificación del fragmento G del gen *hsp70* de *Leishmania* (1422 bp) presenta una baja tasa de amplificación, posiblemente debido a la fragmentación del material lo cual podría ser una explicación a la ausencia de literatura en la que se haya realizado la amplificación de este fragmento a partir de láminas con extendidos de las lesiones cutáneas. Además, un factor que también influye en la amplificación son las parasitemias bajas, ya que si hay pocos parásitos de los que se puede obtener material genético, se dificulta obtener un producto de amplificación. Sin embargo, existe reportes sobre los límites de detección del PCR del fragmento de 1422 bp del *hsp70* donde se ha determinado que este procedimiento es capaz de detectar hasta 23 pg/uL (picogramos/microlitros) en el caso

de un cultivo de parásitos de *Leishmania siamensis* (Hitakarun *et al.*, 2014). Por otra parte, también se conoce que los límites de detección del PCR-G varían según la especie que se esté analizando, lo cual también podría explicar porque no se identificaron infecciones por *Leishmania mexicana*, ya que para esta especie se necesita al menos 1 ng de ADN para obtener un producto de amplificación, mientras que para las especies *L. braziliensis*, *L. peruviana*, *L. naiffi*, *L. guyanensis*, *L. panamensis* y *L. lainsoni*, el PCR puede generar un producto de amplificación visible utilizando partiendo de 1 pg de material genético (Montalvo *et al.*, 2012). Sin embargo, un estudio reveló que *L. mexicana* cuenta con siete copias del gen *hsp70*, por lo que el número de copias no puede considerarse como un factor que limite la amplificación de esta especie (Folgueira *et al.*, 2007).

El porcentaje de amplificación puede incrementarse si se opta, por ejemplo, por el uso de metodologías más sensibles como el PCR anidado de un fragmento de menor tamaño, como el fragmento N del gen *hsp70* de *Leishmania*, de 593 bp. Un estudio realizado en el Centro de Estudios en Salud de la Universidad del Valle de Guatemala realizó la extracción de ADN a partir de láminas de gota gruesa a 30 muestras y obtuvo un porcentaje de amplificación del 100% (93% específicamente para fragmento de 593 bp del gen *hsp70*) (Comunicación personal, Daniel Juárez). Otro estudio reporta un porcentaje de amplificación en los ensayos de PCR para muestras que también fueron obtenidas a partir de láminas teñidas con Giemsa (83.2% de resultados de PCR positivos) (Volpini *et al.*, 2006), pero es importante tomar en cuenta que el PCR del estudio de Volpini y colaboradores, fue desarrollado para el ADN del cinetoplasto, cuyo amplicón tienen un tamaño considerablemente menor (menor a 125 bp) y un mayor número de copias por célula (10,000 copias por parásito), en comparación con el marcador *hsp70* (5-10 copias por genoma) (Van der Auwera y Dujardin, 2015), lo que permite una mejor amplificación. Debido a esto, y tomando en cuenta la antigüedad de algunas muestras, el porcentaje de amplificación obtenido se considera adecuado, ya que al menos supera el 50% de las muestras analizadas.

Debido a esta situación, los estudios moleculares de leishmaniosis conllevan una serie de dificultades desde la extracción de ADN. Esto se debe a que el material disponible para la extracción presenta algunos retos, como la posible contaminación, principalmente con material genético humano y potencialmente otros patógenos que usualmente coinfectan las lesiones. Existen reportes que indican que la tasa de infecciones secundarias en lesiones de leishmaniosis se encuentra entre un 23.6 - 81% (Antonio *et al.*, 2017). Debido a esta contaminación con otras fuentes de ADN, no se realizó una cuantificación de ácidos nucleicos por espectrofotometría, ya que este valor no sería equivalente a la concentración de ADN del parásito en la muestra. Tampoco se contaba con un gen de referencia (*housekeeping gene*) para *Leishmania*, por lo que para verificar la obtención de ADN luego de la extracción, se amplificó el gen de la B-globina humana. Sin embargo, se obtuvo un porcentaje de amplificación menor (32%) en relación con la amplificación del marcador *hsp70*, lo cual podría deberse a que se utilizó otra enzima Taq Polimerasa, debido a que la enzima

con la que se realizaron las amplificaciones se terminó. También se evaluó si el tiempo de evolución en la lesión al momento de la toma de muestra podría influir en extracción y amplificación del material genético, pero el análisis estadístico (prueba t) mostró que no existía diferencia estadísticamente significativa entre el tiempo de evolución entre las lesiones con una amplificación positiva y las que no tuvieron amplificación.

Se utilizó un kit comercial para realizar la extracción del ADN para las 191 muestras seleccionadas en este estudio debido a que, a pesar de que se ha reportado un menor rendimiento de ADN en comparación con métodos como Fenol/Cloroformo (Farnoosh *et al.*, 2013), el material genético aislado con columnas de sílica posee una mejor pureza, convirtiéndolo en un mejor candidato para ser utilizado en posteriores aplicaciones como PCR y RFLP (Kopecká *et al.*, 2016). El procedimiento de extracción utilizado por Volpini y colaboradores, es barato y más fácil de realizar ya que solamente involucra el uso de agua y calor, pero debido a que no involucra la remoción de impurezas y contaminantes podría afectar la amplificación del ADN y la calidad de los patrones de restricción. Una alternativa que puede aplicarse en el caso de no contar con kits de extracciones puede ser realizar la extracción mediante el método de Volpini y posteriormente purificar el material genético, con el objetivo de eliminar la mayor cantidad de contaminantes y potenciales inhibidores del PCR. La calidad del ADN extraído y la consecuente amplificación del fragmento N del gen *hsp70* fueron adecuadas, ya que se pudo observar que para el 89% de las muestras (33/37) se obtuvo una secuencia satisfactoria (más de 533 bp, 90% de los residuos esperados). Sin embargo, no fue posible obtener productos de amplificación detectables por electroforesis de agarosa para el fragmento de 1422 bp, lo que podría deberse a que exista un bajo número de copias amplificadas, que el material genético se encuentre fragmentado o que existan inhibidores del PCR en la muestra. Para resolver este tipo de problemas, se podrían realizar varias amplificaciones de la misma muestra, combinar los productos, purificarlos y concentrarlos, previo a la secuenciación y a el análisis de RFLP. De esta forma, se aumentaría el número de copias y por lo tanto la posibilidad de obtener un resultado. Otra recomendación importante que se debe considerar es la de diluir los productos de extracción, ya que si hay inhibidores del PCR en el material obtenido de las láminas, estos también se diluyen y se reducirá su efecto en el PCR; se recomienda particularmente utilizar el extracto puro y una dilución 1/100 (Fraga *et al.*, 2012). Algunas de los componentes que podrían estar presentes en el caso del raspado de las lesiones cutáneas podrían ser colágeno, hemoglobina, grupo hemo y lactoferrina, que se han confirmado como causantes de la inhibición de PCR en otros estudios (Bessetti, 2007).

Sin embargo, a pesar de estas desventajas, se utilizó el marcador *hsp70*, debido a que ya se ha utilizado ampliamente para determinar las relaciones evolutivas entre las diferentes especies de parásitos y como un objetivo para otras metodologías de PCR-RFLP que han sido propuestas (Fraga *et al.*, 2012, 2010, 2013; Kermanjani *et al.*, 2017; Montalvo *et al.*, 2016; Montalvo *et al.*, 2008, 2010, 2012; Montalvo *et al.*, 2010; Oshaghi *et al.*, 2009; Van der Auwera *et al.*, 2016; Van der Auwera y Dujardin, 2015), lo cual permite realizar comparaciones. El mejor enfoque para la determinación de la especie sería la amplificación del

fragmento de 1422 bp (fragmento G) debido a que este cuenta con una secuencia más grande y con una mayor cantidad de información para poder distinguir entre especies. Sin embargo, debido a la falta de amplificación antes mencionada, se optó por trabajar con el fragmento N de 593 bp. Al trabajar con el fragmento N, no es posible distinguir entre *L. guyanensis* y *L. panamensis* a través del análisis de restricción, debido a que para la secuencia del segmento N las especies son prácticamente idénticas. No obstante, se identificaron nuevos patrones de restricción que fueron confirmados por secuenciación y análisis de similitud como nuevos patrones que corresponden a *L. guyanensis* y *L. panamensis*. Esto implicaría la confirmación de la presencia de estas dos especies en Guatemala, que podrían corresponder a casos importados y tienen implicaciones clínicas importantes, ya que estas especies son capaces de transmitir las formas cutánea, mucocutánea y diseminada de la enfermedad (Akhoundi *et al.*, 2017). Sin embargo, no se cuenta con información que respalde esta hipótesis, debido a que no se tiene información de historia de viajes de los pacientes y también existe la posibilidad de que otras especies de *Leishmania* se hayan diseminado en el país.

Además, el algoritmo de restricción fue capaz de diferenciar entre *L. braziliensis*, *L. panamensis*/*L. guyanensis* y tiene potencial para poder diferenciar entre más especies, tal como ha sido reportado. Esto se comprobó al identificar la presencia de una muestra (GE-2631) que posee la combinación de patrones de restricción que pertenece a *Leishmania peruviana*. Otra especie previamente no reportada fue *L. naiffi* (muestra GE-1088). Esta especie, autóctona de Sudamérica, es de poca importancia clínica, debido a una baja tasa de infecciones y por responder rápidamente al tratamiento con antimoniales o incluso, resolver sin tratarla, por lo que el estudio de esta especie no ha sido prioritario (Fagundes-Silva *et al.*, 2015). No obstante, es posible que algunas de las muestras identificadas como *L. braziliensis* en realidad pertenezcan a *L. naiffi*, ya que la secuencia del fragmento N para estas especies es muy similar y en el presente estudio no se realizó el último corte con enzimas de restricción para diferenciar entre éstas (Fraga *et al.*, 2013; Montalvo *et al.*, 2010).

Una hipótesis que podría explicar la presencia de *L. peruviana*, *L. naiffi* y de la combinación *L. guyanensis*/*L. panamensis*, podría ser un evento de migración en el que un extranjero, turista o migrante infectado, introdujera la especie a Guatemala durante su paso o permanencia en el país. Se recomienda a los centros de vigilancia del sistema nacional de salud adoptar metodologías moleculares como la establecida en este estudio para mejorar el monitoreo de la enfermedad. Además, es importante realizar otros estudios para evaluar la posibilidad de estudiar coinfecciones e infecciones mixtas (más de una especie de *Leishmania*) por medio de una metodología sensible y que no dependa de la detección a través de geles de agarosa, como por ejemplo un qPCR.

## VIII. CONCLUSIONES

Se optimizó el protocolo de PCR-RFLP (primer corte) que permitió obtener una amplificación y patrones de restricción del 64% de las muestras para diferenciar entre las especies *Leishmania braziliensis*, y *Leishmania panamensis/Leishmania guyanensis*, utilizando la enzima de restricción *BsaJI*.

Según la información del fragmento N del marcador *hsp70*, se sospecha la presencia de *Leishmania panamensis*, *Leishmania guyanensis*, *Leishmania peruviana*, *Leishmania naiffi* y una variante de *Leishmania braziliensis* en Guatemala.

Se determinó que la especie predominante en el grupo de muestras analizadas por PCR-RFLP fue *Leishmania braziliensis* (86.7%), seguido de las especies *Leishmania panamensis/Leishmania guyanensis* (3.33%).

La probable presencia de nuevas especies del género *Leishmania* en Guatemala tiene implicaciones clínicas importantes para el Ministerio de Salud por el riesgo de casos de Leishmaniosis cutánea resistentes a medicamentos o de Leishmaniosis mucocutánea, que ha sido reportado en otros países de América.

Las especies identificadas en Guatemala se agruparon en los mismos clados que las secuencias de especies obtenidas de bases internacionales, por lo que se puede confirmar que pertenecen a los complejos de especies en los que se encuentran.

Las secuencias que se sospecha corresponden a *Leishmania panamensis* y *Leishmania guyanensis* se encuentran agrupadas entre secuencias de *Leishmania braziliensis*, debido a la menor resolución del fragmento N del marcador *hsp70* para distinguir entre especies del subgénero *Viannia*.

El modelo generado por medio del análisis de regresión logístico no tuvo la capacidad para predecir la especie del parásito responsable de la enfermedad (acierta en un 30%) a partir de las variables área y tiempo de evolución de las lesiones del paciente.

Según los resultados obtenidos no es posible afirmar que exista relación entre la especie del parásito y las manifestaciones clínicas que se analizaron (área y tiempo de evolución de la lesión del paciente).

## IX. RECOMENDACIONES

Se recomienda concentrar el ADN de los productos de amplificación del fragmento de 1422 bp del gen *hsp70* para utilizarlo en la determinación de la especie del parásito en casos en los que el fragmento de 593 bp no tenga la capacidad para diferenciar entre especies.

Realizar más estudios de la epidemiología molecular de la leishmaniosis cutánea en Guatemala, debido a que no se cuenta con información actualizada sobre la historia natural de la enfermedad y podría estarse perdiendo la oportunidad de detectar a nuevas especies que estén circulando en el país.

Realizar estudios sobre leishmaniasis cutánea utilizando la metodología de qPCR para evaluar la presencia de posibles infecciones mixtas y de infecciones que probablemente sean indetectables por la metodología de PCR *hsp70* de cualquiera de los segmentos G o N.

Diseñar estudios con un tamaño de muestra mayor, debido a que probablemente el efecto de las manifestaciones clínicas de la enfermedad sea pequeño por lo que se requiera un tamaño de muestra mayor para que estas variables puedan explicar las especies de parásitos responsables de las infecciones.

Se recomienda al Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social adoptar la metodología combinada de PCR-RFLP/*hsp70* del fragmento de 593 bp para identificar a las especies de parásitos causantes de Leishmaniosis cutánea en el sistema nacional de salud de Guatemala para adecuar el tratamiento de los pacientes.

Se recomienda realizar estudios en potenciales reservorios y vectores de los parásitos del género *Leishmania* para confirmar el ciclo de transmisión de la leishmaniasis en el país y las especies implicadas.

## X. BIBLIOGRAFÍA

- Akhoundi, M., Downing, T., Votýpka, J., Kuhls, K., Cannet, A., Ravel, C., ... Sereno, D. (2017). Molecular Aspects of Medicine Leishmania infections : Molecular targets and diagnosis, 57. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2016.11.012>
- Antonio, L. de F., Lyra, M. R., Saheki, M. N., Schubach, A. de O., Miranda, L. de F. C., Madeira, M. de F., ... Pimentel, M. I. F. (2017). Effect of secondary infection on epithelialisation and total healing of cutaneous leishmaniasis lesions. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 112(9), 640–646. <https://doi.org/10.1590/0074-02760160557>
- Arana, B. (2007). Complexity of Treating New World Cutaneous Leishmaniasis.
- Arana, B. A., Mendoza, C. E., Rizzo, N. R., & Kroeger, A. (2001). Randomized , Controlled , Double-Blind Trial of Topical Treatment of Cutaneous Leishmaniasis With Paromomycin Plus Methylbenzethonium Chloride Ointment in Guatemala. *The American Society of Tropical Medicine and Hygiene*;65(5):466-70.65(5), 466–470.
- Arana, B. A., Navin, T. R., Arana, F. E., Berman, J. D., & Rosenkaimer, F. (1994). Efficacy of a Short-Course (10 Days) of High-Dose Meglumine Antimonate With or Without Interferon-Gamma in Treating Cutaneous Leishmaniasis in Guatemala. *Clinical Infectious Diseases*, 18(3), 381–384.
- Aronson, N., Herwaldt, B. L., Libman, M., Pearson, R., Lopez-Velez, R., Weina, P., ... Magill, A. (2016). Diagnosis and Treatment of Leishmaniasis: Clinical Practice Guidelines by the Infectious Diseases Society of America (IDSA) and the American Society of Tropical Medicine and Hygiene (ASTMH). *Clinical Infectious Diseases*, 63(12), 1539–1557. <https://doi.org/10.1093/cid/ciw742>
- Asato, Y., Oshiro, M., Myint, C. K., Yamamoto, Y., Kato, H., Marco, J. D., ... Uezato, H. (2009). Phylogenetic analysis of the genus *Leishmania* by cytochrome b gene sequencing. *Experimental Parasitology*, 121(4), 352–361. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2008.12.013>
- Asilian, A., & Davami, M. (2006). Comparison between the efficacy of photodynamic therapy and topical paromomycin in the treatment of Old World cutaneous leishmaniasis: a placebo-controlled, randomized clinical trial. *Clinical and Experimental Dermatology*, 31(5), 634–637. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2230.2006.02182.x>
- Bensoussan, E., Nasereddin, A., Jonas, F., Schnur, L. F., & Jaffe, C. L. (2006). Comparison of PCR Assays for Diagnosis of Cutaneous Leishmaniasis. *Journal of Clinical Microbiology*, 44(4), 1435–1439. <https://doi.org/10.1128/JCM.44.4.1435-1439.2006>
- Bessetti, B. J. (2007). An Introduction to PCR Inhibitors. *Promega Notes*, 9–10. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.109.559013>
- Bhattarai, N. R., Dujardin, J. C., Rijal, S., De Doncker, S., Boelaert, M., & Van der Auwera, G. (2010). Development and evaluation of different PCR-based typing methods for discrimination of *Leishmania donovani* isolates from Nepal. *Parasitology*, 137(6), 947–957. <https://doi.org/10.1017/S0031182009991752>

- Blaylock, J. M., & Wortmann, G. W. (2012). A case report and literature review of Chiclero's ulcer. *Travel Medicine and Infectious Disease*, 10(5–6), 275–278. <https://doi.org/10.1016/j.tmaid.2012.08.005>
- Buckner, F. & Schwartz, E. (2017). Chapter 39 – Leishmaniasis. *The Travel and Tropical Medicine Manual*. Elsevier. Fifth Edition. 501-512. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-37506-1.00039-8>.
- Carreira, P. F., Maingon, R., Ward, R. D., Noyes, H., Ponce, C., Belli, A., ... Arana, B. (1995). Molecular techniques in the characterization of Leishmania isolates from Central America. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*, 89:sup1, 31-36, DOI: 10.1080/00034983.1995.11813012
- CDC. (2013). Leishmaniasis FAQs. Sitio Web: [https://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/gen\\_info/faqs.html](https://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/gen_info/faqs.html) [Consultado:21/04/2018].
- CDC. (2017). Leishmaniasis - Resources for Health Professionals. Sitio Web: [https://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/health\\_professionals/index.html](https://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/health_professionals/index.html) [Consultado:21/04/2018].
- Chauhan, I. S., Kaur, J., Krishna, S., Ghosh, A., Singh, P., Siddiqi, M. I., & Singh, N. (2015). Evolutionary comparison of prenylation pathway in kinetoplastid Leishmania and its sister Leptomonas. *BMC Evolutionary Biology*, 15(1). <https://doi.org/10.1186/s12862-015-0538-3>
- Cláudia, K., Lidani, F., Fabiana, A., Cláudia, K., Lidani, F., Andrade, F. A., ... Costa-ribeiro, M. C. V. (2017). Visceral Leishmaniasis and Natural Infection Rates of Leishmania in Lutzomyia longipalpis in Latin America. *The Epidemiology and Ecology of Leishmaniasis*, 59–77.
- Copeland, H. W., Arana, B. A., & Navin, T. R. (1990). Comparison of Active and Passive Case Detection of Cutaneous Leishmaniasis in Guatemala. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 43(3), 257–259. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1990.43.257>
- Coutlée, F., de Ladurantaye, M., Tremblay, C., Vincelette, J., Labrecque, L., & Roger, M. (2000). An important proportion of genital samples submitted for Chlamydia trachomatis detection by PCR contain small amounts of cellular DNA as measured by beta-globin gene amplification. *Journal of clinical microbiology*, 38(7), 2512–2515.
- Cupolillo, E., Brahim, L. R., Toaldo, C. B., Oliveira-Neto, M. P., Brito, M. E. F., Falqueto, A., ... Grimaldi, G. (2003). Genetic polymorphism and molecular epidemiology of Leishmania (Viannia) braziliensis from different hosts and geographic areas in Brazil. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(7), 3126–32. <https://doi.org/10.1128/JCM.41.7.3126>
- Cupolillo, E., Grimaldi Júnior, G., Momen, H., & Beverley, S. M. (1995). Intergenic region typing (IRT): a rapid molecular approach to the characterization and evolution of Leishmania. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 73(1–2), 145–155.
- Cupolillo, E., Medina-Acosta, E., Noyes, H., Momen, H., & Grimaldi, G. (2000). A revised classification for Leishmania and Endotrypanum. *Parasitology Today*, 16(4), 142–144. [https://doi.org/10.1016/S0169-4758\(99\)01609-9](https://doi.org/10.1016/S0169-4758(99)01609-9)
- Cupolillo, E., Momen, H., & Grimaldi Jr, G. (1998). Genetic Diversity in Natural Populations of New World Leishmania. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 93(5), 663–668. <https://doi.org/10.1590/S0074-02761998000500018>
- David, C. V., & Craft, N. (2009). Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis (3). *Dermatologic Therapy*, 22, 491–502. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8019.2009.01272.x>
- Davidson, R. (2017). 123 – Leishmaniasis. *Infectious Diseases*. Elsevier. Fourth Edition. 1059-1064.e1. <https://doi.org/10.1016/B978-0-7020-6285-8.00123-4>.

- De Vries, H. J. C., Reedijk, S. H., & Schallig, H. D. F. H. (2015). Cutaneous Leishmaniasis: Recent Developments in Diagnosis and Management. *American Journal of Clinical Dermatology*, *16*(2), 99–109. <https://doi.org/10.1007/s40257-015-0114-z>
- Devi, C. S., Saravanan, H., Joseph, R. E., Koturan, S., & Srinivasan, V. M. (2014). Leishmaniasis: A review on global epidemiological trends. *Research Journal of Pharmacy and Technology*, *7*(5), 569–574.
- Esch, K. J., & Petersen, C. A. (2013). Transmission and Epidemiology of Zoonotic Protozoal Diseases of Companion Animals. *Clinical Microbiology Reviews*, *26*(1), 58–85. <https://doi.org/10.1128/CMR.00067-12>
- Fagundes-Silva, G. A., Romero, G. A. S., Cupolillo, E., Yamashita, E. P. G., Gomes-Silva, A., Guerra, J. A. de O., & Da-Cruz, A. M. (2015). Leishmania (Viannia) naiffi: rare enough to be neglected? *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, *110*(6), 797–800. <https://doi.org/10.1590/0074-02760150128>
- Farnoosh, G. R., Hassanpour, K., Taheri, R. A., Ghamgosha, M., Sani, M. R. M., & Mellat, M. (2013). Comparison of three different DNA extraction methods from positive smears prepared from lesions of patients with cutaneous leishmaniasis. *European Journal of Experimental Biology*, *3*(6), 212–214.
- Folgueira, C., Cañavate, C., Chicharro, C., & Requena, J. M. (2007). Genomic organization and expression of the HSP70 locus in New and Old World Leishmania species. *Parasitology*, *134*(3), 369–377. <https://doi.org/10.1017/S0031182006001570>
- Fraga, J., Montalvo, A. M., De Doncker, S., Dujardin, J.-C., & Van der Auwera, G. (2010). Phylogeny of Leishmania species based on the heat-shock protein 70 gene. *Infection, Genetics and Evolution*, *10*(2), 238–245. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2009.11.007>
- Fraga, J., Montalvo, A. M., Maes, Ilse, Dujardin, J.-C., & Van der Auwera, G. (2013). HindII and SduI digests of heat-shock protein 70 PCR for Leishmania typing. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, *77*(3), 245–247. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2013.07.023>
- Fraga, J., Veland, N., Montalvo, A. M., Praet, N., Boggild, A. K., Valencia, B. M., ... Van der Auwera, G. (2012). Accurate and rapid species typing from cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis lesions of the New World. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, *74*(2), 142–150. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2012.06.010>
- Garcia, L., Kindt, A., Bermudez, H., Llanos-cuentas, A., Doncker, S. De, Arevalo, J., ... Dujardin, J. (2004). Culture-Independent Species Typing of Neotropical Leishmania for clinical validation of a PCR-based assay targeting heat shock protein 70 genes. *Journal of Clinical Microbiology*, *42*(5), 2294–2297. <https://doi.org/10.1128/JCM.42.5.2294>
- Giavedoni, P., Pau-Charles, I., Mascaró, J. M., Alsina-Gibert, M., García-Herrera, A., & Estrach, T. (2014). Disseminated cutaneous leishmaniasis in a patient with Sézary syndrome. *Journal of the American Academy of Dermatology*, *71*(5), e213–e214. <https://doi.org/10.1016/j.jaad.2014.07.010>
- Gonçalves, S., & Costa, C. (2018). Treatment of cutaneous leishmaniasis with thermotherapy in Brazil: an efficacy and safety study. *Anais brasileiros de dermatologia*, *93*(3), 347–355. doi:10.1590/abd1806-4841.20186415
- Goto, H., & Lindoso, J. A. L. (2010). Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, *8*(4), 419–433. <https://doi.org/10.1586/eri.10.19>
- Guery, R., Henry, B., Martin-Blondel, G., Rouzard, C., Cordoliani, F., Harms, G., ... French Cutaneous Leishmaniasis Study group & the LeishMan network (2017). Liposomal amphotericin B in travelers with cutaneous and muco-cutaneous leishmaniasis: Not a panacea. *PLoS neglected tropical diseases*, *11*(11), e0006094. doi:10.1371/journal.pntd.0006094.

- Hernandez-Montes, O., Monroy-Ostria, A., McCann, S., & Barker, D. C. (1998). Identification of Mexican Leishmania species by analysis of PCR amplified DNA. *Acta Tropica*, 71(2), 139–153. [https://doi.org/10.1016/S0001-706X\(98\)00057-6](https://doi.org/10.1016/S0001-706X(98)00057-6)
- Herwaldt, B. L., Arana, B. A., & Navin, T. R. (1992). The Natural History of Cutaneous Leishmaniasis in Guatemala. *The Journal of Infectious Diseases*, 165(3), 518–527. Retrieved from <http://www.jstor.org/stable/30112057>
- Hitakarun, A., Tan-ariya, P., Siripattanapipong, S., Mungthin, M., Piyaraj, P., Naaglor, T., ... Leelayoova, S. (2014). Comparison of PCR methods for detection of Leishmania siamensis infection. *Parasites & vectors*, 7, 458. doi:10.1186/s13071-014-0458-x
- Huang, Q., Baum, L., & FU, W.-L. (2010). Simple and Practical Staining of DNA with GelRead in Agarose Gel Electrophoresis. *Clin. Lab*, 56(January), 149–152.
- Ishikawa, E. A. Y., Silveira, F. T., Magalhães, A. L. P., Guerra jr., R. B., Melo, M. N., Gomes, R., ... Shaw, J. J. (2002). Genetic variation in populations of Leishmania species in Brazil. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 96, S111–S121. [https://doi.org/10.1016/S0035-9203\(02\)90061-1](https://doi.org/10.1016/S0035-9203(02)90061-1)
- Institute of Tropical Medicine Alexander von Humboldt (IMTAvH) and Institute of Tropical Medicine Antwerp (ITM). (2013). Latin-American training workshop on molecular epidemiology applied to infectious diseases. L5. Gel electrophoresis of RFLP-PCR products (*hsp70* G, F and N and kDNA *L. leishmania*). 5 pp.
- Kermanjani, A., Akhlaghi, L., Oormazdi, H., & Hadighi, R. (2017). Isolation and identification of cutaneous leishmaniasis species by PCR–RFLP in Ilam province, the west of Iran. *Journal of Parasitic Diseases*, 41(1), 175–179. <https://doi.org/10.1007/s12639-016-0772-7>
- Kobets, T., Grekov, I., & Lipoldová, M. (2012). Leishmaniasis: Prevention, Parasite Detection and Treatment. *Current Medicinal Chemistry*, 19(10), 1443–1474. <https://doi.org/10.2174/092986712799828300>
- Kopecká, J., Němec, M., & Matoulková, D. (2016). Comparison of DNA-based techniques for differentiation of production strains of ale and lager brewing yeast. *Journal of applied microbiology*, 120(6), 1561-1573.
- López, L., Robayo, M., Vargas, M., & Vélez, I. D. (2012). Thermoherapy. An alternative for the treatment of American cutaneous leishmaniasis. *Trials*, 13(1). <https://doi.org/10.1186/1745-6215-13-58>
- Luyo-Acero, G. E., Uezato, H., Oshiro, M., Takei, K., Kariya, K., Katakura, K., ... Nonaka, S. (2004). Sequence variation of the Cytochrome b gene of various human infecting members of the genus Leishmania and their phylogeny. *Parasitology*, 128(5), 483–491. <https://doi.org/10.1017/S0031182004004792>
- Magill, A. 99 – Leishmaniasis. (2013). Hunter's Tropical Medicine and Emerging Infectious Disease. W.B. Saunders, Elsevier. Ninth Edition. 739-760. <https://doi.org/10.1016/B978-1-4160-4390-4.00099-0>.
- Maia-Elkhoury, A. N. S., E. Yadón, Z., Idali Saboyá Díaz, M., de Fátima de Araújo Lucena, F., Gerardo Castellanos, L., & J. Sanchez-Vazquez, M. (2016). Exploring Spatial and Temporal Distribution of Cutaneous Leishmaniasis in the Americas, 2001–2011. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 10(11), 2001–2011. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005086>
- Mendizabal R, de Leon O, Arana B, Duran E, Ramay B, Mendez L, et al. (2015). Challenges for controlling cutaneous leishmaniasis in remote areas of Guatemala, Central America., Conference: ASTMH 64th Annual Meeting.

- Miranda, A., Saldaña, A., González, K., Paz, H., Santamaría, G., Samudio, F., & Calzada, J. E. (2012). Evaluation of PCR for cutaneous leishmaniasis diagnosis and species identification using filter paper samples in Panama, Central America. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 106(9), 544–548. <https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2012.05.005>
- Monroy-Ostria, A., Nasereddin, A., Monteon, V. M., Guzmán-Bracho, C., & Jaffe, C. L. (2014). ITS1 PCR-RFLP diagnosis and characterization of leishmania in clinical samples and strains from cases of human cutaneous leishmaniasis in states of the Mexican Southeast. *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases*, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/607287>
- Montalvo, A., Fraga, Jo., Montano, I., Monzote, L., Auwera, G. van, MArín, M., & Muskus, C. (2016). Identificación molecular con base en el gen *hsp70* de aislamientos clínicos de leishmania spp. en Colombia. *Biomedica*, 36(1), 37–44. Retrieved from <http://www.scielo.org.co/pdf/bio/v36s1/v36s1a06.pdf>
- Montalvo, A. M., Fraga, J., Aylema Romero, J., Monzote, L., Montano, I., & Dujardin, J.-C. (2008). PCR-RFLP / *Hsp70* para identificar y tipificar *Leishmania* de la región neotropical. *Rev. Cubana Med. Trop*, 58(3), 226–234.
- Montalvo, A. M., Fraga, J., Maes, I., Dujardin, J.-C., & Van der Auwera, G. (2012). Three new sensitive and specific heat-shock protein 70 PCRs for global *Leishmania* species identification. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 31(7), 1453–1461. <https://doi.org/10.1007/s10096-011-1463-z>
- Montalvo, A. M., Fraga, J., Monzote, L., Montano, I., De Doncker, S., Dujardin, J. C., & Van Der Auwera, G. (2010). Heat-shock protein 70 PCR-RFLP: a universal simple tool for *Leishmania* species discrimination in the New and Old World. *Parasitology*, 137(08), 1159–1168. <https://doi.org/10.1017/S0031182010000089>
- Montalvo, A. M., Nodarse, J. F., Goodridge, I. M., Fidalgo, L. M., Marin, M., Van Der Auwera, G., ... Muskus, C. (2010). Differentiation of *Leishmania* (*Viannia*) *panamensis* and *Leishmania* (*V.*) *guyanensis* using *BccI* for *hsp70* PCR-RFLP. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 104(5), 364–367. <https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2009.12.002>
- Morales, Z. (2008). Leishmaniasis en la Región de las Américas. Reunión de coordinadores de Programa Nacional de Leishmaniasis. OPS/OMS.
- Motazedian, H., Karamian, M., Noyes, H. A., & Ardehali, S. (2002). DNA extraction and amplification of *Leishmania* from archived, Giemsa-stained slides, for the diagnosis of cutaneous leishmaniasis by PCR. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*, 96(1), 31–34. <https://doi.org/10.1179/000349802125000484>
- Mouri, O., Morizot, G., Van der Auwera, G., Ravel, C., Passet, M., Chartrel, N., ... Buffet, P. (2014). Easy Identification of *Leishmania* Species by Mass Spectrometry. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 8(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002841>
- Murray, H. W., Berman, J. D., Davies, C. R., & Saravia, N. G. (2005). Advances in leishmaniasis. *Lancet (London, England)*, 366(9496), 1561–77. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)67629-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)67629-5)
- Navin, T. R., Arana, B. A., Arana, F. E., Berman, J. D., & Chajón, J. F. (1992). Placebo-Controlled Clinical Trial of Sodium Stibogluconate (Pentostam) versus Ketoconazole for Treating Cutaneous Leishmaniasis in Guatemala. *Journal of Infectious Diseases*, 165(3), 528–534. <https://doi.org/10.1093/infdis/165.3.528>
- Navin, T. R., de Merida, A. M., Torres, M. F., Steurer, F., & Arana, F. E. (1988). Cutaneous Leishmaniasis in Guatemala: Isoenzyme Characterization of Isolates from Humans. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 38(1), 50–51. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1988.38.50>

- Nylén, S., & Gautam, S. (2010). Immunological Perspectives of Leishmaniasis. *J Glob Infect Dis*, 2(2), 135–146. <https://doi.org/10.4103/0974-777X.62876>
- OGE, O. G. de E. (2000). *Leishmaniasis*. Lima: Ministerio de Salud, Oficina General de Epidemiología: Instituto Nacional de Salud.
- OMS. (2010). Control de las leishmaniasis Informe de una reunión del. *Informe de Una Reunión Del Comité de Expertos de La OMS Sobre El Control de Las Leishmaniasis, Ginebra*, 186 p.
- OMS. (2017). Leishmaniasis. Sitio web: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/es/> [Consultado: 05/02/2018].
- Oshaghi, M. A., Ravasan, N. M., Hide, M., Javadian, E. A., Rassi, Y., Sedaghat, M. M., ... Hajjaran, H. (2009). Development of species-specific PCR and PCR-restriction fragment length polymorphism assays for *L. infantum/L. donovani* discrimination. *Experimental Parasitology*, 122(1), 61–65. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2009.01.015>
- Pan American Health Organization and World Health Organization (PAHO/OMS). 2018. Leishmaniasis: Epidemiological Report in the Americas: Washington: Pan American Health Organization. Available at: [www.paho.org/leishmaniasis](http://www.paho.org/leishmaniasis)
- Pomares, C., Marty, P., Bañuls, A. L., Lemichez, E., Pratlong, F., Faucher, B., ... Hide, M. (2016). Genetic Diversity and Population Structure of *Leishmania infantum* from Southeastern France: Evaluation Using Multi-Locus Microsatellite Typing. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 10(1), e0004303. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004303>
- Pozuelos, J. L., Navin, T. R., Arana, B. A., Arana, F. E., Mérida, A. M. de, & Castillo, A. L. (1990). Placebo-Controlled Clinical Trial of Meglumine Antimonate (Glucantime) Vs. Localized Controlled Heat in the Treatment of Cutaneous Leishmaniasis in Guatemala. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 42(1), 43–50. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1990.42.43>
- Ready, P. D. (2013). Biology of Phlebotomine Sand Flies as Vectors of Disease Agents. *Annual Review of Entomology*, 58(1), 227–250. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-120811-153557>
- Real, F., Vidal, R. O., Carazzolle, M. F., Mondego, J. M. C., Costa, G. G. L., Herai, R. H., ... Bahia, D. (2013). The genome sequence of *Leishmania (Leishmania) amazonensis*: Functional annotation and extended analysis of gene models. *DNA Research*, 20(6), 567–581. <https://doi.org/10.1093/dnares/dst031>
- Ribeiro, C. N. M., Peres, L. C., & Pina-Neto, J. M. (2004). DNA extraction and quantification from touch and scrape preparations obtained from autopsy liver cells. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 37(5), 635–642. <https://doi.org/10.1590/S0100-879X2004000500002>
- Rioux, J. A., Lanotte, G., Serres, E., Pratlong, F., Bastien, P., & Perieres, J. (1990). Taxonomy of *Leishmania*. Use of isoenzymes. Suggestions for a new classification. *Annales De Parasitologie Humaine Et Comparee*, 65(3), 111–125. <https://doi.org/10.1051/parasite/1990653111>
- Rizzo, N. R., Arana, B. A., Chan, A., Arana, F. E., Hochberg, L., & Ryan, J. R. (2015). Utilidad de un nuevo ELISA para el diagnóstico de la Leishmaniasis cutánea en Guatemala. Guatemala: Revista de la Universidad del Valle de Guatemala.
- Roque, A. L. R., & Jansen, A. M. (2014). Wild and synanthropic reservoirs of *Leishmania* species in the Americas. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, 3(3), 251–262. <https://doi.org/10.1016/j.ijppaw.2014.08.004>

- Rotureau, B. (2006). Ecology of the leishmania species in the Guianan ecoregion complex. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 74(1), 81–96.
- Rougeron, V., De Meeus, T., Hide, M., Waleckx, E., Bermudez, H., Arevalo, J., ... Banuls, A.-L. (2009). Extreme inbreeding in *Leishmania braziliensis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(25), 10224–10229. <https://doi.org/10.1073/pnas.0904420106>
- Rowton, E., de Mata, M., Rizzo, N., Navin, T. & Porter, C. (1991). Vectors of *Leishmania braziliensis* in the Petén, Guatemala. *Parassitologia*, 33 Suppl 501-504. PMID: 1841251.
- Ryan, P. R., Arana, B. A., Ryan, J. R., Wirtz, R. A., Wortmann, G. W., & Rizzo, N. R. (2003). The domestic dog, a potential reservoir for *Leishmania* in the Peten region of Guatemala. *Veterinary Parasitology*, 115(1), 1–7. [https://doi.org/10.1016/S0304-4017\(03\)00158-4](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(03)00158-4)
- Sacks, D. L. (2001). *Leishmania*-sand fly interactions controlling species-specific vector competence. *Cellular Microbiology*, 3(4), 189–196. <https://doi.org/10.1046/j.1462-5822.2001.00115.x>
- Sanderson, B. A., Araki, N., Lilley, J. L., Guerrero, G., & Lewis, L. K. (2014). Modification of gel architecture and TBE/TAE buffer composition to minimize heating during agarose gel electrophoresis. *Analytical Biochemistry*, 454, 44–52. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2014.03.003>.Modification
- Schlein, Y. (1993). *Leishmania* and Sandflies: Interactions in the life cycle and transmission. *Parasitology Today*, 9(7), 255–258. [https://doi.org/10.1016/0169-4758\(93\)90070-V](https://doi.org/10.1016/0169-4758(93)90070-V)
- Schulz, A., Mellenthin, K., Schonian, G., Fleischer, B., & Drosten, C. (2003). Detection, Differentiation, and Quantitation of Pathogenic *Leishmania* Organisms by a Fluorescence Resonance Energy Transfer-Based Real-Time PCR Assay. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(4), 1529–1535. <https://doi.org/10.1128/JCM.41.4.1529-1535.2003>
- Soto-Mancipe, J., Grogl, M., & Berman, J. D. (1993). Evaluation of pentamidine for the treatment of cutaneous leishmaniasis in colombia. *Clinical Infectious Diseases*, 16(3), 417–425. <https://doi.org/10.1093/clind/16.3.417>
- Soto, J., Arana, B. A., Toledo, J., Rizzo, N., Vega, J. C., Diaz, A., ... Sindermann, H. (2004). Miltefosine for New World Cutaneous Leishmaniasis. *Clinical Infectious Diseases*, 38(9), 1266–1272. <https://doi.org/10.1086/383321>
- Straube, D., & Juen, A. (2013). Storage and shipping of tissue samples for DNA analyses: A case study on earthworms. *European journal of soil biology*, 57, 13–18. doi:10.1016/j.ejsobi.2013.04.001
- Tamay de Dios, L., Ibarra, C., & Velasquillo, C. (2013). Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 2(5), 70–78. <https://doi.org/10.1157/13059826>
- Thomaz-Soccol, V., Lanotte, G., Rioux, J. A., Pratlong, F., Martini-Dumas, A., & Serres, E. (1993). Monophyletic origin of the genus *Leishmania* Ross, 1903. *Annales De Parasitologie Humaine Et Comparee*, 68(2), 107–108.
- Valdivieso, C., Valdivieso, R., & Valdivieso, O. (2011). Determinación del tamaño muestral mediante el uso de árboles de decisión. *UPB- Investigación & Desarrollo*, 11(2000), 148–176. <https://doi.org/10.1007/s13398-014-0173-7.2>
- Van der Auwera, G., Bart, A., Chicharro, C., Cortes, S., Davidsson, L., Di Muccio, T., ... Chiodini, P. L. (2016). Comparison of *Leishmania* typing results obtained from 16 European clinical laboratories in 2014. *Eurosurveillance*, 21(49), 1–11. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2016.21.49.30418>

- Van der Auwera, G., & Dujardin, J.-C. (2015). Species typing in dermal leishmaniasis. *Clinical Microbiology Reviews*, 28(2), 265–294. <https://doi.org/10.1128/CMR.00104-14>
- Van der Auwera, G., Maes, I., De Doncker, S., Ravel, C., Cnops, L., Van Esbroeck, M., ... Dujardin, J. C. (2013). Heat-shock protein 70 gene sequencing for leishmania species typing in european tropical infectious disease clinics. *Euro Surveillance*, 18(30), 1–9. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES2013.18.30.20543>
- Vannier-Santos, M. a, Martiny, a, & de Souza, W. (2002). Cell biology of Leishmania spp.: invading and evading. *Current Pharmaceutical Design*, 8(4), 297–318. <https://doi.org/10.2174/1381612023396230>
- Vion, B., & Behin, R. (1988). Cutaneous Leishmaniasis From Guatemala or Yucatan Due to Leishmania braziliensis braziliensis. *International Journal of Dermatology*, 27(10), 710–711. <https://doi.org/10.1111/j.1365-4362.1988.tb01270.x>
- Volpini, A. C., Marques, M. J., Lopes dos Santos, S., Machado-Coelho, G. L., Mayrink, W., & Romanha, A. J. (2006). Leishmania identification by PCR of Giemsa-stained lesion imprint slides stored for up to 36 years. *Clinical Microbiology and Infection*, 12(8), 815–818.
- Wang, C. C., & Fisher, M. H. (1977). *Antiparasitic Agents. Annual Reports in Medicinal Chemistry* (Fourth Edi, Vol. 12). Elsevier Ltd. [https://doi.org/10.1016/S0065-7743\(08\)61553-5](https://doi.org/10.1016/S0065-7743(08)61553-5)
- Weina, P. J., Neafie, R. C., Wortmann, G., Polhemus, M., & Aronson, N. E. (2004). Old World Leishmaniasis: An Emerging Infection among Deployed US Military and Civilian Workers. *Clinical Infectious Diseases*, 39(11), 1674–1680. <https://doi.org/10.1086/425747>
- Wortmann, G., Hochberg, L. P., Arana, B. A., Rizzo, N. R., Arana, F., & Ryan, J. R. (2007). Diagnosis of cutaneous leishmaniasis in Guatemala using a real-time polymerase chain reaction assay and the Smartcycler. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 76(5), 906–908.
- WHO. (2017). Leishmaniases Epidemiological Situation. Sitio Web: <http://www.who.int/leishmaniosis/burden/en/> [Consultado: 11/04/2018].
- WHO. (2018). Leishmaniosis. What is leishmaniosis? Sitio Web: <http://www.who.int/leishmaniosis/disease/en/> [Consultado: 10/04/2018].

## XI. ANEXOS

Anexo 1: Carta de aprobación del Comité de Ética del Centro de Estudios en Salud de la Universidad del Valle de Guatemala.



### UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

11 Calle 15-79, Zona 15 V.H. III  
PBX 2389 0701 al 05  
Tels. 2364 0336 al 40  
2364 0402 al 97  
2507 1500  
www.uvg.edu.gt  
Apartado Postal No. 82, 01901  
Guatemala, Guatemala, C.A.

Guatemala, 15 de junio de 2018

De: Comité de Ética en Investigación  
Centro de Estudios en Salud  
Universidad del Valle de Guatemala

Para: Licda. Renata Mendizábal de Cabrera  
Investigador Principal

Asunto: Evaluación del protocolo titulado "Epidemiología molecular de la Leishmaniosis cutánea en Guatemala durante el periodo 1980-2017 por medio del método PCR-RFLP/hsp70".

El protocolo arriba indicado ha sido revisado por el Comité de Ética en Investigación del Centro de Estudios en Salud y encontró que de acuerdo a los lineamientos de este Comité el mismo se clasifica como "Investigación no sujeta a las regulaciones en sujetos humanos", dado que se utilizará y analizará únicamente el material genético de los parásitos, obtenido de muestras desligadas de información privada identificable de las personas que las proveyeron y no se recolectarán muestras adicionales.

Consecuentemente y en concordancia con el Anexo G, Item 5 del 45 CFR 46 se determina que no es necesario revisiones posteriores de este estudio por parte de este Comité, a menos que se hicieran modificaciones al protocolo evaluado y que éste cambiara de naturaleza.

  
Dr. Jorge Jara, MD, EE.  
Presidente  
Comité de Ética en Investigación  
Centro de Estudios en Salud



Anexo 2: Carta de aprobación del Comité de Ética de la Facultad de Ciencias y Humanidades de la Universidad del Valle de Guatemala.



UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

11 Calle 15-79, Zona 15 V.H. III  
PBX 2369 0791 al 95  
Tels. 2364 0336 al 40  
2364 0492 al 97  
2507 1500  
www.uvg.edu.gt  
Apartado Postal No. 82, 01901  
Guatemala, Guatemala, C.A.

COMITÉ DE ÉTICA  
FACULTAD DE CIENCIAS Y HUMANIDADES  
UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA  
RESULTADOS EVALUACION DE PROYECTO

No. Protocolo	BIOQ-001-JUNIO 2018 - 14294
---------------	-----------------------------

**A:** MSc. Renata Mendizábal de Cabrera, Investigador Principal  
Cristian José Ruíz Calderón, Co-Investigador Principal

**DE:** Dr. Éfego Rolando López  
Presidente Comité de Ética  
Facultad de Ciencias y Humanidades  
Universidad del Valle de Guatemala

**FECHA:** 20 de junio de 2018

**ASUNTO:** EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR DE LA LEISHMANIOSIS CUTÁNEA EN GUATEMALA DURANTE EL PERÍODO 1980-2017 POR MEDIO DEL MÉTODO PCR-RFLP/HSP70.

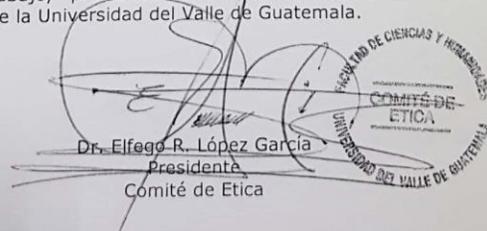
**VEREDICTO:**

La información que incluye el proyecto de investigación, evidencia que el estudiante en el trabajo de investigación, utilizará muestras desligadas de cualquier información identificable y personal.

Asimismo no tendrá contacto con los participantes, por lo tanto es opinión de este Comité, que no se requiere opinión del mismo, para el desarrollo de esta investigación.

No obstante, como buena práctica por parte del estudiante de la Facultad de Ciencias y Humanidades, es recomendable que el estudiante que desarrolla esta investigación, presente copia del dictamen de aprobación del COMITÉ DE ÉTICA, que aprobó la investigación original, ya que el estudio inicial de donde se obtienen las muestras de trabajo, provienen de un estudio efectuado en el Centro de Estudios en Salud de la Universidad del Valle de Guatemala.

Dr. Éfego R. López García  
Presidente  
Comité de Ética



ERLG/alo

Anexo 3: Datos generales de las muestras utilizadas para el estudio, que corresponden al período 1980-2017.

<b>ID</b>	<b>Año colecta</b>	<b>Departamento</b>	<b>Edad</b>	<b>Sexo</b>	<b>Evolución lesión (días)</b>	<b>Área de lesión (cm<sup>2</sup>)</b>	<b>Amplificación PCR <i>hsp70</i></b>	<b>Especie RFLP</b>
GA-0174	1987	Izabal	21	1	60	7.7	Positiva	<i>L. bra/L. nai</i>
GA-0192	1987	Alta Verapaz	53	1	30	3.6	Positiva	<i>L. bra/L. nai</i>
GA-0200	1987	Alta Verapaz	18	1	90	12.5	Positiva	<i>L. bra/L. nai</i>
GA-0201	1987	Baja Verapaz	90	1	28	4.6	Positiva	<i>L. bra/L. nai</i>
GA-0209	1987	Baja Verapaz	22	1	30	3.06	Positiva	<i>L. bra/L. nai</i>
GA-0272	1989	Izabal	18	1	30	6	Positiva	<i>L. bra/L. nai</i>
GA-0277	1989	Baja Verapaz	18	1	45	1.56	Negativo	NA
GA-0417	1995	Quiché	18	1	30	6.25	Negativo	NA
GA-0551	1993	Alta Verapaz	19	1	90	13.68	Positiva	<i>L. bra/L. nai</i>
GA-0556	1993	Alta Verapaz	21	1	150	2.52	Negativo	NA
GA-0571	1994	Alta Verapaz	18	1	90	6.44	Negativo	NA
GA-0573	1994	Baja Verapaz	19	1	60	1.2	Positiva	<i>L. bra/L. nai</i>
GA-0641	1995	Izabal	23	1	60	7	Positiva	<i>L. bra/L. nai</i>
GA-0670	1995	Quiché	19	1	47	4.18	Negativo	NA
GA-0682	1995	Baja Verapaz	18	1	60	8.4	Negativo	NA
GA-0684	1995	Izabal	18	1	60	3.4	Negativo	NA
GA-0812	1995	Baja Verapaz	21	1	74	3.57	Positiva	NA
GA-0815	1995	Quiché	20	1	60	6.21	Negativo	NA
GA-0819	1995	Izabal	24	1	90	0.96	Positiva	<i>L. bra/L. nai</i>
GA-0825	1995	Quiché	19	1	60	5.5	Positiva	<i>L. bra/L. nai</i>
GA-0828	1995	Alta Verapaz	19	1	180	7.75	Negativo	NA
GA-0832	1995	Izabal	19	1	150	3	Negativo	NA
GA-0840	1995	Baja Verapaz	19	1	30	2.25	Positiva	<i>L. bra/L. nai</i>
GA-0921	1996	Alta Verapaz	19	1	180	1.82	Positiva	<i>L. bra/L. nai</i>
GA-0973	1996	Alta Verapaz	19	1	90	1	Positiva	<i>L. bra/L. nai</i>
GA-0977	1996	Baja Verapaz	21	1	120	1.1	Negativo	NA
GA-1005	1997	Quiché	20	1	90	13.44	Negativo	NA
GA-1008	1997	Alta Verapaz	20	1	180	3.6	Positiva	<i>L. bra/L. nai</i>
GA-1165	2010	Alta Verapaz	21	1	41	15.4	Positiva	<i>L. bra/L. nai</i>
GA-1166	2010	Alta Verapaz	19	1	10	0.36	Positiva	<i>L. bra/L. nai</i>
GA-1167	2010	Alta Verapaz	18	1	40	4.2	Positiva	<i>L. bra/L. nai</i>
GA-1168	2010	Alta Verapaz	26	1	45	0.99	Positiva	<i>L. bra/L. nai</i>
GA-1170	2011	Alta Verapaz	19	1	90	18	Positiva	<i>L. bra/L. nai</i>
GA-1172	2014	Quiché	29	1	210	2.55	Positiva	<i>L. bra/L. nai</i>
GA-1174	2016	Alta Verapaz	23	1	90	12	Positiva	<i>L. bra/L. nai</i>
GE-0041	1988	Petén	27	1	45	0.8	Positiva	<i>L. bra/L. nai</i>
GE-0078	1989	Petén	49	1	60	1.1	Positiva	<i>L. pan/L. guy</i>
GE-0094	1989	Alta Verapaz	43	1	150	60	Positiva	<i>L. bra/L. nai</i>

ID	Año colecta	Departamento	Edad	Sexo	Evolución lesión (días)	Área de lesión (cm <sup>2</sup> )	Amplificación PCR <i>hsp70</i>	Especie RFLP
GE-0095	1989	Alta Verapaz	34	2	90	2.55	Positiva	<i>L. pan/L. guy</i>
GE-0096	1989	Petén	16	1	30	0.81	Positiva	<i>L. bra/L. nai</i>
GE-0100	1989	Petén	36	1	30	7.5	Positiva	<i>L. bra/L. nai</i>
GE-0118	1989	Petén	27	1	75	6.6	Positiva	<i>L. pan/L. guy</i>
GE-0120	1989	Petén	15	1	90	4.5	Positiva	<i>L. bra/L. nai</i>
GE-0147	1989	Petén	56	1	45	6.6	Positiva	<i>L. bra/L. nai</i>
GE-0162	1990	Petén	8	1	55	1.5	Positiva	<i>L. bra/L. nai</i>
GE-0189	1990	Petén	36	1	120	6.25	Positiva	<i>L. bra/L. nai</i>
GE-0196	1990	Petén	14	1	30	1.98	Negativo	NA
GE-0214	1990	Petén	20	1	60	1.8	Positiva	<i>L. bra/L. nai</i>
GE-0216	1990	Petén	50	1	30	22	Positiva	Posible infección mixta
GE-0222	1990	Petén	16	1	150	1.5	Positiva	Posible infección mixta
GE-0234	1990	Petén	45	1	30	11.25	Negativo	NA
GE-0238	1990	Petén	20	1	90	2.16	Negativo	NA
GE-0258	1992	Petén	35	1	120	3	Positiva	<i>L. bra/L. nai</i>
GE-0271	1993	Petén	28	1	120	0.7	Positiva	<i>L. pan/L. guy</i>
GE-0280	1993	Petén	7	1	365	1.95	Positiva	<i>L. bra/L. nai</i>
GE-0282	1993	Petén	15	1	92	1.12	Negativo	NA
GE-0285	1993	Petén	17	1	168	1.28	Positiva	<i>L. bra/L. nai</i>
GE-0287	1993	Petén	55	1	365	6.3	Positiva	<i>L. bra/L. nai</i>
GE-0290	1993	Petén	35	1	40	9.9	Positiva	<i>L. bra/L. nai</i>
GE-0293	1993	Petén	14	1	54	2.7	Positiva	<i>L. bra/L. nai</i>
GE-0295	1993	Petén	72	1	405	1.5	Positiva	<i>L. bra/L. nai</i>
GE-0302	1993	Petén	30	1	20	1.7	Positiva	<i>L. bra/L. nai</i>
GE-0303	1993	Petén	12	1	30	1.95	Negativo	NA
GE-0306	1993	Petén	11	1	18	0.8	Positiva	<i>L. bra/L. nai</i>
GE-0318	1993	Petén	23	1	90	1.69	Negativo	NA
GE-0322	1993	Petén	15	1	30	1.69	Negativo	NA
GE-0351	1994	Petén	10	1	45	2.4	Positiva	<i>L. bra/L. nai</i>
GE-0360	1994	Petén	22	1	35	1.68	Positiva	<i>L. pan/L. guy</i>
GE-0366	1994	Petén	11	1	60	2.6	Negativo	NA
GE-0367	1994	Petén	8	1	21	0.7	Positiva	<i>L. bra/L. nai</i>
GE-0374	1994	Petén	7	1	60	2.1	Negativo	NA
GE-0376	1994	Petén	30	1	20	3.06	Negativo	NA
GE-0382	1994	Petén	11	1	60	1	Positiva	<i>L. bra/L. nai</i>
GE-0386	1994	Baja Verapaz	22	1	120	9.52	Positiva	<i>L. bra/L. nai</i>
GE-0389	1994	Baja Verapaz	24	1	60	13.86	Negativo	NA
GE-0396	1994	Petén	15	1	45	1.35	Positiva	<i>L. bra/L. nai</i>
GE-0402	1994	Petén	11	1	120	3.91	Negativo	NA

ID	Año colecta	Departamento	Edad	Sexo	Evolución lesión (días)	Área de lesión (cm <sup>2</sup> )	Amplificación PCR <i>hsp70</i>	Especie RFLP
GE-0411	1994	Petén	18	1	180	4	Positiva	<i>L. bra/L. nai</i>
GE-0413	1994	Petén	19	1	20	1.1	Negativo	NA
GE-0414	1994	Petén	10	1	15	2.34	Negativo	NA
GE-0422	1994	Petén	18	1	90	22	Positiva	<i>L. bra/L. nai</i>
GE-0426	1995	Petén	15	1	90	15.75	Positiva	<i>L. bra/L. nai</i>
GE-0429	1995	Izabal	41	1	40	8.75	Negativo	NA
GE-0431	1995	Petén	13	1	270	6.48	Positiva	<i>L. bra/L. nai</i>
GE-0448	1995	Petén	15	1	130	1.98	Negativo	NA
GE-0449	1995	Petén	25	1	2555	2.88	Positiva	<i>L. bra/L. nai</i>
GE-0454	1995	Petén	16	1	120	3.96	Positiva	<i>L. bra/L. nai</i>
GE-0477	1995	Petén	9	1	90	3.36	Positiva	<i>L. bra/L. nai</i>
GE-0482	1995	Petén	12	1	60	0.6	Positiva	<i>L. bra/L. nai</i>
GE-0501	1995	Petén	8	1	180	20.8	Negativo	NA
GE-0503	1995	Petén	10	1	30	16	Positiva	<i>L. bra/L. nai</i>
GE-0557	1997	Petén	18	1	300	8.4	Positiva	<i>L. bra/L. nai</i>
GE-0566	1997	Petén	14	1	90	2.7	Positiva	<i>L. bra/L. nai</i>
GE-0575	1998	Petén	18	2	60	3	Positiva	NA
GE-0581	1998	Petén	50	1	640	4.6	Negativo	NA
GE-0585	1998	Petén	64	1	45	17.5	Positiva	<i>L. bra/L. nai</i>
GE-0591	1998	Petén	18	1	30	12.48	Positiva	Posible infección mixta
GE-0609	1998	Baja Verapaz	42	1	90	7.28	Negativo	NA
GE-0610	1998	Petén	55	1	2555	5.76	Negativo	NA
GE-0619	1998	Petén	11	1	90	2.72	Positiva	<i>L. bra/L. nai</i>
GE-0637	1998	Petén	24	2	30	16.8	Negativo	NA
GE-0649	1998	Petén	22	1	120	4	Positiva	<i>L. bra/L. nai</i>
GE-0661	1998	Petén	12	1	22	8.32	Positiva	<i>L. bra/L. nai</i>
GE-0666	1998	Petén	26	1	60	17.5	Negativo	NA
GE-0682	1998	Petén	3	1	180	1.6	Negativo	NA
GE-0776	1998	Izabal	48	1	120	12.25	Positiva	<i>L. bra/L. nai</i>
GE-0883	1999	Alta Verapaz	36	1	30	3.6	Positiva	<i>L. bra/L. nai</i>
GE-0979	2000	Petén	26	1	90	3.06	Positiva	<i>L. bra/L. nai</i>
GE-1013	2000	Petén	24	1	152	25	Positiva	<i>L. bra/L. nai</i>
GE-1037	2000	Petén	25	1	365	25	Negativo	NA
GE-1071	2000	Petén	17	1	30	5	Negativo	NA
GE-1083	2000	Petén	32	1	120	6.27	Positiva	Posible infección mixta
GE-1088	2000	Alta Verapaz	26	1	120	8.61	Positiva	Posible infección mixta
GE-1091	2000	Petén	24	1	180	7.68	Negativo	NA
GE-1101	2000	Petén	34	1	90	7.5	Positiva	Posible infección mixta

ID	Año colecta	Departamento	Edad	Sexo	Evolución lesión (días)	Área de lesión (cm <sup>2</sup> )	Amplificación PCR <i>hsp70</i>	Especie RFLP
GE-1119	2000	Izabal	27	1	120	7.5	Negativo	NA
GE-1120	2000	Petén	18	1	120	3	Positiva	Indeterminada
GE-1142	2001	Petén	41	2	105	2.25	Negativo	NA
GE-1204	2001	Petén	15	1	20	1.5	Negativo	NA
GE-1228	2001	Petén	20	1	47	3	Positiva	<i>L. bra/L. nai</i>
GE-1273	2001	Petén	43	1	100	3.74	Positiva	<i>L. bra/L. nai</i>
GE-1282	2001	Petén	32	1	72	1.96	Negativo	NA
GE-1298	2001	Petén	17	1	72	5.06	Positiva	Posible infección mixta
GE-1303	2001	Petén	30	1	100	5	Negativo	NA
GE-1355	2001	Petén	21	1	275	21	Positiva	<i>L. bra/L. nai</i>
GE-1357	2002	Izabal	28	1	300	0.25	Negativo	NA
GE-1405	2002	Petén	11	2	105	15.3	Positiva	<i>L. bra/L. nai</i>
GE-1464	2002	Alta Verapaz	48	1	90	2.21	Negativo	NA
GE-1517	2002	Izabal	37	1	15	3	Negativo	NA
GE-1529	2002	Petén	57	1	90	12	Positiva	<i>L. bra/L. nai</i>
GE-1541	2002	Petén	39	1	68	6	Positiva	<i>L. bra/L. nai</i>
GE-1563	2002	Petén	16	1	90	6.9	Negativo	NA
GE-1624	2002	Baja Verapaz	29	1	90	8	Positiva	<i>L. bra/L. nai</i>
GE-1625	2002	Izabal	51	1	220	6	Negativo	NA
GE-1632	2002	Petén	19	1	286	20.25	Negativo	NA
GE-1680	2003	Izabal	35	1	108	8.1	Positiva	<i>L. bra/L. nai</i>
GE-1683	2003	Izabal	20	1	108	1.82	Positiva	<i>L. bra/L. nai</i>
GE-1752	2003	Petén	27	1	45	0.36	Positiva	<i>L. bra/L. nai</i>
GE-1756	2003	Alta Verapaz	20	1	45	2.89	Negativo	NA
GE-1757	2003	Alta Verapaz	22	1	35	15.75	Negativo	NA
GE-1799	2003	Petén	26	1	46	2.24	Negativo	NA
GE-2060	2005	Alta Verapaz	13	1	53	3.75	Negativo	NA
GE-2092	2005	Petén	56	1	58	12.87	Negativo	NA
GE-2100	2007	Petén	55	1	48	5.58	Positiva	<i>L. bra/L. nai</i>
GE-2148	2005	Petén	24	2	157	6	Negativo	NA
GE-2164	2005	Alta Verapaz	27	2	67	27.5	Negativo	NA
GE-2210	2005	Petén	18	1	89	9.9	Positiva	<i>L. bra/L. nai</i>
GE-2260	2005	Petén	16	1	180	19.25	Positiva	<i>L. bra/L. nai</i>
GE-2275	2006	Petén	13	1	100	1	Negativo	NA
GE-2309	2006	Petén	26	1		9.24	Negativo	NA
GE-2310	2006	Petén	22	1	90	1.5	Negativo	NA
GE-2323	2006	Petén	21	1	45	8.75	Positiva	<i>L. bra/L. nai</i>
GE-2368	2007	Petén	23	2	180	30.36	Positiva	Posible infección mixta
GE-2379	2007	Petén	62	1	210	22.05	Negativo	NA

ID	Año colecta	Departamento	Edad	Sexo	Evolución lesión (días)	Área de lesión (cm <sup>2</sup> )	Amplificación PCR <i>hsp70</i>	Especie RFLP
GE-2382	2007	Petén	44	2	365	5.76	Negativo	NA
GE-2404	2007	Petén	12	1	165	1.8	Negativo	NA
GE-2408	2007	Petén	23	1	75	1.68	Positiva	<i>L. bra/L. nai</i>
GE-2438	2007	Petén	29	1	47	19.35	Positiva	<i>L. bra/L. nai</i>
GE-2441	2007	Petén	17	1	163	24	Negativo	NA
GE-2447	2007	Petén	40	1	57	13.12	Positiva	<i>L. bra/L. nai</i>
GE-2466	2007	Petén	57	1	8760	12.96	Positiva	<i>L. bra/L. nai</i>
GE-2471	2007	Petén	13	2	214	5.94	Positiva	<i>L. bra/L. nai</i>
GE-2502	2008	Petén	15	1	39	9.84	Positiva	<i>L. bra/L. nai</i>
GE-2511	2008	Petén	11	2	65	2.85	Positiva	<i>L. bra/L. nai</i>
GE-2516	2008	Petén	16	1	124	7.54	Positiva	<i>L. bra/L. nai</i>
GE-2519	2008	Petén	27	1	99	4.8	Positiva	<i>L. bra/L. nai</i>
GE-2525	2008	Petén	13	1	165	2.88	Positiva	Posible infección mixta
GE-2543	2008	Petén	29	1	90	6.51	Positiva	<i>L. bra/L. nai</i>
GE-2553	2008	Petén	62	1	40	4.64	Positiva	<i>L. bra/L. nai</i>
GE-2562	2008	Petén	56	1	134	12.24	Negativo	NA
GE-2564	2008	Petén	28	1	89	3.84	Positiva	<i>L. bra/L. nai</i>
GE-2569	2008	Petén	55	2	83	0.6	Positiva	<i>L. bra/L. nai</i>
GE-2576	2008	Izabal	39	1	189	2.66	Positiva	<i>L. bra/L. nai</i>
GE-2585	2008	Petén	30	1	148	2.7	Negativo	NA
GE-2588	2008	Petén	30	1	43	2.73	Negativo	NA
GE-2591	2009	Petén	22	1	111	8.75	Positiva	Posible infección mixta
GE-2594	2009	Petén	19	2	40	15.3	Negativo	NA
GE-2595	2009	Petén	27	1	240	3	Positiva	<i>L. bra/L. nai</i>
GE-2602	2009	Izabal	61	1	13870	0	Positiva	Indeterminada
GE-2619	2010	Izabal	60	1	100	27.3	Positiva	<i>L. bra/L. nai</i>
GE-2631	2013	Alta Verapaz	24	1	42	7.5	Positiva	<i>L. bra/L. nai</i>
GE-2643	2015	Alta Verapaz	17	2	486	3.08	Negativo	NA
GE-2646	2015	Alta Verapaz	51	2	131	6.25	Negativo	NA
GE-2699	2016	Alta Verapaz	27	2	30	1.95	Positiva	<i>L. bra/L. nai</i>
GE-2700	2016	Alta Verapaz	17	1	90	6.9	Positiva	Posible infección mixta
GE-2704	2016	Alta Verapaz	24	1	30	5	Positiva	<i>L. bra/L. nai</i>
GE-2705	2016	Alta Verapaz	16	1	240	2.04	Positiva	<i>L. bra/L. nai</i>
GE-2706	2016	Alta Verapaz	33	2	1095	18.75	Positiva	<i>L. bra/L. nai</i>
GE-2708	2016	Alta Verapaz	20	1	30	4.5	Positiva	<i>L. bra/L. nai</i>
GE-2727	2017	Alta Verapaz	15	1	18	9.72	Positiva	<i>L. bra/L. nai</i>
GE-2732	2017	Alta Verapaz	13	1	287	4.93	Positiva	<i>L. bra/L. nai</i>

Nota: Sexo 1= Hombre, 2= Mujer

Anexo 4: Controles positivos empleados en el PCR del gen *hsp70* durante este estudio, proporcionados por el Centro Internacional de Entrenamiento e Investigaciones Médicas (CIDEIM) en Cali, Colombia.

<b>Control</b>	<b>Cepa</b>	<b>[ng/ul]</b>
<i>L. mexicana</i>	Bel21	38.43
<i>L. panamensis</i>	LS94	136.44
<i>L. guyanensis</i>	M4147	65.08
<i>L. braziliensis</i>	M2903	71.91

Anexo 5: Mezcla de reacción para el PCR del fragmento G del gen *hsp70* (Montalvo *et al.*, 2010).

<b>Componentes</b>	<b>Concentración inicial</b>	<b>Concentración final</b>	<b>Volumen</b>
Buffer	5x	1x	5 µL
MgCl <sub>2</sub>	15 mM	3 mM	Incluido en buffer
dNTPs	5 mM	1 mM	Incluido en buffer
Primer Sentido	20 µM	0.8 µM	1 µL
Primer Antisentido	20 µM	0.8 µM	1 µL
Solución Q	5x	1x	5 µL
Hot Start Taq ADN Polimerasa TONBO	5 U/ µL	1 U	0.1 µL
ADN	n/a	n/a	2 µL
ddH <sub>2</sub> O	n/a	Llevar a 25 µL	10.9 µL
<b>Volumen Total</b>	-----	-----	25 µL

Anexo 6: Mezcla de reacción para el PCR del fragmento N del gen *hsp70* (Montalvo *et al.*, 2012).

<b>Componentes</b>	<b>Concentración inicial</b>	<b>Concentración final</b>	<b>Volumen</b>
Buffer	5x	1x	5 µL
MgCl <sub>2</sub>	15 mM	3 mM	Incluido en buffer
dNTPs	5 mM	1 mM	Incluido en buffer
Primer Sentido	20 µM	0.8 µM	1 µL
Primer Antisentido	20 µM	0.8 µM	1 µL
Solución Q	5x	1x	5 µL
Hot Start Taq ADN Polimerasa TONBO	5 U/ µL	2 U	0.2 µL
ADN	n/a	n/a	4 µL
ddH <sub>2</sub> O	n/a	Llevar a 25 µL	8.8 µL
<b>Volumen Total</b>	-----	-----	25 µL

Anexo 7: Mezcla de reacción para el PCR del control interno (gen de B-globina humana) (Coutlée *et al.*, 2000).

<b>Componentes</b>	<b>Concentración inicial</b>	<b>Concentración final</b>	<b>Volumen</b>
Buffer	5x	1x	2 µL
MgCl <sub>2</sub>	15 mM	3 mM	Incluido en buffer
dNTPs	10 mM	0.2 mM	0.4 µL
Primer GH <sub>2</sub> O	10 µM	0.25 µM	0.5 µL
Primer PCO <sub>4</sub>	10 µM	0.25 µM	0.5 µL
Go Taq Polimerasa	5 U/ µL	1.25 U	0.25 µL
ADN	n/a	n/a	1 µL
ddH <sub>2</sub> O	n/a	Llevar a 25 µL	15.35 µL
<b>Volumen Total</b>	-----	-----	20 µL

Anexo 8: Mezcla de reacción de digestión de los amplicones para su análisis por RFLP (Fraga *et al.*, 2013; Montalvo *et al.*, 2012).

<b>Componentes (para 1 digestión)</b>	<b>Enzimas</b>			
	<b><i>HaeIII</i></b>		<b><i>BsaJI</i></b>	
	Concentración	Volumen a agregar	Concentración	Volumen a agregar
Agua	NA	12 µL	NA	12.6 µL
Buffer 10X	1X	2 µL	1X	2 µL
Enzima 10U/µL	10 U	1 µL	4U	0.4 µL
Producto PCR		5 µL		5 µL
Tiempo de incubación (horas)		3		3
Temperatura de incubación (°C)		37		60
<b>Volumen Final</b>		20 µL		20 µL

Anexo 9: Procedimientos normados de operación elaborados durante el desarrollo de esta investigación.

<p><b>Instituto de Investigaciones Centro de Estudios en Salud</b></p> <p><b>Laboratorio II2-304</b></p> 	<p><b>Procedimiento Normado de Operación</b></p>	<p><b>PNO: 5.01</b></p> <p><b>Versión: 1</b></p> <p><b>Fecha: 18/11/2018</b></p>
	<p><b>Extracción de ADN de <i>Leishmania</i> sp. a partir de láminas de lesiones cutáneas teñidas con Giemsa.</b></p>	<p><b>Páginas Totales: 3</b></p> <p><b>Autorizado:</b> <b>Renata de Cabrera</b></p> <p><b>Preparado por: Cristian Ruiz</b></p>

**1. Propósito:** Aislar el material genético de *Leishmania spp* de láminas con extendidos de lesiones cutáneas teñidas con Giemsa, para utilizarlo como plantilla para un PCR anidado que flanquea un segmento específico de un marcador molecular del género *Leishmania*.

**2. Aplicación:** Diagnóstica e investigación.

### 3. Referencias:

- 3.1. de Vries, H. J. C., Reedijk, S. H., & Schallig, H. D. F. H. (2015). Cutaneous Leishmaniasis: Recent Developments in Diagnosis and Management. *American Journal of Clinical Dermatology*, 16(2), 99–109. <https://doi.org/10.1007/s40257-015-0114-z>
- 3.2. Fraga, J., Veland, N., Montalvo, A. M., Praet, N., Boggild, A. K., Valencia, B. M., ... Van der Auwera, G. (2012). Accurate and rapid species typing from cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis lesions of the New World. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 74(2), 142–150. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2012.06.010>
- 3.3. Montalvo, A. M., Nodarse, J. F., Goodridge, I. M., Fidalgo, L. M., Marin, M., Van Der Auwera, G., ... Muskus, C. (2010). Differentiation of *Leishmania* (*Viannia*) *panamensis* and *Leishmania* (*V.*) *guyanensis* using BccI for hsp70 PCR-RFLP. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 104(5), 364–367. <https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2009.12.002>
- 3.4. Van der Auwera, G., Bart, A., Chicharro, C., Cortes, S., Davidsson, L., Di Muccio, T., ... Chiodini, P. L. (2016). Comparison of *Leishmania* typing results obtained from 16 European clinical laboratories in 2014. *Eurosurveillance*, 21(49), 1–11. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2016.21.49.30418>

### 4. Terminología y abreviaciones:

- 4.1. µL: microlitros
- 4.2. ml: mililitros
- 4.3. min.: Minutos
- 4.4. rpm: revoluciones por minuto
- 4.5. ADN: Ácido desoxirribonucleico
- 4.6. °C: Grados centígrados

**5. Principio:** La Leishmaniasis cutánea es una enfermedad que se caracteriza por provocar úlceras en la piel, las cuales son raspadas para tomar una muestra de tejido que contiene células del parásito *Leishmania* sp. Estas muestras son tomadas con fines tanto de diagnóstico como de investigación y se colocan en portaobjetos que posteriormente son teñidos con Giemsa para efectuar el diagnóstico por microscopía y finalmente, se almacenan en la base de referencia del Centro de Estudios de Salud (CES). Estas láminas pueden utilizarse para aislar ADN del parásito y utilizar este como punto de partida para otros ensayos moleculares como un PCR. Un kit de extracción de ADN basado en columnas de sílica nos permite obtener el ADN de este parásito de manera rápida y con un menor grado de contaminación que una extracción con otro procedimiento, como el método de Fenol-cloroformo.

**6. Documentos asociados:**

- 6.1. PNO #5.02: PCR anidado del marcador *hsp70* para la obtención del fragmento N de este gen
- 6.2. PNO #5.03: Electroforesis en geles de agarosa de productos de amplificación
- 6.3. PNO #5.04: Digestión de RFLP con productos de amplificación para el PCR-N del marcador *hsp70*
- 6.4. PNO #5.05: Electroforesis en geles de agarosa de productos de digestión de RFLP

**7. Seguridad:**

- 7.1. Revise el manual de la centrífuga antes de su uso.
- 7.2. Utilizar guantes para prevenir la contaminación entre muestras.
- 7.3. Manipular con cuidado la cuchilla del bisturí.

**8. Equipos, materiales y reactivos:**

- 8.1. Tubos de 1.5 mL estériles
- 8.2. Vórtex
- 8.3. Micro centrífuga
- 8.4. Agua DEPC (agua tratada con dietilpirocarbonato, un inactivador de ARNasas)
- 8.5. Cuchillas de bisturi estériles
- 8.6. Micropipeta de 10 a 100  $\mu$ L
- 8.7. Micropipeta de 100 a 1000  $\mu$ L
- 8.8. Kit comercial QIAamp® MinElute® Virus Spin Kit (Qiagen)
  - 8.8.1. Proteasa QIAGEN
  - 8.8.2. Buffer de lisis AL
  - 8.8.3. Columna QIAamp MinElute
  - 8.8.4. Tubos de colecta
  - 8.8.5. Buffer AW1
  - 8.8.6. Buffer AW2
  - 8.8.7. Buffer AVE
- 8.9. Etanol Absoluto
- 8.10. Puntas de 10 a 250  $\mu$ L estériles
- 8.11. Puntas de 1 a 10  $\mu$ L estériles
- 8.12. Puntas de 100 a 1000  $\mu$ L estériles
- 8.13. Bloque térmico
- 8.14. Gradillas
- 8.15. Muestras de extendidos de lesiones cutáneas teñidas con Giemsa.

**9. Procedimiento:**

- 9.1. Raspar con una cuchilla de bisturí el área del extendido y suspender el raspado en tubos de 1.5 mL con 200  $\mu$ L de agua DEPC.
- 9.2. Agregar 25  $\mu$ L de proteasa QIAGEN y luego 200  $\mu$ L de buffer de lisis AL. Mezclar en vórtex por 15 segundos e incubar a 56 °C durante 10 min.
- 9.3. Centrifugar brevemente los tubos y agregar 250  $\mu$ L de etanol absoluto y agitar con vórtex y centrifugar nuevamente.

- 9.4. Incubar a temperatura ambiente por cinco minutos y transferir la mezcla a una columna QIAamp MinElute (colocada en un tubo de colecta de 2.0 mL) y centrifugar a 8000 rpm durante un minuto.
- 9.5. Sacar los tubos de la centrifuga y agregar 500  $\mu$ L de buffer AW1 y centrifugar nuevamente (8000 rpm por un minuto). Cambiar el tubo de colecta de las columnas y añadir 500  $\mu$ L de AW2 y volver a centrifugar (8000 rpm por un minuto).
- 9.6. Cambiar nuevamente de tubo de colecta y agregar esta vez 500  $\mu$ L de etanol absoluto y repetir centrifugación (mismas condiciones). Transferir las columnas a nuevos tubos de colecta y centrifugar a 12,500 rpm durante tres minutos. Cambiar por última vez el tubo de colecta para incubar las columnas con la tapa abierta a 56 °C durante 15 minutos.
- 9.7. Finalmente, agregar 60  $\mu$ L de buffer AVE a la columna, incubar por un minuto y centrifugar a 12,500 rpm por otro minuto.
- 9.8. Almacenar los extractos a -80 °C hasta que el momento en que se vayan a utilizar.

#### **10. Control de calidad:**

- 10.1. Es posible comprobar la existencia del ADN extraído, midiéndolo con un espectrofotómetro.
- 10.2. Se puede corroborar la presencia del ADN luego de una electroforesis en geles de agarosa.

#### **11. Política de resolución de conflictos**

- 11.1. Si las mediciones del espectrofotómetro para el ADN extraído no generan resultados adecuados (menos de 0.5  $\mu$ g/mL) o que el PCR no genere un producto de amplificación visible, es recomendable diluir los extractos de manera que también se diluyan los posibles inhibidores de PCR que la extracción aún posea. Evalúe el rendimiento de la amplificación nuevamente.
- 11.2. Considerar que una electroforesis para evaluar la integridad del ADN extraído necesita una cantidad grande de muestra para ser visible (más de 5  $\mu$ L).

#### **12. Reporte de datos y documentos utilizados:**

- 12.1. El registro de las muestras se realiza desde su extracción de las cajas en las que están almacenadas, tanto en el cuaderno de laboratorio del analista como en hojas electrónicas de Excel. En caso de algún cambio o manipulación, debe mantenerse el número asignado a la muestra.
- 12.2. Cualquier proceso que involucre la manipulación de las muestras debe ser debidamente registrado en el cuaderno de trabajo del analista.

13. **Reporte:** El éxito de la metodología implementada se evalúa según la presencia o ausencia de un producto de PCR, utilizando *primers* específicos del marcador *hsp70*.

<p style="text-align: center;"><b>Instituto de Investigaciones</b> <b>Centro de Estudios en Salud</b></p> <p style="text-align: center;"><b>Laboratorio II2-304</b></p> 	<p><b>Procedimiento Normado de Operación</b></p>	<p><b>PNO: 5.02</b></p> <p><b>Versión: 2</b></p> <p><b>Fecha: 25/11/2018</b></p>
	<p><b>PCR anidado del marcador <i>hsp70</i> para la obtención del fragmento N de este gen</b></p>	<p><b>Páginas Totales: 5</b></p> <p><b>Autorizado:</b> <b>Renata de Cabrera</b> <b>Preparado por: Cristian Ruiz</b></p>

**1. Propósito:** Obtener un producto de amplificación utilizado una reacción en cadena de la polimerasa en su modalidad anidada para el fragmento N del gen *hsp70* de *Leishmania* sp. para poder identificar la especie del parásito causante de la infección por medio de la aplicación de enzimas de restricción para la detección de polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP).

**2. Aplicación:** Diagnóstica e investigación.

### 3. Referencias:

- 3.1. Fraga, J., A. M. Montalvo, S. De Doncker, J.-C. Dujardin, y G. Van der Auwera. 2010. Phylogeny of *Leishmania* species based on the heat-shock protein 70 gene. *Infection, Genetics and Evolution* 10: 238–245.
- 3.2. Garcia, L., Kindt, A., Bermudez, H., Llanos-cuentas, A., Doncker, S. De, Arevalo, J., ... Dujardin, J. (2004). Culture-Independent Species Typing of Neotropical. *Society*, 42(5), 2294–2297. <https://doi.org/10.1128/JCM.42.5.2294>
- 3.3. Montalvo, A. M., J. Fraga, L. Monzote, I. Montano, S. De Doncker, J. C. Dujardin, y G. Van der Auwera. 2010. Heat-shock protein 70 PCR-RFLP: a universal simple tool for *Leishmania* species discrimination in the New and Old World. *Parasitology* 137: 1159–1168.
- 3.4. Montalvo, A. M., Fraga, J., Maes, I., Dujardin, J.-C., & Van der Auwera, G. (2012). Three new sensitive and specific heat-shock protein 70 PCRs for global *Leishmania* species identification. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 31(7), 1453–1461. <https://doi.org/10.1007/s10096-011-1463-z>
- 3.5. Van der Auwera, G., C. Ravel, J. J. Verweij, A. Bart, G. Schonian, y I. Felger. 2014. Evaluation of Four Single-Locus Markers for *Leishmania* Species Discrimination by Sequencing. *Journal of Clinical Microbiology* 52: 1098–1104.

### 4. Terminología y abreviaciones:

- 4.1. mL: mililitros
- 4.2. µL: microlitros
- 4.3. Min.: Minutos
- 4.4. s.: Segundos
- 4.5. PCR: Reacción en cadena de la Polimerasa
- 4.6. ADN: Ácido desoxirribonucleico
- 4.7. dNTPs: desoxinucleótidos
- 4.8. MgCl<sub>2</sub>: Cloruro de magnesio
- 4.9. DEPC: dietilpirocarbonato, un inactivador de ARNasas
- 4.10. °C: Grados centígrados

**5. Principio:** Reacción enzimática de un fragmento de ADN (fragmento N de 593 bp) que es flanqueado por dos secuencias de oligonucleótidos (*primers*) que se unen a las hebras que son reconocidas según la secuencia blanco.

**6. Documentos asociados:**

- 6.1. PNO #5.01: Extracción de DNA a partir de láminas de lesiones cutáneas teñidas con Giemsa
- 6.2. PNO #5.03: Electroforesis en geles de agarosa de productos de amplificación
- 6.3. PNO #5.04: Digestión de RFLP con productos de amplificación para el PCR-N del marcador *hsp70*
- 6.4. PNO #5.05: Electroforesis en geles de agarosa de productos de digestión de RFLP.

**7. Seguridad:**

- 7.1. Utilizar guantes estériles para prevenir la contaminación entre muestras.
- 7.2. Utilizar una campana de flujo laminar (nivel de bioseguridad tipo II) para prevenir la contaminación de muestras.
- 7.3. Revisar el manual del termociclador antes de su uso.

**8. Equipos, materiales y reactivos:**

- 8.1. Microtubos de 1.5 mL estériles
- 8.2. Microtubos de 0.2 mL estériles
- 8.3. Micropipeta de 0.5 a 10  $\mu$ l
- 8.4. Micropipeta de 10 a 100  $\mu$ l
- 8.5. Micropipeta de 100 a 1000  $\mu$ l
- 8.6. Puntas de 0 a 15  $\mu$ l estériles
- 8.7. Puntas de 10 a 250  $\mu$ l estériles
- 8.8. Puntas de 100 a 1000  $\mu$ l estériles
- 8.9. Marcador Permanente
- 8.10. Recipiente para descarte de puntas
- 8.11. Etanol al 70% (v/v)
- 8.12. Buffer 5X TONBO PCR, que incluye 15 mM MgCl<sub>2</sub> y 5 mM dNTP's
- 8.13. Solución de trabajo 20 $\mu$ M *primers hsp70*:
  - 8.13.1. PCR inicial, primer sentido: HSP70-sen (5'-GACGGTGCCTGCCTACTTCAA-3')
  - 8.13.2. PCR inicial, primer antisentido: HSP70-ant (5'-CCGCCCATGCTCTGGTACATC-3')
  - 8.13.3. PCR-N Sentido: HSP70-F25 (5'-GGACGCCGGCACGATTKCT-3')
  - 8.13.4. PCR- N Antisentido: HSP70-R617 (5'-CGAAGAAGTCCGATACGAGGG-3');
- 8.14. Agua DEPC
- 8.15. Solución Q 5X
- 8.16. C++™ HotStart TONBO Taq Polimerasa 5U/ $\mu$ L
- 8.17. Gradilla para microtubos
- 8.18. Extractos de ADN extraído de las láminas de lesiones cutáneas
- 8.19. Control Positivo
  - 8.19.1. *L. braziliensis* (Cepa M2903, 71.91 ng/ $\mu$ L)
- 8.20. Servilletas de papel.
- 8.21. Campana de flujo laminar tipo II
- 8.22. Campana Tipo Gabinete
- 8.23. Termociclador (Eppendorf© Mastercycler Gradient)

**9. Procedimiento:**

- 9.1. Limpie la campana de extracción con etanol al 70% (v/v) y exponiéndola bajo luz UV por 15 min.
- 9.2. Prepare los reactivos para hacer la mezcla de reacción (máster mix) en un tubo de 1.5ml siguiendo la composición detallada en los Cuadros 1 y 2. El volumen total se multiplica por la cantidad de muestras de ADN y se le suman dos adicionales por potenciales pérdidas de volumen, para cada reactivo que se vaya a utilizar.

Cuadro 1: Mezcla de reacción para el PCR inicial (fragmento de 1422 bp) del gen *hsp70*.

Componentes	Concentración inicial	Concentración final	Volumen por reacción
Buffer	5x	1x	5 µL
MgCl <sub>2</sub>	15 mM	3 mM	Incluido en buffer
dNTPs	5 mM	1 mM	Incluido en buffer
Primer HSP70-sen	20 µM	0.8 µM	1 µL
Primer HSP70-ant	20 µM	0.8 µM	1 µL
Solución Q	5x	1x	5 µL
Hot Start Taq ADN Polimerasa TONBO	5U/ µL	1 U	0.1 µL
ADN extraído	n/a	n/a	2 µL
Agua DEPC	n/a	Llevar a 25 µL	10.9 µL
<b>Volumen Total</b>	-----	-----	25 µL

Cuadro 2: Mezcla de reacción para el PCR del fragmento N (593 bp) del gen *hsp70*.

Componentes	Concentración inicial	Concentración final	Volumen por reacción
Buffer	5x	1x	5 µL
MgCl <sub>2</sub>	15 mM	3 mM	Incluido en buffer
dNTPs	5 mM	1 mM	Incluido en buffer
Primer HSP70-F25	20 µM	0.8 µM	1 µL
Primer HSP70-R617	20 µM	0.8 µM	1 µL
Solución Q	5x	1x	5 µL
Hot Start Taq ADN Polimerasa TONBO	5U/ µL	2 U	0.2 µL
Producto del primer PCR	n/a	n/a	4 µL
Agua DEPC	n/a	Llevar a 25 µL	8.8 µL
<b>Volumen Total</b>	-----	-----	25 µL

- 9.3.** Es necesario incluir un control negativo y control positivo para cada reacción de amplificación.
- 9.3.1. Positivos de ADN de *Leishmania* (*Leishmania braziliensis* en este caso)
- 9.3.2. Positivo de Extracción (B-globina humana)
- 9.3.3. Negativo de Extracción
- 9.3.4. Negativo de PCR (mezcla de reacción sin ADN)
- 9.4.** Repartir el contenido del tubo de 1.5 mL en microtubos de 0.2 mL según la cantidad de reacciones que se hayan planificado.
- 9.5.** Agregar, por último, 2 µl del ADN extraído en cada microtubo que ha sido previamente rotulado en la campana Tipo Gabinete. En el caso del control negativo añadir 2 µl de agua DEPC a cada control, y para el control positivo 2 µl del control de *L. braziliensis*. En el caso del PCR del fragmento N, se utilizan 4 µl del producto de amplificación del primer PCR.
- 9.6.** Colocar los tubos dentro del termocilador, cerrarlo e iniciar el programa de amplificación que corresponda, con las especificaciones del Cuadro 3.

Cuadro 3: Condiciones de amplificación para los PCRs del del gen *hsp70*.

Pasos	Temperatura	Ciclos
Desnaturalización Inicial	5 min 95 °C	1
Desnaturalización	40 s a 94 °C	
Alineamiento	1 min a 61 °C	35
Elongación	1 min a 72 °C (2 min para el PCR-N)	
Elongación Final	10 min a 72 °C	1

- 9.7.** Guarde nuevamente las muestras y reactivos de PCR a -20 °C (muestras a -80 °C si no se van a utilizar frecuentemente).
- 9.8.** Desinfectar de nuevo el área de trabajo, utilizando etanol al 70%(v/v) y exponiendo la campana otros 15 min a radiación UV.
- 9.9.** Cuando el programa de amplificación concluya, saque los tubos y guárdelos a 4°C, hasta que estos vayan a ser utilizados.

## 10. Control de calidad:

- 10.1.** Para determinar el límite de detección de la metodología, se deben realizar algunos PCRs con diluciones del control positivos. Utilice diluciones del material genético (en factores de 10) para determinar cual es la dilución máxima con la que se obtiene un producto de amplificación positivo, en caso de que las cantidades establecidas en este procedimiento no funcionen.

## 11. Reporte de datos y documentos utilizados:

- 11.1.** El registro de las muestras se realiza desde su extracción de las cajas en las que están almacenadas, tanto en el cuaderno de laboratorio del analista como en hojas electrónicas de Excel. En caso de algún cambio o manipulación, debe mantenerse el número asignado a la muestra.
- 11.2.** Cualquier procedimiento en el que se necesite manipular las muestras debe ser debidamente registrado en el cuaderno de trabajo del analista.
- 11.3.** Los resultados de identificación correspondientes a cada muestra deben ser almacenados. Se debe de actualizar la base de datos destinada para el almacenamiento de esta información conforme se generen los resultados.

<p style="text-align: center;"><b>Instituto de Investigaciones</b></p> <p style="text-align: center;"><b>Centro de Estudios en Salud</b></p> <p style="text-align: center;"><b>Laboratorio de I12-304</b></p> 	<p><b>Procedimiento Normado de Operación</b></p>	<p><b>PNO: 5.03</b></p> <p><b>Versión: 1</b></p> <p><b>Fecha: 23/11/2018</b></p> <p><b>Páginas Totales: 3</b></p>
	<p><b>Electroforesis en geles de agarosa de productos de amplificación del PCR anidado del marcador <i>hsp70</i></b></p>	<p><b>Autorizado:</b></p> <p><b>Renata de Cabrera</b></p> <p><b>Preparado por: Cristian Ruiz</b></p>

1. **Propósito:** Comprobar la existencia de un producto de amplificación por medio de un PCR anidado del fragmento N del gen *hsp70* de *Leishmania* spp.

2. **Aplicación:** Diagnóstica e investigación

3. **Referencias:**

- 3.1. Sambrook, J., E. F. Fritsch, T. Maniatis, y otros. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Ed. 2. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- 3.2. Van der Auwera, G., C. Ravel, J. J. Verweij, A. Bart, G. Schonian, y I. Felger. 2014. Evaluation of Four Single-Locus Markers for *Leishmania* Species Discrimination by Sequencing. *Journal of Clinical Microbiology* 52: 1098–1104.
- 3.3. Van der Auwera, G., Maes, I., De Doncker, S., Ravel, C., Cnops, L., Van Esbroeck, M., ... Dujardin, J. C. (2013). Heat-shock protein 70 gene sequencing for leishmania species typing in european tropical infectious disease clinics. *Euro Surveillance*, 18(30), 1–9. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES2013.18.30.20543>
- 3.4. Veland, N., Boggild, A. K., Valencia, C., Valencia, B. M., Llanos-Cuentas, A., Van Der Auwera, G., ... Arevalo, J. (2012). *Leishmania* (Viannia) species identification on clinical samples from cutaneous leishmaniasis patients in Peru: Assessment of a molecular stepwise approach. *Journal of Clinical Microbiology*, 50(2), 495–498. <https://doi.org/10.1128/JCM.05061-11>

4. **Terminología y abreviaciones:**

- 4.1. mL: mililitros
- 4.2. µL: microlitros
- 4.3. % (p/v): porcentaje peso/volumen
- 4.4. g: gramos
- 4.5. min.: Minutos
- 4.6. TBE: Buffer Tris-Borato-EDTA
- 4.7. X: concentración
- 4.8. °C: grados centígrados
- 4.9. pb: Pares de bases
- 4.10. UV: luz ultravioleta
- 4.11. s: Segundos
- 4.12. PCR: Reacción en cadena de la polimerasa
- 4.13. ADN: Ácido desoxirribonucleico
- 4.14. °C: Grados centígrados
- 4.15. V: Voltios

5. **Principio:** Al exponer a un grupo de moléculas cargadas negativamente (como el ADN) a un campo eléctrico en el que la corriente viaja de un polo negativo a uno positivo, estas se mueven a través de la matriz en la que se encuentran y hacia el polo positivo del campo. La velocidad a la que estas se desplazan depende la relación entre su tamaño, carga y la naturaleza de los poros de la matriz en donde se encuentran.
6. **Documentos asociados:**
  - 6.1. PNO #5.01: Extracción de DNA de *Leishmania* sp. a partir de láminas de lesiones cutáneas teñidas con Giemsa
  - 6.2. PNO #5.02: PCR anidado del marcador *hsp70* para la obtención del fragmento N de este gen.
  - 6.3. PNO #5.04: Digestión de RFLP con productos de amplificación para el PCR-N del marcador *hsp70*
  - 6.4. PNO #5.05: Electroforesis en geles de agarosa de productos de digestión de RFLP.
7. **Seguridad:**
  - 7.1. Revise el manual de la cámara de electroforesis y su fuente de poder antes de su uso.
  - 7.2. Revise el manual del transiluminador y de la cámara fotográfica, antes de usarlos.
  - 7.3. Prevenir la exposición directa a luz ultravioleta sin poseer el equipo de protección adecuado.
8. **Equipos, materiales y reactivos:**
  - 8.1. Agarosa tipo I marca VWR
  - 8.2. Buffer TBE 10X (Invitrogen) diluído a 1X (89 mM Tris Base, 89 mM ácido bórico, 2 mM EDTA, pH 8.00-8.50)
  - 8.3. Colorante SYBR Safe, stock 10,000X en DMSO (Invitrogen)
  - 8.4. Buffer de carga púrpura 6X, (New England Biolabs)
  - 8.5. Marcador de peso molecular de 100 pb (Promega)
  - 8.6. Microondas
  - 8.7. Cámara de Electroforesis (Run One System)
  - 8.8. Fuente de Poder
  - 8.9. Transiluminador (Sistema PhotoDoc-It, marca UVP)
  - 8.10. Cámara fotográfica
  - 8.11. Micropipeta de 0.5 a 10  $\mu$ L
  - 8.12. Puntas de 0 a 15  $\mu$ L estériles
  - 8.13. Productos de restricción
  - 8.14. Descarte de puntas
  - 8.15. Gradilla
  - 8.16. Servilletas de papel
9. **Procedimiento:**
  - 9.1. Elaborar un gel agarosa al 1.5% (p/v), pesando 0.75 g de agarosa en 50 mL de buffer TBE 1X. Calentar en la mezcla en el microondas por intervalos de 25 segundos hasta que la solución se torne traslúcida. Dejar enfriar aproximadamente hasta 45 °C.
  - 9.2. Agregar 1.5  $\mu$ L del stock de SYBR Safe 10,000X, agitar, colocar en el molde del gel e insertar el peine que permitirá la formación de los pozos (17 pozos por carril).
  - 9.3. Dejar gelificar por aproximadamente 20-25 min.
  - 9.4. Retirar el peine y colocar el gel en una cámara de electroforesis que contenga buffer TBE 1X
  - 9.5. Cargar en el gel una mezcla de 3  $\mu$ L de la escalera de 100 pb y 1  $\mu$ L de buffer de corrida 6X.
  - 9.6. Cargar en los siguientes pozos una mezcla de 4  $\mu$ L del producto de restricción y 1  $\mu$ L de buffer de carga y cargar los 5  $\mu$ L de la mezcla final en cada uno de los pozos restantes, de acuerdo al mapa de carga que corresponda.
  - 9.7. Correr el gel a 100 V durante 30 min (17 V/cm)
  - 9.8. Apagar la fuente de poder y sacar el gel de su cámara.
  - 9.9. Colocar el gel dentro del transiluminador, visualizar los resultados obtenidos y tomar una fotografía.

- 9.10.** Anotar los resultados de la restricción (incluir la fotografía con sus respectivos rótulos) en el cuaderno de laboratorio designado y en su equivalente electrónico.
- 10. Control de calidad:**
- 10.1.** La banda correspondiente al producto de amplificación esperado debe tener un tamaño aproximado de 593 bp, lo cual puede ser revisado de forma aproximado con ayuda del marcador de peso molecular.
  - 10.2.** Debe visualizarse en el gel, la existencia de una única banda por cada muestra. En caso contrario, la muestra no puede ser utilizado, porque la presencia de más bandas indicaría el mal estado de esta.
- 11. Política de resolución de conflictos.**
- 11.1.** Si las bandas se ven muy tenues, puede aumentar la cantidad del ADN plantilla que utilizó en el PCR o agregar más productos de PCR en las digestiones enzimáticas para obtener mejores resultados.
  - 11.2.** En caso de que las bandas se visualicen difusas, use un peine con dientes más delgados o aumente la concentración de agarosa utilizada.
- 12. Reporte de datos y documentos utilizados:**
- 12.1.** Se anotan los identificadores de cada muestra, una vez ha sido elegida para su análisis o ingresada en el laboratorio, en el cuaderno de ingreso. En caso de un procedimiento que involucre la manipulación de la muestra, el identificador asignado debe mantenerse.
  - 12.2.** Cada proceso al que se exponga cada muestra debe ser reportado en el cuaderno de trabajo del analista.
  - 12.3.** Los resultados de la presencia de un producto de PCR para cada muestra deben ser registrados y almacenados junto con la fotografía del gel en un cuaderno seleccionado para dicha actividad. Además, constantemente debe de actualizarse la base de datos donde residirá esta información.
- 13. Reporte:** Se llevan a cabo informes frecuentemente donde se registra la presencia de un producto de PCR correspondiente a cada muestra. Esta información se presenta al final de la investigación en un documento tipo Tesis.

<p style="text-align: center;"><b>Instituto de Investigaciones</b></p> <p style="text-align: center;"><b>Centro de Estudios en Salud</b></p> <p style="text-align: center;"><b>Laboratorio de II2-304</b></p> 	<p><b>Procedimiento Normado de Operación</b></p>	<p><b>PNO: 5.04</b></p> <p><b>Versión: 1</b></p> <p><b>Fecha: 20/11/2018</b></p> <p><b>Páginas Totales: 3</b></p>
	<p><b>Digestión de RFLP con productos de amplificación para el PCR-N del marcador <i>hsp70</i></b></p>	<p><b>Autorizado:</b></p> <p><b>Renata de Cabrera</b></p> <p><b>Preparado por: Cristian Ruiz</b></p>

1. **Propósito:** Generar patrones de restricción para la identificación de especies de parásitos del género *Leishmania*, utilizando el marcador *hsp70*.

2. **Aplicación:** Diagnóstica e investigación.

3. **Referencias:**

- 3.1. Van der Auwera, G., C. Ravel, J. J. Verweij, A. Bart, G. Schonian, y I. Felger. 2014. Evaluation of Four Single-Locus Markers for Leishmania Species Discrimination by Sequencing. *Journal of Clinical Microbiology* 52: 1098–1104.
- 3.2. Montalvo, A. M., J. Fraga, L. Monzote, I. Montano, S. De Doncker, J. C. Dujardin, and G. Van der Auwera. 2010. Heat-shock protein 70 PCR-RFLP: a universal simple tool for Leishmania species discrimination in the New and Old World. *Parasitology* 137: 1159–1168.
- 3.3. da Silva, L. A., C. dos S. de Sousa, G. C. da Graça, R. Porrozzi, and E. Cupolillo. 2010. Sequence analysis and PCR-RFLP profiling of the *hsp70* gene as a valuable tool for identifying Leishmania species associated with human leishmaniasis in Brazil. *Infection, Genetics and Evolution* 10: 77–83.
- 3.4. Fraga, J., A. M. Montalvo, Ilse Maes, J.-C. Dujardin, and G. Van der Auwera. 2013. HindII and SduI digests of heat-shock protein 70 PCR for Leishmania typing. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 77: 245–247.
- 3.5. Montalvo, A. M., J. Fraga, I. Maes, J.-C. Dujardin, and G. Van der Auwera. 2012. Three new sensitive and specific heat-shock protein 70 PCRs for global Leishmania species identification. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* 31: 1453–1461.

4. **Terminología y abreviaciones:**

4.1. mL: mililitros

4.2. µL: microlitros

4.3. g: gramos

4.4. min.: Minutos

4.5. X: concentración

4.6. U: unidades de enzima

4.7. s.: Segundos

4.8. PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

4.9. ADN: Ácido desoxirribonucleico

4.10. °C: Grados centígrados

4.11. Isoesquizómeros: Enzimas de restricción que tienen una estructura proteica diferente, pero reconocen el mismo sitio de restricción.

5. **Principio:** Las enzimas de restricción son proteínas del tipo endonucleasa que tienen la capacidad de reconocer una secuencia de nucleótidos específica y realizar un corte en la secuencia de ADN en un sitio puntual (conocido como sitio de restricción). Por lo tanto, estas pueden ser utilizadas para detectar cambios en secuencias de ADN, lo que puede ser visualizado como conjuntos de distintos patrones formados por segmentos de ADN de longitudes variables. De esta manera, pueden ser utilizadas para llevar a cabo la identificación y discriminación de algunas especies de organismos.
6. **Documentos asociados:**
  - 6.1. PNO #5.01: Extracción de DNA de *Leishmania* sp. a partir de láminas de lesiones cutáneas teñidas con Giemsa
  - 6.2. PNO #5.02: PCR anidado del marcador *hsp70* para la obtención del fragmento N de este gen.
  - 6.3. PNO #5.03: Electroforesis en geles de agarosa de productos de amplificación
  - 6.4. PNO #5.05: Digestión de RFLP con productos de amplificación para el PCR-N del marcador *hsp70*
7. **Seguridad:**
  - 7.1. Lea el manual de los RFPL, incluyendo enzimas y sus buffers.
  - 7.2. Lea el manual de la incubadora o del termociclador
8. **Equipos, materiales y reactivos:**
  - 8.1. Incubadora o termociclador
  - 8.2. Microtubos de 0.5 mL
  - 8.3. Microtubos de 0.2 mL
  - 8.4. Centrífuga
  - 8.5. Micropipeta de 0.5 a 10  $\mu$ L
  - 8.6. Micropipeta de 10 a 100  $\mu$ L
  - 8.7. Puntas de 10  $\mu$ L y 100  $\mu$ L estériles
  - 8.8. Productos de amplificación (fragmentos N del gen *hsp70*)
  - 8.9. Descarte de puntas
  - 8.10. Gradilla
  - 8.11. Servilletas
  - 8.12. Enzimas de restricción, *Bsa*II, *Rsa*I, *Hind*III y *Bsp*1286I (*Sdu*I)
  - 8.13. Agua destilada estéril.
  - 8.14. Buffer de Digestión (Buffer CutSmart de New England Biolabs)
9. **Procedimiento:**
  - 9.1. Preparar una mezcla de digestión en un tubo de 0.5 mL para cada RFLP y luego haga alícuotas de 15  $\mu$ L en tubos de 0.2 mL (un tubo por cada reacción).
  - 9.2. Utilizar una concentración final de buffer de digestión de 1X para cada reacción.
  - 9.3. Añadir 4 U de cada enzima según el corte que se desee realizar.
  - 9.4. El resto del volumen restante será cubierto con agua destilada estéril.
  - 9.5. Agregar 5  $\mu$ L de cada producto de amplificación (fragmento N del gen *hsp70*) por reacción, para llegar al volumen final de 20  $\mu$ L por digestión.
  - 9.6. Mezclar y centrifugar brevemente.
  - 9.7. Incubar por 3 horas a 37 °C, excepto por la enzima *Bsa*II, cuya incubación debe realizarse a 55 °C.
  - 9.8. Mezclar nuevamente y centrifugar brevemente.
  - 9.9. Se utilizarán los cortes enzimáticos para diferenciar las siguientes especies: *Bsa*II  $\rightarrow$  *Rsa*I para diferenciar *Leishmania peruviana* de *L. braziliensis* y *L. naiffi*; *Bsa*II  $\rightarrow$  *Rsa*I  $\rightarrow$  *Bsp*1286I para diferenciar *L. braziliensis* de *L. naiffi*; *Bsa*II  $\rightarrow$  *Hind*III para diferenciar entre *L. mexicana* y *L. panamensis/L. guyanensis*).
  - 9.10. Guardar a 4 °C hasta su visualización en una electroforesis en gel de agarosa.

**10. Control de calidad:**

- 10.1.** Los patrones resultantes se comprobarán utilizando el PNO 5.05: Electroforesis en geles de agarosa de productos de digestión de RFLP.
- 10.2.** Se enviarán a secuenciar algunas de las muestras analizadas por RFLP para validar los resultados de esta metodología.

**11. Política de resolución de conflictos.**

- 11.1.** Si las diferencias entre los patrones son difíciles de visualizar, cambiar la concentración de la enzima o la cantidad de producto de amplificación agregado.
- 11.2.** Si se visualiza una digestión incompleta o la ausencia de fragmentos, dejar las reacciones de digestión durante toda la noche.

**12. Reporte de datos y documentos utilizados:**

- 12.1.** El registro de las muestras se realiza desde su extracción de las cajas en las que están almacenadas, tanto en el cuaderno de laboratorio del analista como en hojas electrónicas de Excel. En caso de algún cambio o manipulación, debe mantenerse el número asignado a la muestra.
- 12.2.** Cualquier proceso que involucre la manipulación de las muestras debe ser debidamente registrado en el cuaderno de trabajo del analista.
- 12.3.** Los patrones de restricción y resultados de identificación correspondientes a cada muestra deben ser almacenados, adjuntando la fotografía del gel y el mapa de carga realizado para cada grupo de muestras. Se debe de actualizar la base de datos destinada para el almacenamiento de esta información conforme se generen los resultados.

- 13. Reporte:** Se realizaron reportes constantemente sobre los resultados del análisis de cada muestra y la especie resultante que le corresponde. Además, se redacta documento tipo Tesis donde se expondrán todos los resultados.

<p style="text-align: center;"><b>Instituto de Investigaciones</b></p> <p style="text-align: center;"><b>Centro de Estudios en Salud</b></p> <p style="text-align: center;"><b>Laboratorio de I2-304</b></p> 	<p><b>Procedimiento Normado de Operación</b></p>	<p><b>PNO: 5.05</b></p> <p><b>Versión: 1</b></p> <p><b>Fecha: 20/11/2018</b></p> <p><b>Páginas Totales: 5</b></p>
	<p><b>Electroforesis en geles de agarosa de productos de digestión de RFLP.</b></p>	<p><b>Autorizado:</b></p> <p><b>Renata de Cabrera</b></p> <p><b>Preparado por: Cristian Ruiz</b></p>

**1. Propósito:** Visualizar los patrones de los productos de restricción (RFLP) del producto del PCR-N del gen *hsp70* de *Leishmania* spp.

**2. Aplicación:** Diagnóstica e investigación.

**3. Referencias:**

- 3.1. Sambrook, J., E. F. Fritsch, T. Maniatis, y otros. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Ed. 2. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- 3.2. Van der Auwera, G., C. Ravel, J. J. Verweij, A. Bart, G. Schonian, y I. Felger. 2014. Evaluation of Four Single-Locus Markers for Leishmania Species Discrimination by Sequencing. *Journal of Clinical Microbiology* 52: 1098–1104.
- 3.3. Montalvo, A. M., J. Fraga, L. Monzote, I. Montano, S. De Doncker, J. C. Dujardin, and G. Van der Auwera. 2010. Heat-shock protein 70 PCR-RFLP: a universal simple tool for Leishmania species discrimination in the New and Old World. *Parasitology* 137: 1159–1168.
- 3.4. da Silva, L. A., C. dos S. de Sousa, G. C. da Graça, R. Porrozzini, and E. Cupolillo. 2010. Sequence analysis and PCR-RFLP profiling of the *hsp70* gene as a valuable tool for identifying Leishmania species associated with human leishmaniasis in Brazil. *Infection, Genetics and Evolution* 10: 77–83.
- 3.5. Fraga, J., A. M. Montalvo, Ilse Maes, J.-C. Dujardin, and G. Van der Auwera. 2013. HindII and SduI digests of heat-shock protein 70 PCR for Leishmania typing. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 77: 245–247.
- 3.6. Montalvo, A. M., J. Fraga, I. Maes, J.-C. Dujardin, and G. Van der Auwera. 2012. Three new sensitive and specific heat-shock protein 70 PCRs for global Leishmania species identification. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* 31: 1453–1461.
- 3.7. Sanderson, B. A., Araki, N., Lilley, J. L., Guerrero, G., & Lewis, L. K. (2014). Modification of gel architecture and TBE/TAE buffer composition to minimize heating during agarose gel electrophoresis. *Analytical Biochemistry*, 454, 44–52. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2014.03.003.Modification>

**4. Terminología y abreviaciones:**

- 4.1. mL: mililitros
- 4.2. µL: microlitros
- 4.3. %(p/v): porcentaje peso/volumen
- 4.4. g: gramos
- 4.5. min.: Minutos
- 4.6. TBE: Buffer Tris-Borato-EDTA

- 4.7. X: concentración
  - 4.8. °C: Grados centígrados
  - 4.9. pb: Pares de bases
  - 4.10. UV: luz ultravioleta
  - 4.11. s: Segundos
  - 4.12. PCR: Reacción en cadena de la polimerasa
  - 4.13. ADN: Ácido desoxirribonucleico
  - 4.14. V: Voltios
5. **Principio:** Al exponer a un grupo de moléculas cargadas negativamente (como el ADN) a un campo eléctrico en el que la corriente viaja de un polo negativo a uno positivo, estas se mueven a través de la matriz en la que se encuentren, hacia el polo positivo. La velocidad a la que migran las moléculas en un tiempo establecido será diferente según su tamaño y su carga en relación a los poros de la matriz en la que se estén desplazando.
6. **Documentos asociados:**
- 6.1. PNO #5.01: Extracción de DNA de *Leishmania* sp. a partir de láminas de lesiones cutáneas teñidas con Giemsa
  - 6.2. PNO #5.02: PCR anidado del marcador *hsp70* para la obtención del fragmento N de este gen.
  - 6.3. PNO #5.03: Electroforesis en geles de agarosa de productos de amplificación del PCR anidado del marcador *hsp70*
  - 6.4. PNO #5.04: Digestión de RFLP con productos de amplificación para el PCR-N del marcador *hsp70*
7. **Seguridad:**
- 7.1. Revise el manual de la cámara de electroforesis y su fuente de poder antes de su uso.
  - 7.2. Revise el manual del transiluminador y de la cámara fotográfica, antes de usarlos.
  - 7.3. Prevenir la exposición directa a luz ultravioleta sin poseer el equipo de protección adecuado.
8. **Equipos, materiales y reactivos:**
- 8.1. Agarosa tipo I marca VWR
  - 8.2. Buffer TBE 10X (Invitrogen) diluído a 0.5X (45 mM Tris Base, 45 mM ácido bórico, 1 mM EDTA, pH 8.00-8.50)
  - 8.3. Colorante SYBR Safe, stock 10,000X en DMSO (Invitrogen)
  - 8.4. Buffer de carga púrpura 6X, (New England Biolabs)
  - 8.5. Marcador de peso molecular de 100 pb (Promega)
  - 8.6. Microondas
  - 8.7. Cámara de Electroforesis (Thermo Scientific)
  - 8.8. Fuente de Poder
  - 8.9. Transiluminador (Sistema PhotoDoc-It, marca UVP)
  - 8.10. Cámara fotográfica
  - 8.11. Micropipeta de 0.5 a 10 µL
  - 8.12. Puntas de 0 a 15 µL estériles
  - 8.13. Productos de restricción
  - 8.14. Descarte de puntas
  - 8.15. Gradilla
  - 8.16. Servilletas de papel
9. **Procedimiento:**
- 9.1. Elaborar un gel agarosa al 3% (p/v), pesando 3.0 g de agarosa en 100 mL de buffer TBE 0.5X. Calentar en la mezcla en el microondas por intervalos de 25 segundos hasta que la solución se torne traslúcida. Dejar enfriar aproximadamente hasta 50 °C.

- 9.2. Agregar 3  $\mu$ L del stock de SYBR Safe 10,000X, agitar, colocar en el molde del gel e insertar el peine que permitirá la formación de los pozos (12 pozos por carril).
- 9.3. Dejar gelificar por aproximadamente 20-25 min.
- 9.4. Retirar el peine y colocar el gel en una cámara de electroforesis que contenga buffer TBE 0.5X
- 9.5. Cargar en el gel una mezcla de 3  $\mu$ L de la escalera de 100pb y 1  $\mu$ L de buffer de corrida 6X.
- 9.6. Cargar en los siguientes pozos una mezcla de 10  $\mu$ L del producto de restricción y 1  $\mu$ L de buffer de carga y cargar 10  $\mu$ L de la mezcla final en cada uno de los pozos restantes, de acuerdo al mapa de carga que corresponda.
- 9.7. Correr el gel a 50 V durante 3 horas (6.25 V/cm)
- 9.8. Apagar la fuente de poder y sacar el gel de su cámara.
- 9.9. Colocar el gel dentro del transiluminador, visualizar los resultados obtenidos y tomar una fotografía.
- 9.10. Anotar los resultados de la restricción (incluir la fotografía con sus respectivos rótulos) en el cuaderno de laboratorio designado y en su equivalente electrónico.
- 9.11. Comparar los patrones obtenidos con los reportados por otros estudios, los cuales se visualizan en la Figura 1.

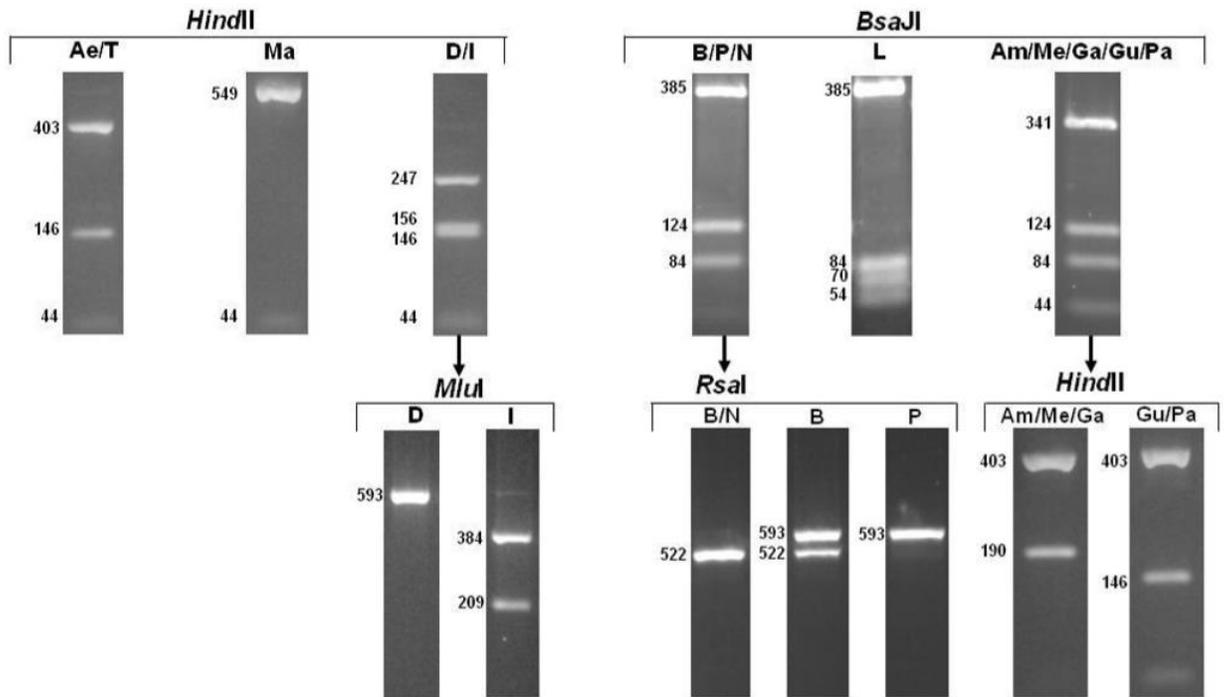


Figura 1: Patrones electroforéticos resultantes al utilizar enzimas de restricción para identificación de especies de *Leishmania* spp. **Ae:** *L. aethiopica*; **T:** *L. tropica*; **Ma:** *L. major*; **D:** *L. donovani*; **I:** *L. infantum*; **B:** *L. braziliensis*; **P:** *L. peruviana*; **N:** *L. naiffi*; **L:** *L. lainsoni*; **Am:** *L. amazonensis*; **Me:** *L. mexicana*; **G:** *L. garhnamii*; **Gu:** *L. guyanensis*; **Pa:** *L. panamensis*; **a-B:** *L. braziliensis* atípica

## 10. Control de calidad:

- 10.1. Los patrones de bandas deben parecerse a los patrones que se encuentran en la Figura 1.
- 10.2. No debe evidenciarse la presencia de bandas con un tamaño mayor al del fragmento digerido originalmente (593 bp), en caso contrario, sería un caso de contaminación y la muestra no puede ser utilizada.

**11. Política de resolución de conflictos.**

- 11.1. Si luego de la electroforesis, las bandas no se distinguen entre sí, se debe de dejar corriendo por más tiempo.
- 11.2. En el caso de que las bandas sean poco definidas, utilice un peine con dientes más delgados o aumente el porcentaje de agarosa empleado.

**12. Reporte de datos y documentos utilizados:**

- 12.1. Se anotan los identificadores de cada muestra, una vez ha sido elegida para su análisis o ingresada en el laboratorio, en el cuaderno de ingreso. En caso de un procedimiento que involucre la manipulación de la muestra, el identificador asignado debe mantenerse.
- 12.2. Cada proceso al que se exponga cada muestra debe ser reportado en el cuaderno de trabajo del analista.
- 12.3. Los patrones de restricción y la especie determinada para cada muestra deben ser registrados y almacenados junto con la fotografía del gel en un cuaderno seleccionado para dicha actividad. Además, constantemente debe de actualizarse la base de datos donde residirá esta información.

**13. Reporte:** Se llevan a cabo informes frecuentemente donde se registra la especie correspondiente a cada muestra. Esta información se presenta al final de la investigación en un documento tipo Tesis.

Anexo 10: Secuencias consenso generadas y analizadas durante esta investigación

Muestra GA-1172

GCGGCGGCCATCGCGTACGGCCTGGACAAGGGGGAGGACGGCAAGGAGCGCAACGTGCTGATCTTTGACCTCGGGGGCGGCACGTTTGATGTGACGCTGCTGACGATCGAGGGGGGCATCTTCGAGGTGAAGGCGACGAACGGTGACACGCACCTCGGCGGCGAGGGCTTTGACACCCGCCTCGTACGTTTTTCAGCGAGGAGTTCAAGCGCAAGAACAAGGGTAAGGACCTTTGACGAGCCACCGCGACTGCGCCGTGTGCGCACGGCGTGCGAGCGCGGAAGCGCACGCTGTCGTCCGCGACGAGGCGAGATCGACGCGCTGTTGACAACGTCGACTTCCAGGCCAACATCACGCGCGCGCTTCGAGGAGCTGTGCGGCGACCTGTTCCGCGAGCACAATGCAGCCGGTGGAGCGCGCGTGCAAGACCGAAGATGGACAAGCGCTCCGTGCACGACGTGGTGCTGGTGGGCGGCTCGACGATCCCGAAGGTGCA

Muestra GE-078

GATGCTGGCCTGGAGGTGCTGCGCATCATCAACGAGCCAACAGCGGCGGCCATCGCGTACGGCCTGGACAAGGGCGACGACGGCAAGGAGCGCAACGTGCTGATCTTTGACCTTGGCGGCGGACGTTTGATGTGACGCTGCTGACGATCGACGGCGGCATCTTCGAGGTGAAGGCGACGAACGGTGACACGCACCTCGGCGGCGAGGACTTTGACAACCGCCTCGTCACGTTCTTCAGCGAGGAGTTCAAGCGCAAGAACAAGGGTAAGGACCTTTGACGAGCCACCGCGCACTGCGCCGTCTGCGCACGGCGTGCGAGCGCGGAAGCGCACGCTGTCGTCCGCGACGCAGGCGACGATCGAGATCGACGCGCTGTTGACAACGTCGACTTCCAGGCCAACATCACGCGCGCGGCTTCGAGGAGCTGTGCGCGACCTGTTCCGCGAGCACAATGCAGCCGGTGGAGCGCGTGCTGCAGGACGCGAAGATGGACAAGCGCTCCGTGCACGACGTGGTGCTGGTGGGCGGGTCTAATCACATCCCGAAGGTGCAGGCCCTGTAC

Muestra GE-216

ATTCTGGCCCGGAGGTGCTGCGCATCATCAACGAGCCAACAGCGGCGGCCATCGCGTACGGCCTGGACAAGGGCGACGACGGCAAGGAGCGCAACGTGCTGATCTTTGACCTTGGCGGTGGCACGTTTGATGTGACGCTGCTGACGATCGACGGCGGCATCTTCGAGGTGAAGGCGACGAACGGTGAACACGCACCTCGGCGGCGAGGACTTTGACAACCGCCTCGTCACGTTCTTCAGCGAGGAGTTCAAGCGCAAGAACAAGGGTAAGGACCTTTGACGAGCCACCGCGCACTGCGCCGTCTGCGCACGGCGTGCGAGCGCGGAAGCGCACGCTGTCGTCCGCGACGCAGGCGACGATCGAGATCGACGCGCTGTTGACAACGTCGACTTCCAGGCCAACATCACGCGCGCGGCTTCGAGGAGCTGTGCGCGACCTGTTCCGCGAGCACAATGCAGCCGGTGGAGCGCGTGCTGCAGGACGCGAAGATGGACAAGCGCTCCGTGCACGACGTGGTGCTCGTGGGCGGGCTCGACTCGCATCCCGAAGGTCCAGTCCCTGTATGGAC

Muestra GE-189 (Número de accesoión: MN520464)

CCTGAGGTGCTGCGCATCATCAACGAGCCAACAGCGGCGGCCATCGCGTACGGCCTGGACAAGGGCGACGACGGCAAGGAGCGCAACGTGCTGATCTTTGACCTTGGCGGCGGCACGTTTGATGTGACGCTGCTGACGATCGACGGCGGCATCTTCGAGGTGAAGGCGACGAACGGTGACACGCACCTTGGCGGCGAGGACTTTGACAACCGCCTCGTCACGTTCTTCAGCGAGGAGTTCAAGCGCAAGAACAAGGGTAAGGACCTTTGACGAGCCACCGCGCACTGCGCCGTCTGCGCACGGCGTGCGAGCGCGAAGCGCACGCTGTCGTCCGCGACGCAGGCGACGATCGAGATCGACGCGCTGTTGACAACGTTCCAGGCCAACATCACGCGCGCGGCTTCGAGGAGCTGTGCGGCGACCTGTTCCGCGAGCACAATGCAGCCGGTGGAGCGCGTGCTGCAGGACGCGAAGATGGACAAGCGCTCCGTGCACGACGTGGTGCTGGTGGGCGGGCTCGACTCACATCCCGAAGGTGCAGTCCC

Muestra GE-1166 (Número de accesoión: MN520465)

CCTGGAGGTGCTGCGCATCATCAACGAGCCAACAGCGGCGGCCATCGCGTACGGCCTGGACA  
AGGGCGACGACGGCAAGGAGCGCAACGTGCTGATCTTTGACCTTGGCGGGCGGCACGTTTGAT  
GTGACGCTGCTGACGATCGACGGCGGCATCTTCGAGGTGAAGGCGACGAACGGTGACACGCA  
CCTTGGCGGGGAGGACTTTGACAACCGCCTCGTCACGTTCTTCAGCGAGGAGTTCAAGCGCAA  
GAACAAGGGTAAGGACCTTTTCGACGAGCCACCGCGCACTGCGCCGTCTGCGCACGGCGTGCG  
AGCGCGGAAGCGCACGCTGTCGTCCGCGACGCAGGCAACGATCGAGATCGACGCGCTGTTT  
GACAACGTGACTTCCAGGCCAACATCACGCGCGCGCGCTTCGAGGAGCTGTGCGGGCGACCT  
GTTCCGCGAGCACAAATGCAGCCGGTGGAGCGCGTGCTGCAGGACGCGAAGATGGACAAGCGCT  
CCGTGCACGACGTGGTGCTGGTGGGCGGGTCGACGCGCATCCCGAAGGTGCAGTCCC

Muestra GE-100

GGCCTGGAGGTGCTGCGCATCATCAACGAGCCAACAGCGGCGGCCATCGCGTACGGCCTGGA  
CAAGGGCGACGACGGCAAGGAGCGCAACGTGCTGATCTTTGACCTTGGCGGGCGGCACGTTTG  
ATGTGACGCTGCTGACGATCGACGGCGGCATCTTCGAGGTGAAGGCGACGAACGGTGACACG  
CACCTCGGCGGGGAGGACTTTGACAACCGCCTCGTCACGTTCTTCAGCGAGGAGTTCAAGCGC  
AAGAACAAGGGTAAGGACCTTTTCGACGAGCCACCGCGCACTGCGCCGTCTGCGCACGGCGTG  
CGAGCGCGGAAGCGCACGCTGTCGTCCGCGACGCAGGCGACGATCGAGATCGACGCGCTGT  
TCGACAACGTGACTTCCAGGCCAACATCACGCGCGCGCGCTTCGAGGAGCTGTGCGGGCGAC  
CTGTTCCGCGAGCACAAATGCAGCCGGTGGAGCGCGTGCTGCAGGACGCGAAGATGGACAAGCG  
CTCCGTGCACGACGTGGTGCTGGTGGGCGGGTCGACGCGCATCCCGAAGGTGCAGTCCCTCGT  
AC

Muestra GE-118 (Número de accesoión: MN520466)

CCAAGAGGTGCTGCGCATCATCAACGAGCCAACAGCGGCGGCCATCGCGTACGGCCTGGACA  
AGGGCGACGACGGCAAGGAGCGCAACGTGTTTATCTTCGACCTTGGCGGGCGGCACGTTTCGAT  
GTGACGCTGCTGACGATCGACGGCGGCATCTTCGAGGTGAAGGCGACGAACGGTGACACGCA  
CCTTGGCGGGGAGGACTTTGACAACCGCCTCGTCACGTTCTTCACCGAGGAGTTCAAGCGCAA  
GAACAAGGGTAAGGACCTTTTCGTCGAGCCACCGCGCGCTGCGCCGCTGCGCACGGCGTGCG  
AGCGCGGAAGCGCACGCTGTCGTCCGCGACGCAGGCGACGATCGAGATCGACGCGCTGTTT  
GACAACGTGACTTCCAGGCCAACATCACGCGCGCGCGCTTCGAGGAGCTGTGCGGGCGACCT  
GTTCCGCGAGCACAAATGCAGCCGGTGGAGCGCGTGCTGCAGGACGCGAAGATGGACAAGCGCT  
CCGTGCACGACGTGGTGCTGGTGGG

Muestra GE-162 (Número de accesoión: MN520467)

GGAGGTGCTGCGCATCATCAACGAGCCAACAGCGGCGGCCATCGCGTACGGCCTGGACAAGG  
GCGACGACGGCAAGGAGCGCAACGTGCTGATCTTTGACCTTGGCGGGCGGCACGTTTGATGTG  
ACGCTGCTGACGATCGACGGCGGCATCTTCGAGGTGAAGGCGACGAACGGTGACACGCACCT  
TGGCGGGGAGGACTTTGACAACCGCCTCGTCACGTTCTTCAGCGAGGAGTTCAAGCGCAAGA  
ACAAGGGTAAGGACCTTTTCGACGAGCCACCGCGCACTGCGCCGTCTGCGCACGGCGTGCGAG  
CGCGCGAAGCGCACGCTGTCGTCCGCGACGCAGGCGACGATCGAGATCGACGCGCTGTTT  
CAACGTGACTTCCAGGCCAACATCACGCGCGCGCGCTTCGAGGAGCTGTGCGGGCGACCTGTT  
CCGCGAGCACAAATGCAGCCGGTGGAGCGCGTGCTGCAGGGCGCGAAGATGGACAAGCGCTCCG  
TGCACGACGTGGTGCTGGTGGG

Muestra GA-1174 (Número de accesoión: MN520468)

GGAGGTGCTGCGCATCATCAACGAGCCAACAGCGGGCGGCCATCGCGTACGGCCTGGACAAGG  
GCGACGACGGCAAGGAGCGCAACGTGCTGATCTTTGACCTTGGCGGCGGCACGTTTGTATGTG  
ACGCTGCTGACGATCGACGGCGGCATCTTCGAGGTGAAGGCGACGAACGGTGACACGCACCT  
TGGCGGCGAGGACTTTGACAACCGCCTCGTACGTTCTTCAGCGAGGAGTTCAAGCGCAAGA  
ACAAGGGTAAGGACCTTTCGACGAGCCACCGCGCACTGCGCCGTCTGCGCACGGCGTGCGAG  
CGCGCGAAGCGCACGCTGTCGTCCGCGACGCAGGCGACGATCGAGATCGACGCGCTGTTTCA  
CAACGTCCACTTCCAGGCCAACATCACGCGCGCGCGCTTCGAGGAGCTGTGCGGGCGACCTGTT  
CCGCAGCACAATGCAGCCGGTGGAGCGCGTGCTGCAGGACGCGAAGATGGACAAGCGCTCCG  
TGCACGACGTGGTGCT

Muestra GE-422 (Número de accesoión: MN520469)

GGAGGTGCTGCGCATCATCAACGAGCCAACAGCGGGCGGCCATCGCGTACGGCCTGGACAAGG  
GCGACGACGGCAAGGAGCGCAACGTGCTGATCTTTGACCTTGGCGGCGGCACGTTTGTATGTG  
ACGCTGCTGACGATCGACGGCGGCATCTTCGAGGTGAAGGCGACGAACGGTGACACGCACCT  
TGGCGGCGAGGACTTTGACAACCGCCTCGTACGTTCTTCAGCGAGGAGTTCAAGCGCAAGA  
ACAAGGGTAAGGACCTTTCGACGAGCCACCGCGCACTGCGCCGTCTGCGCACGGCGTGCGAG  
CGCGCGAAGCGCACGCTGTCGTCCGCGACGCAGGCGACGATCGAGATCGACGCGCTGTTTCA  
CAACGTCCACTTCCAGGCCAACATCACGCGCGCGCGCTTCGAGGAGCTGTGCGGGCGACCTGTT  
CCGCAGCACAATGCAGCCGGTGGAGCGCGTGCTGCAGGACGCGAAGATGGACAAGCGCTCCG  
TGCACGACGTGGTGCT

Muestra GA-973 (Número de accesoión: MN520470)

GGAGGTGCTGCGCATCATCAACGAGCCAACAGCGGGCGGCCATCGCGTACGGCCTGGACAAGG  
GCGACGACGGCAAGGAGCGCAACGTGCTGATCTTTGACCTTGGCGGCGGCACGTTTGTATGTG  
ACGCTGCTGACGATCGACGGCGGCATCTTCGAGGTGAAGGCGACGAACGGTGACACGCACCT  
TGGCGGCGAGGACTTTGACAACCGCCTCGTACGTTCTTCAGCGAGGAGTTCAAGCGCAAGA  
ACAAGGGTAAGGACCTTTCGACGAGCCACCGCGCACTGCGCCGTCTGCGCACGGCGTGCGAG  
CGCGCGAAGCGCACGCTGTCGTCCGCGACGCAGGCGACGATCGAGATCGACGCGCTGTTTCA  
CAACGTTCGACTTCCAGGCCAACATCACGCGCGCGCGCTTCGAGGAGCTGTGCGGGCGACCTGTT  
CCGCAGCACAATGCAACCGGTGGAGCGCGTGCTGCAGGACGCGAAGATGGACAAGCGCTCCG  
TGCACGACGTGGTGCTGGTGGGCGGGTTCGACGCGCATCCCGAAGGT

Muestra GE-293

GGCCTGGAGGTGCTGCGCATCATCAACGAGCCAACAGCGGGCGGCCATCGCGTACGGCCTGGGA  
CAAGGGCGACGACGGCAAGGAGCGCAACGTGCTGATCTTTGACCTTGGCGGCGGCACGTTTGT  
ATGTGACGCTGCTGACGATCGACGGCGGCATCTTCGAGGTGAAGGCGACGAACGGTGACACG  
CACCTCGGCGGCGAGGACTTTGACAACCGCCTCGTACGTTCTTCAGCGAGGAGTTCAAGCGC  
AGAACAAGGGTAAGGACCTTTCGACGAGCCACCGCGCACTGCGCCGTCTGCGCACGGCGTG  
CGAGCGCGCGAAGCGCACGCTGTCGTCCGCGACGCAGGCGACGATCGAGATCGACGCGCTGT  
TCGACAACGTTCGACTTCCAGGCCAACATCACGCGCGCGCGCTTCGAGGAGCTGTGCGGGCGAC  
CTGTTCCGCAGCACAATGCAGCCGGTGGAGCGCGTGCTGCAGGACGCGAAGATGGACAAGCG  
CTCCGTGCACGACGTGGTGCTCGTGGGCGGGTTCGACACACATCCCGAAGGTGCAGTCCCTCGT  
ACGA

Muestra GE-649 (Número de accesoión: MN520471)

GGTGCTGCGCATCATCAACGAGCCAACAGCGGGCCATCGCGTACGGCCTGGACAAGGGCG  
ACGACGGCAAGGAGCGCAACGTGCTGATCTTTGACCTTGGCGGGCACGTTTGATGTGACGG  
TGCTGACGATCGACGGCGGCATCTTCGAGGTGAAGGGCAGAACGGTGACACGCACCTTGGC  
GGCGAGGACTTTGACAACCGCCTCGTCACGTTCTTCAGCGAGGAGTTCAAGCGCAAGAACAA  
GGGTAAGGACCTTTGACGAGCCACCGCGCACTGCGCCGTCTGCGCACGGCGTGCGAGCGCG  
CGAAGCGCACGCTGTCTCCGCGACGCAGGCAACGATCGAGATCGACGGCTGTTTCGACAAC  
GTCCACTTCCAGGCCAACATCACGCGCGCGCTTCGAGGAGCTGTGCGGGCACCTGTTCCGC  
AGCACAATGCAGCCGGTGGAGCGCGTGTGCAGGACGCGAAGATGGACAAGCGCTCCGTGCA  
CGACGTGGTGCTGGTGGGCGGGTC

Muestra GE-295 (Número de accesoión: MN520472)

TGGCCGGGAGGTGCTGCGCATCATCAACGAGCCAACAGCGGGCCATCGCGTACGGCCTGG  
ACAAGGGCGACGACGGCAAGGAGCGCAACGTGCTGATCTTTGACCTTGGCGGGCACGTTT  
GATGTGACGCTGCTGACGATCGACGGCGGCATCTTCGAGGTGAAGGGCAGAACGGTGACAC  
GCACCTTGGCGGGCAGGACTTTGACAACCGCCTCGTCACGTTCTTCAGCGAGGAGTTCAAGCG  
CAAGAACAAGGGTAAGGACCTTTGACGAGCCACCGCGCACTGCGCCGTCTGCGCACGGCGT  
GCGAGCGCGCAAGCGCACGCTGTCTCCGCGACGCAGGCGACGATCGAGATCGACGGCTG  
TTCGACAACGTCGACTTCCAGGCCAACATCACGCGCGCGCTTCGAGGAGCTGTGCGGGCAC  
CTGTTCCGCAGCACAATGCAGCCGGTGGAGCGCGTGTGCAGGACGCGAAGATGGACAAGCG  
CTCCGTGCACGACGTGGTGCTGGTGGGCGGGTCGAC

Muestra GE-591

CCGATTCTGGCCTAGAGGTGCTGCGCATCATCAACGAGCCAACAGCGGGCCATCGCGTAC  
GGCCTGGACAAGGGCGACGACGGCAAGGAGCGCAACGTGCTCATCTTTGACCTTGGCGGGCG  
CACGTTTGATGTGACGCTGCTGACGATCGACGGCGGCATCTTCGAGGTGAAGGGCAGAACG  
GTGACACGCACCTCGGCGGGCAGGACTTTGACAACCGCCTCGTCACGTTCTTCAGCGAGGAGT  
TCAAGCGCAAGAACAAGGGTAAGGACCTTTGCTCGAGCCACCGCGCGCTGCGCCGCTGCGC  
ACGGCGTGCGAGCGCGCAAGCGCACGCTGTCTCCGCGACGCAGGCGACGATCGAGATCGA  
CGCGCTGTTTCGACAACGTCGACTTCCAGGCCAACATCACGCGCGCGCTTCGAAGAGAGCTG  
TGCGAGCGACCTGTTCCGCAGCACAATGCAGCCGAGTGAGAGCGCGTGTGCAGAACGCGAA  
GGATGAACAAGCGCTCCGTGCACGACGTGGTGGGCGGGCTCTACACACATCCCGAAGGTGCA  
GTCCCTCGTATGGA

Muestra GE-306 (Número de accesoión: MN520473)

GGTGCTGCGCATCATCAACGAGCCAACAGCGGGCCATCGCGTACGGCCTGGACAAGGGCG  
ACGACGGCAAGGAGCGCAACGTGCTGATCTTTGACCTTGGCGGGCACGTTTGATGTGACGG  
TGCTGACGATCGACGGCGGCATCTTCGAGGTGAAGGGCAGAACGGTGACACGCACCTTGGC  
GGCGAGGACTTTGACAACCGCCTCGTCACGTTCTTCAGCGAGGAGTTCAAGCGCAAGAACAA  
GGGTAAGGACCTTTGACGAGCCACCGCGCACTGCGCCGTCTGCGCACGGCGTGCGAGCGCG  
CGAAGCGCACGCTGTCTCCGCGACGCAGGCGACGATCGAGATCGACGGCTGTTTCGACAAC  
GTCCACTTCCAGGCCAACATCACGCGCGCGCTTCGAGGAGCTGTGCGGGCACCTGTTCCGC  
AGCACAATGCAGCCGGTGGAGCGCGTGTGCAGGACGCGAAGATGGACAAGCGCTCCGTGCA  
CGACGTGGTGCTGGTGGG

Muestra GE-2619

TCGCGTACGGCCTGGACAAGGGCGACGACGGCAGGAGCGCAACGTGCTGATCTTTGACCTTG  
GCGGCGGCACGTTTGTATGTGACGCTGCTGACGATCGACGGCGGCATCTTCGAGGTGAAGGCG  
ACGAACGGTGACACGCACCTTGGCGGGGAGGACTTTGACAACCGCCTCGTCACGTTCTTCAGC  
GAGGAGTTCAAGCGCAAGAACAAGGGTAAGGACCTTTTCGACGAGCCACCGCGCACTGCGCCG  
TCTGCGCACGGCGTGCGAGCGCGGAAGCGCACGCTGTCGTCCGCGACGCACGCGACGATCG  
AGATCGACGCGCTGTTTCGACAACGTCCACTTCCAGGCCAACATCACGCGCGCGCTTCGAGG  
AGCTGCGCGGCACCTGTTCCGCAACACAGTGCACCCTGTGGAGCGCGCGCTGCGAGACGCG  
AACATAGACAAGCGCTCCGTGCACGACGTGGCGCTTGTGGGCGGCTCGACGCACATCCCAA  
GGTGCACTCTTGTATG

Muestra GE-367 (Número de accesión: MN520474)

GGAGGTGCTGCGCATCATCAACGAGCCAACAGCGGGCGGCCATCGCGTACGGCCTGGACAAGG  
GCGACGACGGCAAGGAGCGCAACGTGCTGATCTTTGACCTTGGGGGCGGCACGTTTGTATGTG  
ACGCTGCTGACGATCGACGGCGGCATCTTCGAGGTGAAGGCGACGAACGGTGACACGCACCT  
TGGCGGGCAGGACTTTGACAACCGCCTCGTCACGTTCTTCAGCGAGGAGTTCAAGCGCAAGA  
ACAAGGGTAAGGACCTTTTCGACGAGCCACCGCGCACTGCGCCGTCTGCGCACGGCGTGCGAG  
CGCGCAAGCGCACGCTGTCGTCCGCGACGCAGGCGACGATCGAGATCGACGCGCTGTTTCGA  
CAACGTCCACTTCCAGGCCAACATCACGCGCGCGCTTCGAGGAGCTGTGCGGGCAGCTGTT  
CCGCAGCACAATGCAGCCGGTGGAGCGCGTGCTGCAGGACGCGAAGATGGACAAGCGCTCCG  
TGCACGACGTGGTGCTGGT

Muestra GE-290 (Número de accesión: MN520475)

GGAGGTGCTGCGCATCATCAACGAGCCAACAGCGGGCGGCCATCGCGTACGGCCTGGACAAGG  
GCGACGACGGCAAGGAGCGCAACGTGCTGATCTTTGACCTTGGCGGGCGGCACGTTTGTATGTG  
ACGCTGCTGACGATCGACGGCGGCATCTTCGAGGTGAAGGCGACGAACGGTGACACGCACCT  
TGGCGGGCAGGACTTTGACAACCGCCTCGTCACGTTCTTCAGCGAGGAGTTCAAGCGCAAGA  
ACAAGGGTAAGGACCTTTTCGACGAGCCACCGCGCACTGCGCCGTCTGCGCACGGCGTGCGAG  
CGCGCAAGCGCACGCTGTCGTCCGCGACGCAGGCGACGATCGAGATCGACGCGCTGTTTCGA  
CAACGTGCACTTCCAGGCCAACATCACGCGCGCGCTTCGAGGAGCTGTGCGGGCAGCTGTT  
CCGCAGCACAATGCAGCCGGTGGAGCGCGTGCTGCAGGACGCGAAGATGGACAAGCGCTCCG  
TGCACGACGTGGTGCTGGTGGGCGGGTTCGACGCGCATCCC

Muestra GE-2699

CGGGGCAGAAGTGTCCCGGAGATGTTGTGCATATTATTAGAGACACAAGAGGGGGGCATAGC  
GTACGCCGCGGACAAGAGGGAGGAGGGCAAGAAGAGCAACGTGTGGATATTTGACCTCGGG  
GGGGGCGCGTGTGAGGTGAGGCTGTGGTGGATATAGGGGGGAATATTTGAGATGAGGGGGCG  
GAGAGCGGACACGCGCCTCGGGGGGAGAGGTCTGACACACGCGTCTTGTCTGTTTTTTAGAG  
AGGAGAGCTAGAGCGAGAGCACGGTAAGAGCCCTTTGAGGAGACCCCGCGCGCTGTGCGGT  
GTGTGCGCGGGGTGCGAGAGCGCGAAGAGCGCGCGGTGTTGTGCGAGGCGGGGAGGATAG  
AGATATAGGCGCTGTTTGGAGAAAGTGGAGTTTCAGAGGAACATATCGCGCGCGCTTCGAG  
GAGCTGTGCGGCGACCTGTTCCGCGACACAATGCAGCCGGTGGAGCGCGTGCTGCAGGACGC  
GAAGATGGACAAGCGCTCCGTGCACGACGTGGCTCTTGTGCGCGGCTCCACGCGCACCCCAA  
GTGCACACCCC

Muestra GE-2595

GGCCCCGAAGGTGCTGCCGCATCATCAAACGAGCCAACAGACCGGGCGGCCAATCGCGTACGG  
CCTGGACAAGGGCGACGACGGCAAGGAGCGCAACGTGCTGATCTTTGACCTTGGCGGGCGGA  
CGTTTGATGTGACGCTGCTGACGATCGACGGCGGCATCTTCGAGGTGAAGGCGACGAACGGT  
GACACGCACCTTGGCGGGCAGGACTTTGACAACCGCCTCGTCACGTTCTTCAGCGAGGAGTTC  
AAGCGCAAGAACAAGGGTAAGGACCTTTCGACGAGCCACCGCGCACTGCGCCGACTGCGCAC  
GGCGTGCGAGCGCGGAAGCGCACGCTGTCGTCCGCGACGCAGGCGACGATCGAGATCGACG  
CGCTGTTTCGACAACGTCGACTTCCAGGCCAACATCACGCGCGCGCGCTTCGAGGAGCTGTGCG  
GCGACCTGTTCCGCAGCACAATGCAGCCGGTGGAGCGCGTGCCGCAGGACGCGAAGATGGAC  
AAGCGCTCCGTGCACGACGTGGTGCTGGTGGGCGGGCTCGACGCGCATCCCCGAAGGTGCAGT  
CCCTCGTACGGA

Muestra GE-2705

GCGGGCGCCATCGCGTACGGCCTGGACAAGGGCGACGACGGCAAGGAGCGCAACGTGCTGAT  
CTTTGACCTTGGCGGGCGCACGTTTGATGTGACGCTGCTGACGATCGACGGCGGCATCTTCGA  
GGTGAAGGCGACGAACGGTGACACGCACCTGGGCGGGCAGGACTTTGACAACCGCCTCGTCA  
CGTTCTTCAGCGAGGAGTTCAAGCGCAAGAACAAGGGTAAGGACCTTTCGACGAGCCACCGC  
GCACTGCGCCGTCTGCGCACGGCGTGCGAGCGCGGAAGCGCACGCTGTCGTCCGCGACGCA  
GGCGACGATCGAGATCGACGCGCTGTTTCGACAACGTCGACTTCCAGGCCAACATCACGCGCG  
CGCGCTTCGAGGAGCTGTGCGGGACCTGTTCCGCAGCACAATGCAGCCGGTGGAGCGCGTG  
CTGCAGGACGCGAAGATGGACAAGCGCTCCGTGCACGACGTGGTGCTGGTGGGCGGGTTCGAC  
GCACATCCCCGAAGGTGCAGGCCCTCGTACGG

Muestra GE-2706 (Número de accesión: MN520476)

TGGCCCCGAGGTGCTGCGCATCATCAACGAGCCAACAGCGGGCGGCCATCGCGTACGGCCTGG  
ACAAGGGCGACGACGGCAAGGAGCGCAACGTGCTGATCTTTGACCTTGGCGGGCGGCACGTTT  
GATGTGACGCTGCTGACGATCGACGGCGGCATCTTCGAGGTGAAGGCGACGAACGGTGACAC  
GCACCTTGGCGGGCAGGACTTTGACAACCGCCTCGTCACGTTCTTCAGCGAGGAGTTCAAGCG  
CAAGAACAAGGGTAAGGACCTTTCGACGAGCCACCGCGCACTGCGCCGTCTGCGCACGGCGT  
GCGAGCGCGGAAGCGCACGCTGTCGTCCGCGACGCAGGCGACGATCGAGATCGACGCGCTG  
TTCGACAACGTCGACTTCCAGGCCAACATCACGCGCGCGCGCTTCGAGGAGCTGTGCGGGCAG  
CTGTTCCGCAGCACAATGCAGCCGGTGGAGCGCGTGCTGCAGGACGCGAAGATGGACAAGCG  
CTCCGTGCACGACGTGGTGCTGGTGGGCGGGTTCGAC

Muestra GE-280 (Número de accesión: MN520477)

TGGCCTGGAGGCGCTGCGCATCATCAACGAGCCAACAGCGGGCGGCCATCTCGTACGGCCTGG  
ACAAGGGCGACGACGGCAAGGAGCGCAACGTGCTGATCTTTGACCTTGGCGGGCGGCACGTTT  
GATGTGACGCTGCTGACGATCGACGGCGGCATCTTCGAGGTGAAGGCGACGAACGGTGACAC  
GCACCTTGGCGGGCAGGACTTTGACAACCGCCTCGTCACGTTCTTCAGCGAGGAGTTCAAGCG  
CAAGAACAAGGGTAAGGACCTTTCGACGAGCCACCGCGCACTGCGCCGTCTGCGCACGGCGT  
GCGAGCGCGGAAGCGCACGCTGTCGTCCGCGACGCAGGCGACGATCGAGATCGACGCGCTG  
TTCGACAACGTCGACTTCCAGGCCAACATCACGCGCGCGCGCTTCGAGGAGCTGTGCGGGGA  
CCTGTTCCGCAGCACAATGCAGCCGGTGGAGCGCGTGCTGCAGGACGCGAAGATGGACAAGC  
GCTCCGTGCACGACGTGGTGCTGG



Muestra GE-2543

GCTGGCCCGGAGGTGGCTGCGGCATTCATCAAACGAGCCAAAAGGCGGCGGGCCATCGGC  
GTACGGCCCTGGACAAGAGGCGACGACCGGCAAGGAGCGCAACGTGCTGATCTTTGACCTTG  
GCGGCGGCACGTTTTGATGTGACGCTGCTGACGATCGACGGCGGCATCTTCGAGGTGAAGGCG  
ACGAACGGTGACACGCACCTCGGCGGGGAGGACTTTGACAACCGCCTCGTCACGTTCTTCAGC  
GAGGAGTTCAAGCGCAAGAACAAGGGTAAGGACCTTTCGACGAGCCACCGCGCACTGCGCCG  
TCTGCGCACGGCGTGCGAGCGCGCAAGCGCACGCTGTCGTCCGCGACGCAGGCGACGATCG  
AGATCGACGCGCTGTTGACAACGTGACTTCCAGGCCAACATCACGCGCGCGCGCTTCGAGG  
AGCTGTGCGGCGACCTGTTCCGCGAGCACAATGCAGCCGGTGGAGCGCGTGCTGCAGGACGCG  
AAGATGGACAAGCGCTCCGTGCACGACGTGCTGCTGG

Muestra GE-454 (Número de accesión: MN520481)

GCTGCGCATCATCAACGAGCCAACAGCGGCGGCCATCGCGTACGGCCTGGACAAGGGCGACG  
ACGGCAAGGAGCGCAACGTGCTGATCTTTGACCTTGCGGGCGGCACGTTTGATGTGACGCTGC  
TGACGATCGACGGCGGCATCTTCGAGGTGAAGGCGACGAACGGTGACACGCACCTTGCGGGC  
GAGGACTTTGACAACCGCCTCGTCACGTTCTTCAGCGAGGAGTTCAAGCGCAAGAACAAGGG  
TAAGGACCTTTCGACGAGCCACCGCGCACTGCGCCGTCTGCGCACGGCGTGCGAGCGCGCGA  
AGCGCACGCTGTCGTCCGCGACGCACGCAACGATCGAGATCGACGCGCTGTTGACAACGTC  
CACTTCCAGGCCAACATCACGCGCGCGCGCTTCGAGGAGCTGTGCGGCGACCTGTTCCGCGAG  
ACAATGCAGCCGGTGGAGCGCGTGCTGCAGGACGCGAAGATGGACAAGCGCTCCGTGCACGA  
CGTGGTGCTGGTGG

Muestra GE-2447 (Número de accesión: MN520482)

TGGCCCGGAGGTGCTGCGCATCATCAACGAGCCAACAGCGGCGGCCATCGCGTACGGCCTGG  
ACAAGGGCGACGACGGCAAGGAGCGCAACGTGCTGATCTTTGACCTTGCGGGCGGCACGTTT  
GATGTGACGCTGCTGACGATCGACGGCGGCATCTTCGAGGTGAAGGCGACGAACGGTGACAC  
GCACCTTGCGGGCGAGGACTTTGACAACCGCCTCGTCACGTTCTTCAGCGAGGAGTTCAAGCG  
CAAGAACAAGGGTAAGGACCTTTCGACGAGCCACCGCGCACTGCGCCGTCTGCGCACGGCGT  
GCGAGCGCGCAAGCGCACGCTGTCGTCCGCGACGCAGGCGACGATCGAGATCGACGCGCTG  
TTCGACAACGTGACTTCCAGGCCAACATCACGCGCGCGCGCTTCGAGGAGCTGTGCGGCGAC  
CTGTTCCGCGAGCACAATGCAGCCGGTGGAGCGCGTGCTGCAGGACGCGAAGATGGACAAGCG  
CTCCGTGCACGACGTGGTGCTGGTGGGCGGGTC

Muestra GE-2602

GCTGGCCTGGAGGTGCTGCGCATCATCAACGAGCCAACAGCGGCGGCCATCGCGTACGGCCT  
GGACAAGGGCGACGACGGCAAGGAGCGCAACGTGCTGATCTTTGACCTTGCGGGCGGCACGTT  
TTGATGTGACGCTGCTGACGATCGACGGCGGCATCTTCGAGGTGAAGGCGACGAACGGTGAC  
ACGCACCTTGCGGGCGAGGACTTTGACAACCGCCTCGTCACGTTCTTCAGCGAGGAGTTCAAG  
CGCAAGAACAAGGGTAAGGACCTTTCGACGAGCCACCGCGCACTGCGCCGTCTGCGCACGGC  
GTGCGAGCGCGCAAGCGCACGCTGTCGTCCGCGGCGCAGGCGACGATCGAGATCGACGCGC  
TGTTGACAACGTGACTTCCAGGCCAACATCACGCGCGCGCGCTTCGAGGAGCTGTGCGGCG  
ACCTGTTCCGCGAGCACAATGCAGCCGGTGG

Muestra GE-271

CGATTGCTGGCCTAGAGGTGCTGCGCATCATCAACGAGCCAACAGCGGGCCATCGCGTAC  
GGCCTGGACAAGGGCGACGACGGCAAGGAGCGCAACGTGCTGATCTTTGACCTTGGCGGCGG  
CACGTTTGATGTGACGCTGCTGACGATCGACGGCGGCATCTTCGAGGTGAAGGCGACGAACG  
GTGACACGCACCTTGGCGGCGAGGACTTTGACAACCGCCTCGTCACGTTCTTCAGCGAGGAGT  
TCAAGCGCAAGAACAAGGGTAAGGACCTTTCGTGAGCCACCGCGCGCTGCGCCGCCTGCGC  
ACGGCGTGCGAGCGCGCAAGCGCACGCTGTCTGTCGACGACGAGGCGACGATCGAGATCGA  
CGCGCTGTTGACAACGTCGACTTCCAGGCCAACATCACGCGCGCGCTTCGAGGAGCTGTG  
CGGCGACCTGTTCCGCAGCACAAATGCAGCCGGTGGGAGGCGGCGTGTGACGGGACGGCGG  
AAGGATGGACAAGGCGGCTCCGTGCACGGACGGGCGGGTCGACGCGCATCCCGAAGGTGCAG  
TCCCTCGTTCG

Muestra GE-095

GTGCTCATCTTCGACCTTGGCGGCGGCACGTTGATGTGACGCTGCTGACGATCGACGGCGGC  
ATCTTCGAGGTGAAGGCGACGAACGGTGACACGCACCTTGGCGGCGAGGACTTTGACAACCG  
CCTCGTCACGTTCTTCACCGAGGAGTTCAAGCGCAAGAACAAGGGTAAGGACCTTTCGTGAG  
CCACCGCGCGCTGCGCCGCCTGCGCACGGCGTGCGAGCGCGCAAGCGCACGCTGTCTGTCG  
CGACGCAGGCGACGATCGAGATCGACGCGCTGTTGACAACGTCGACTTCCAGGCCAACATC  
ACGCGCGCGCGCTTCGAGGAGCTGTGCGGGACCTGTTCCGCAGCACAAATGCAGCCGGTGA  
GCGCGTGTGACGAGCGCAAGATGGACAAGCGCTCCGTGCACGGCGTGGTGTGTTGGGCG  
GGTCGACGCGCATCCCGAAGGTGCAGTCCCTCG

Muestra GE-1088

GCGTACGGCCTGGACAAGGGCGACGACGGCAGGAGCGCAACGTGCTGATCTTTGACCTTGGC  
GGCGGCACGTTTGATGTGACGCTGCTGACGATCGACGGCGGCATCTTCGAGGTGAAGGCGAC  
GAACGGTGACACGCACCTTGGCGGCGAGGACTTTGACAACCGCCTCGTCACGTTCTTCAGCGA  
GGAGTTCAAGCGCAAGAACAAGGGTAAGGACCTTTCGACGAGCCACCGCGCACTGCGCCGTC  
TGCGCACGGCGTGCGAGCGCGCAAGCGCACGCTGTCTGTCGACGAGGCGACGATCGAG  
ATCGACGCGCTGTTGACAACGTCGACTTCCAGGCCAACATCACGCGCGCGCTTCGAGGAG  
CTGTGCGGGACCTGTTCCGCAGCACAGTGCACCCTGTGGAGCGCGTGTGCAAGACGCGAA  
GATAGACAAGCGCTCCGTGCACGACGTGGTGTGTTGGGCGGGTCGACGCGCATCCCGAATG  
TGCACTTCTCGTC

Muestra GE-222

AGATTGCTGGCCTAGAGGTGCTGCGCATCATCAACGAGCCAACAGCGGGCCATCGCGTAC  
GGCCTGGACAAGGGCGACGACGGCAAGGAGCGCAACGTGCTCATCTTTGACCTTGGCGGCGG  
CACGTTTCGATGTGACGCTGCTGACGATCGACGGCGGCATCTTCGAGGTGAAGGCGACGAACG  
GTGACACGCACCTTGGCGGCGAGGACTTTGACAACCGCCTCGTCACGTTCTTCACCGAGGAGT  
TCAAGCGCAAGAACAAGGGTAAGGACCTTTCGTGAGCCACCGCGCGCTGCGCCGCCTGCGC  
ACGGCGTGCGAGCGCGCAAGCGCACGCTGTCTGTCGACGACGAGGCGACGATCGAGATCGA  
CGCGCTGTTGACAACGTCGACTTCCAGGCCAACATCACGCGCGCGCTTCGAGGAGCTGTG  
CGGCGACCTGTTCCGCAGCACAAATGCAGCCGGTGAAGCGCGTGTGACGGACGCGAAGATGA  
ACAAGCGGCTCCGTGCACGGACGGTGTGTTGGGCGGGTCGACGCGCATCCCGAAGGTGCAG  
TCCCTCGTA

Anexo 11: Alineamiento de las secuencias consenso analizadas durante esta investigación

GE-2543	-----GCTGGCCCGGAGGTGGCTGCGGCATT--CATCAAACGAGCCAAAAGGCGGG	52
GE-271	-CGATTGCTGGCCTAGAGGTGC-----TGCGCATCATCAACGAGCCAAACAGCGGC	49
GA-1172	-ACATTGCTGGCCCGGAGGTGCTGCGC-----ATCATCAACGAGCCAAACAGCGGC	49
GE-591	-CCGATTCTGGCCTAGAGGTGCTGCGCAT-----CATCAACGAGCCAAACAGCGGC	49
GE-2595	-CCGATTCTGGCCCGGAGGTGCTGCGCATCAAAACGAGCCAAACAGACCGGG	55
GE-2602	--CGTTGCTGGCCTGGAGGTGCTGCGCATCA-----TCAACGAGCCAAACAGCGGC	48
GE-095	---GATGCTGGCCTAGAGGTGCTGCGCATCATCAAACGAGGCCAAACAGGGGCGAGCGGC	57
GE-222	-AGATTGCTGGCCTAGAGGTGCTGCGCATCATC-----AACGAGCCAAACAGCGGC	49
GE-118	-ACATTGCTGGCCAAGAGGTGCTGCGCATCATC-----AACGAGCCAAACAGCGGC	49
GE-216	----ATTCTGGCCCGGAGGTGCTGCGCATCATC-----AACGAGCCAAACAGCGGC	46
GE-2732	GGCCGATCTGGCCCGGAGGTGCTGCGCATCATC-----AACGAGCCAAACAGCGGC	50
GE-306	---CATGCTGGCCCGGAGGTGCTGCGCATCATC-----AACGAGCCAAACAGCGGC	47
GE-2705	--CGATTCTGGCCTGGAGGTGCTGCGCATCATC-----AACGAGCC-AAAGCGGC	47
GE-280	-CCGATGCTGGCCTGGAGGCGCTGCGCATCATC-----AACGAGCCAAACAGCGGC	49
GA-973	-CCGATGCTGGCCCGGAGGTGCTGCGCATCATC-----AACGAGCCAAACAGCGGC	49
GE-078	---GATGCTGGCCTGGAGGTGCTGCGCATCATC-----AACGAGCCAAACAGCGGC	47
GE-295	----GTGCTGGCCCGGAGGTGCTGCGCATCATC-----AACGAGCCAAACAGCGGC	46
GE-367	CAGATTGCTGGCCCGGAGGTGCTGCGCATCATC-----AACGAGCCAAACAGCGGC	50
GE-2447	--GATTGCTGGCCCGGAGGTGCTGCGCATCATC-----AACGAGCCAAACAGCGGC	48
GE-2706	-CACATTGCTGGCCCGGAGGTGCTGCGCATCATC-----AACGAGCCAAACAGCGGC	49
GE-189	-CCGATTCTGGCCTGGAGGTGCTGCGCATCATC-----AACGAGCCAAACAGCGGC	49
GE-1166	----ATCTGGCCTGGAGGTGCTGCGCATCATC-----AACGAGCCAAACAGCGGC	45
GE-293	--CGATTCTGGCCTGGAGGTGCTGCGCATCATC-----AACGAGCCAAACAGCGGC	48
GE-290	-CCGATGCTGGCCCGGAGGTGCTGCGCATCATC-----AACGAGCCAAACAGCGGC	49
GE-258	-CAGATGCTGGCCTGGAGGTGCTGCGCATCATC-----AACGAGCCAAACAGCGGC	49
GE-162	-CCGATGCTGGCCTGGAGGTGCTGCGCATCATC-----AACGAGCCAAACAGCGGC	49
GE-2708	--CCGATGCTGGCCTGGAGGTGCTGCGCATCATC-----AACGAGCCAAACAGCGGC	48
GE-649	---CGATCTGGCCCGGAGGTGCTGCGCATCATC-----AACGAGCCAAACAGCGGC	47
GA-1174	-CAGATGCTGGCCCGGAGGTGCTGCGCATCATC-----AACGAGCCAAACAGCGGC	49
GE-1273	----ATCTGGCCCGGAGGTGCTGCGCATCATC-----AACGAGCCAAACAGCGGC	45
GE-454	---GATTCTGGCCTGGAGGTGCTGCGCATCATC-----AACGAGCCAAACAGCGGC	47
GE-100	-CCGATTCTGGCCTGGAGGTGCTGCGCATCATC-----AACGAGCCAAACAGCGGC	49
GE-422	-----TGGCCTGGAGGTGCTGCGCATCATC-----AACGAGCCAAACAGCGGC	42
	***** * * *	
GE-2543	GGCCATCGCGTACGGCCCTGGACAAGAGGCGACGACCGGCCAAGGAGCGCAACGTGCTGA	112
GE-271	GGC-CATCGC--GTACGGCCTGGACAAGGGCGACGACGGCAAGGAGCGCAACGTGCTGA	105
GA-1172	GGC-CATCGC--GTACGGCCTGGACAAGGGGAGGACGGCAAGGAGCGCAACGTGCTGA	105
GE-591	GGC-CATCGC--GTACGGCCTGGACAAGGGCGACGACGGCAAGGAGCGCAACGTGCTGA	105
GE-2595	GCC-AAATCGC--GTACGGCCTGGACAAGGGCGACGACGGCAAGGAGCGCAACGTGCTGA	111
GE-2602	GGC-CATCGC--GTACGGCCTGGACAAGGGCGACGACGGCAAGGAGCGCAACGTGCTGA	104
GE-095	GGC-CATCGC--GTACGGCCTGGACAAGGGCGACGACG-GCAGGAGCGCAACGTGCTGA	112
GE-222	GGC-CATCGC--GTACGGCCTGGACAAGGGCGACGACGGCAAGGAGCGCAACGTGCTGA	105
GE-118	GGC-CATCGC--GTACGGCCTGGACAAGGGCGACGACGGCAAGGAGCGCAACGTGTTCA	105
GE-216	GGC-CATCGC--GTACGGCCTGGACAAGGGCGACGACGGCAAGGAGCGCAACGTGCTGA	102
GE-2732	GGC-CATCGC--GTACGGCCTGGACAAGGGCGACGACGGCAAGGAGCGCAACGTGCTGA	106
GE-306	GGC-CATCGC--GTACGGCCTGGACAAGGGCGACGACGGCAAGGAGCGCAACGTGCTGA	103
GE-2705	GGC-CATCGC--GTACGGCCTGGACAAGGGCGACGACGGCAAGGAGCGCAACGTGCTGA	103
GE-280	GGC-CATCTC--GTACGGCCTGGACAAGGGCGACGACGGCAAGGAGCGCAACGTGCTGA	105
GA-973	GGC-CATCGC--GTACGGCCTGGACAAGGGCGACGACGGCAAGGAGCGCAACGTGCTGA	105
GE-078	GGC-CATCGC--GTACGGCCTGGACAAGGGCGACGACGGCAAGGAGCGCAACGTGCTGA	103
GE-295	GGC-CATCGC--GTACGGCCTGGACAAGGGCGACGACGGCAAGGAGCGCAACGTGCTGA	102
GE-367	GGC-CATCGC--GTACGGCCTGGACAAGGGCGACGACGGCAAGGAGCGCAACGTGCTGA	106
GE-2447	GGC-CATCGC--GTACGGCCTGGACAAGGGCGACGACGGCAAGGAGCGCAACGTGCTGA	104
GE-2706	GGC-CATCGC--GTACGGCCTGGACAAGGGCGACGACGGCAAGGAGCGCAACGTGCTGA	105
GE-189	GGC-CATCGC--GTACGGCCTGGACAAGGGCGACGACGGCAAGGAGCGCAACGTGCTGA	105
GE-1166	GGC-CATCGC--GTACGGCCTGGACAAGGGCGACGACGGCAAGGAGCGCAACGTGCTGA	101
GE-293	GGC-CATCGC--GTACGGCCTGGACAAGGGCGACGACGGCAAGGAGCGCAACGTGCTGA	104
GE-290	GGC-CATCGC--GTACGGCCTGGACAAGGGCGACGACGGCAAGGAGCGCAACGTGCTGA	105
GE-258	GGC-CATCGC--GTACGGCCTGGACAAGGGCGACGACGGCAAGGAGCGCAACGTGCTGA	105
GE-162	GGC-CATCGC--GTACGGCCTGGACAAGGGCGACGACGGCAAGGAGCGCAACGTGCTGA	105
GE-2708	GGC-CATCGC--GTACGGCCTGGACAAGGGCGACGACGGCAAGGAGCGCAACGTGCTGA	104
GE-649	GGC-CATCGC--GTACGGCCTGGACAAGGGCGACGACGGCAAGGAGCGCAACGTGCTGA	103
GA-1174	GGC-CATCGC--GTACGGCCTGGACAAGGGCGACGACGGCAAGGAGCGCAACGTGCTGA	105
GE-1273	GGC-CATCGC--GTACGGCCTGGACAAGGGCGACGACGGCAAGGAGCGCAACGTGCTGA	101
GE-454	GGC-CATCGC--GTACGGCCTGGACAAGGGCGACGACGGCAAGGAGCGCAACGTGCTGA	103
GE-100	GGC-CATCGC--GTACGGCCTGGACAAGGGCGACGACGGCAAGGAGCGCAACGTGCTGA	105
GE-422	GGC-CATCGC--GTACGGCCTGGACAAGGGCGACGACGGCAAGGAGCGCAACGTGCTGA	98
	* * * * *	

GE-2543 TCTTTGACCTTGGCGGCGGCACGTTTGATGTGACGCTGCTGACGATCGACGGCGGCATCT 172  
 GE-271 TCTTTGACCTTGGCGGCGGCACGTTTGATGTGACGCTGCTGACGATCGACGGCGGCATCT 165  
 GA-1172 TCTTTGACCTCGGGGGCGGCACGTTTGATGTGACGCTGCTGACGATCGAGGGGGGCATCT 165  
 GE-591 TCTTTGACCTTGGCGGCGGCACGTTTGATGTGACGCTGCTGACGATCGACGGCGGCATCT 165  
 GE-2595 TCTTTGACCTTGGCGGCGGCACGTTTGATGTGACGCTGCTGACGATCGACGGCGGCATCT 171  
 GE-2602 TCTTTGACCTTGGCGGCGGCACGTTTGATGTGACGCTGCTGACGATCGACGGCGGCATCT 164  
**GE-095** TCTTCGACCTTGGCGGCGGCACGTTTCGATGTGACGCTGCTGACGATCGACGGCGGCATCT 172  
 GE-222 TCTTTGACCTTGGCGGCGGCACGTTTCGATGTGACGCTGCTGACGATCGACGGCGGCATCT 165  
 GE-118 TCTTCGACCTTGGCGGCGGCACGTTTCGATGTGACGCTGCTGACGATCGACGGCGGCATCT 165  
 GE-216 TCTTTGACCTTGGCGGCGGCACGTTTGATGTGACGCTGCTGACGATCGACGGCGGCATCT 162  
 GE-2732 TCTTTGACCTTGGCGGCGGCACGTTTGATGTGACGCTGCTGACGATCGACGGCGGCATCT 166  
 GE-306 TCTTTGACCTTGGCGGCGGCACGTTTGATGTGACGCTGCTGACGATCGACGGCGGCATCT 163  
 GE-2705 TCTTTGACCTTGGCGGCGGCACGTTTGATGTGACGCTGCTGACGATCGACGGCGGCATCT 163  
 GE-280 TCTTTGACCTTGGCGGCGGCACGTTTGATGTGACGCTGCTGACGATCGACGGCGGCATCT 165  
 GA-973 TCTTTGACCTTGGCGGCGGCACGTTTGATGTGACGCTGCTGACGATCGACGGCGGCATCT 165  
 GE-078 TCTTTGACCTTGGCGGCGGCACGTTTGATGTGACGCTGCTGACGATCGACGGCGGCATCT 163  
 GE-295 TCTTTGACCTTGGCGGCGGCACGTTTGATGTGACGCTGCTGACGATCGACGGCGGCATCT 162  
 GE-367 TCTTTGACCTTGGGGGCGGCACGTTTGATGTGACGCTGCTGACGATCGACGGCGGCATCT 166  
 GE-2447 TCTTTGACCTTGGCGGCGGCACGTTTGATGTGACGCTGCTGACGATCGACGGCGGCATCT 164  
 GE-2706 TCTTTGACCTTGGCGGCGGCACGTTTGATGTGACGCTGCTGACGATCGACGGCGGCATCT 165  
 GE-189 TCTTTGACCTTGGCGGCGGCACGTTTGATGTGACGCTGCTGACGATCGACGGCGGCATCT 165  
 GE-1166 TCTTTGACCTTGGCGGCGGCACGTTTGATGTGACGCTGCTGACGATCGACGGCGGCATCT 161  
 GE-293 TCTTTGACCTTGGCGGCGGCACGTTTGATGTGACGCTGCTGACGATCGACGGCGGCATCT 164  
 GE-2595 TCTTTGACCTTGGCGGCGGCACGTTTGATGTGACGCTGCTGACGATCGACGGCGGCATCT 165  
 GE-290 TCTTTGACCTTGGGGGCGGCACGTTTGATGTGACGCTGCTGACGATCGACGGCGGCATCT 165  
 GE-258 TCTTTGACCTTGGCGGCGGCACGTTTGATGTGACGCTGCTGACGATCGACGGCGGCATCT 165  
 GE-162 TCTTTGACCTTGGCGGCGGCACGTTTGATGTGACGCTGCTGACGATCGACGGCGGCATCT 165  
 GE-2708 TCTTTGACCTTGGCGGCGGCACGTTTGATGTGACGCTGCTGACGATCGACGGCGGCATCT 164  
 GE-649 TCTTTGACCTTGGCGGCGGCACGTTTGATGTGACGCTGCTGACGATCGACGGCGGCATCT 163  
 GA-1174 TCTTTGACCTTGGCGGCGGCACGTTTGATGTGACGCTGCTGACGATCGACGGCGGCATCT 165  
 GE-1273 TCTTTGACCTTGGCGGCGGCACGTTTGATGTGACGCTGCTGACGATCGACGGCGGCATCT 161  
 GE-454 TCTTTGACCTTGGCGGCGGCACGTTTGATGTGACGCTGCTGACGATCGACGGCGGCATCT 163  
 GE-100 TCTTTGACCTTGGCGGCGGCACGTTTGATGTGACGCTGCTGACGATCGACGGCGGCATCT 165  
 GE-422 TCTTTGACCTTGGCGGCGGCACGTTTGATGTGACGCTGCTGACGATCGACGGCGGCATCT 158  
 \*\*\*\* \* 172

GE-2543 TCGAGGTGAAGGCGACGAACGGTGCACGCACCTCGGCGGCGAGGACTTTGACAACCGCC 232  
 GE-271 TCGAGGTGAAGGCGACGAACGGTGCACGCACCTTGGCGGCGAGGACTTTGACAACCGCC 225  
 GA-1172 TCGAGGTGAAGGCGACGAACGGTGCACGCACCTCGGCGGCGAGGACTTTGACAACCGCC 225  
 GE-591 TCGAGGTGAAGGCGACGAACGGTGCACGCACCTCGGCGGCGAGGACTTTGACAACCGCC 225  
 GE-2595 TCGAGGTGAAGGCGACGAACGGTGCACGCACCTTGGCGGCGAGGACTTTGACAACCGCC 231  
 GE-2602 TCGAGGTGAAGGCGACGAACGGTGCACGCACCTTGGCGGCGAGGACTTTGACAACCGCC 224  
**GE-095** TCGAGGTGAAGGCGACGAACGGTGCACGCACCTTGGCGGCGAGGACTTTGACAACCGCC 232  
 GE-222 TCGAGGTGAAGGCGACGAACGGTGCACGCACCTTGGCGGCGAGGACTTTGACAACCGCC 225  
 GE-118 TCGAGGTGAAGGCGACGAACGGTGCACGCACCTCGGCGGCGAGGACTTTGACAACCGCC 225  
 GE-216 TCGAGGTGAAGGCGACGAACGGTGCACGCACCTCGGCGGCGAGGACTTTGACAACCGCC 222  
 GE-2732 TCGAGGTGAAGGCGACGAACGGTGCACGCACCTTGGCGGCGAGGACTTTGACAACCGCC 226  
 GE-306 TCGAGGTGAAGGCGACGAACGGTGCACGCACCTTGGCGGCGAGGACTTTGACAACCGCC 223  
 GE-2705 TCGAGGTGAAGGCGACGAACGGTGCACGCACCTGGGCGGCGAGGACTTTGACAACCGCC 223  
 GE-280 TCGAGGTGAAGGCGACGAACGGTGCACGCACCTTGGCGGCGAGGACTTTGACAACCGCC 225  
 GA-973 TCGAGGTGAAGGCGACGAACGGTGCACGCACCTTGGCGGCGAGGACTTTGACAACCGCC 225  
 GE-078 TCGAGGTGAAGGCGACGAACGGTGCACGCACCTCGGCGGCGAGGACTTTGACAACCGCC 223  
 GE-295 TCGAGGTGAAGGCGACGAACGGTGCACGCACCTGGGCGGCGAGGACTTTGACAACCGCC 222  
 GE-367 TCGAGGTGAAGGCGACGAACGGTGCACGCACCTTGGCGGCGAGGACTTTGACAACCGCC 226  
 GE-2447 TCGAGGTGAAGGCGACGAACGGTGCACGCACCTTGGCGGCGAGGACTTTGACAACCGCC 224  
 GE-2706 TCGAGGTGAAGGCGACGAACGGTGCACGCACCTCGGCGGCGAGGACTTTGACAACCGCC 225  
 GE-189 TCGAGGTGAAGGCGACGAACGGTGCACGCACCTCGGCGGCGAGGACTTTGACAACCGCC 225  
 GE-1166 TCGAGGTGAAGGCGACGAACGGTGCACGCACCTCGGCGGCGAGGACTTTGACAACCGCC 221  
 GE-293 TCGAGGTGAAGGCGACGAACGGTGCACGCACCTCGGCGGCGAGGACTTTGACAACCGCC 224  
 GE-290 TCGAGGTGAAGGCGACGAACGGTGCACGCACCTCGGCGGCGAGGACTTTGACAACCGCC 225  
 GE-258 TCGAGGTGAAGGCGACGAACGGTGCACGCACCTGGGCGGCGAGGACTTTGACAACCGCC 225  
 GE-162 TCGAGGTGAAGGCGACGAACGGTGCACGCACCTTGGCGGCGAGGACTTTGACAACCGCC 225  
 GE-2708 TCGAGGTGAAGGCGACGAACGGTGCACGCACCTTGGCGGCGAGGACTTTGACAACCGCC 224  
 GE-649 TCGAGGTGAAGGCGACGAACGGTGCACGCACCTTGGCGGCGAGGACTTTGACAACCGCC 223  
 GA-1174 TCGAGGTGAAGGCGACGAACGGTGCACGCACCTTGGCGGCGAGGACTTTGACAACCGCC 225  
 GE-1273 TCGAGGTGAAGGCGACGAACGGTGCACGCACCTCGGCGGCGAGGACTTTGACAACCGCC 221  
 GE-454 TCGAGGTGAAGGCGACGAACGGTGCACGCACCTTGGCGGCGAGGACTTTGACAACCGCC 223  
 GE-100 TCGAGGTGAAGGCGACGAACGGTGCACGCACCTCGGCGGCGAGGACTTTGACAACCGCC 225  
 GE-422 TCGAGGTGAAGGCGACGAACGGTGCACGCACCTCGGCGGCGAGGACTTTGACAACCGCC 218  
 \*\*\*\*\*

GE-2543 TCGTACAGTTCTTCAGCGAGGAGTTCAAGCGCAAGAACAAGGGTAAGGACCTTTCGACGA 292  
 GE-271 TCGTACAGTTCTTCAGCGAGGAGTTCAAGCGCAAGAACAAGGGTAAGGACCTTTCGTCGA 285  
 GA-1172 TCGTCACGTTTTTACGCGAGGAGTTCAAGCGCAAGAACAAGGGTAAGGACCTTTCGACGA 285  
 GE-591 TCGTCACAGTTCTTCAGCGAGGAGTTCAAGCGCAAGAACAAGGGTAAGGACCTTTCGTCGA 285  
 GE-2595 TCGTCACAGTTCTTCAGCGAGGAGTTCAAGCGCAAGAACAAGGGTAAGGACCTTTCGACGA 291  
 GE-2692 TCGTCACAGTTCTTCAGCGAGGAGTTCAAGCGCAAGAACAAGGGTAAGGACCTTTCGACGA 284  
 GE-095 TCGTCACAGTTCTTCAGCGAGGAGTTCAAGCGCAAGAACAAGGGTAAGGACCTTTCGTCGA 292  
 GE-222 TCGTCACAGTTCTTCAGCGAGGAGTTCAAGCGCAAGAACAAGGGTAAGGACCTTTCGTCGA 285  
 GE-118 TCGTCACAGTTCTTCAGCGAGGAGTTCAAGCGCAAGAACAAGGGTAAGGACCTTTCGTCGA 285  
 GE-216 TCGTCACAGTTCTTCAGCGAGGAGTTCAAGCGCAAGAACAAGGGTAAGGACCTTTCGACGA 282  
 GE-2732 TCGTCACAGTTCTTCAGCGAGGAGTTCAAGCGCAAGGACAAGGGTAAGGACCTTTCGACGA 286  
 GE-306 TCGTCACGTTCTTCAGCGAGGAGTTCAAGCGCAAGAACAAGGGTAAGGACCTTTCGACGA 283  
 GE-2705 TCGTCACGTTCTTCAGCGAGGAGTTCAAGCGCAAGAACAAGGGTAAGGACCTTTCGACGA 283  
 GE-280 TCGTCACGTTCTTCAGCGAGGAGTTCAAGCGCAAGAACAAGGGTAAGGACCTTTCGACGA 285  
 GA-973 TCGTCACGTTCTTCAGCGAGGAGTTCAAGCGCAAGAACAAGGGTAAGGACCTTTCGACGA 285  
 GE-078 TCGTCACGTTCTTCAGCGAGGAGTTCAAGCGCAAGAACAAGGGTAAGGACCTTTCGACGA 283  
 GE-295 TCGTCACGTTCTTCAGCGAGGAGTTCAAGCGCAAGAACAAGGGTAAGGACCTTTCGACGA 282  
 GE-367 TCGTCACGTTCTTCAGCGAGGAGTTCAAGCGCAAGAACAAGGGTAAGGACCTTTCGACGA 286  
 GE-2447 TCGTCACGTTCTTCAGCGAGGAGTTCAAGCGCAAGAACAAGGGTAAGGACCTTTCGACGA 284  
 GE-2706 TCGTCACGTTCTTCAGCGAGGAGTTCAAGCGCAAGAACAAGGGTAAGGACCTTTCGACGA 285  
 GE-189 TCGTCACGTTCTTCAGCGAGGAGTTCAAGCGCAAGAACAAGGGTAAGGACCTTTCGACGA 285  
 GE-1166 TCGTCACGTTCTTCAGCGAGGAGTTCAAGCGCAAGAACAAGGGTAAGGACCTTTCGACGA 281  
 GE-293 TCGTCACGTTCTTCAGCGAGGAGTTCAAGCGCAAGAACAAGGGTAAGGACCTTTCGACGA 284  
 GE-290 TCGTCACGTTCTTCAGCGAGGAGTTCAAGCGCAAGAACAAGGGTAAGGACCTTTCGACGA 285  
 GE-258 TCGTCACGTTCTTCAGCGAGGAGTTCAAGCGCAAGAACAAGGGTAAGGACCTTTCGACGA 285  
 GE-162 TCGTCACGTTCTTCAGCGAGGAGTTCAAGCGCAAGAACAAGGGTAAGGACCTTTCGACGA 285  
 GE-2708 TCGTCACGTTCTTCAGCGAGGAGTTCAAGCGCAAGAACAAGGGTAAGGACCTTTCGACGA 284  
 GE-649 TCGTCACGTTCTTCAGCGAGGAGTTCAAGCGCAAGAACAAGGGTAAGGACCTTTCGACGA 283  
 GA-1174 TCGTCACGTTCTTCAGCGAGGAGTTCAAGCGCAAGAACAAGGGTAAGGACCTTTCGACGA 285  
 GE-1273 TCGTCACGTTCTTCAGCGAGGAGTTCAAGCGCAAGAACAAGGGTAAGGACCTTTCGACGA 281  
 GE-454 TCGTCACGTTCTTCAGCGAGGAGTTCAAGCGCAAGAACAAGGGTAAGGACCTTTCGACGA 283  
 GE-100 TCGTCACGTTCTTCAGCGAGGAGTTCAAGCGCAAGAACAAGGGTAAGGACCTTTCGACGA 285  
 GE-422 TCGTCACGTTCTTCAGCGAGGAGTTCAAGCGCAAGAACAAGGGTAAGGACCTTTCGACGA 278  
 \*\*\*\*\* \*\* \* \*\*\*\*\*

GE-2543 GCCACCGCGCACTGCGCCGCTGCGCACGGCGTGCAGCGCGCAAGCGCACGCTGTCGT 352  
 GE-271 GCCACCGCGCGCTGCGCCGCTGCGCACGGCGTGCAGCGCGCAAGCGCACGCTGTCGT 345  
 GA-1172 GCCACCGCGCACTGCGCCGCTGCGCACGGCGTGCAGCGCGCAAGCGCACGCTGTCGT 345  
 GE-591 GCCACCGCGCGCTGCGCCGCTGCGCACGGCGTGCAGCGCGCAAGCGCACGCTGTCGT 345  
 GE-2595 GCCACCGCGCACTGCGCCGCTGCGCACGGCGTGCAGCGCGCAAGCGCACGCTGTCGT 351  
 GE-2602 GCCACCGCGCACTGCGCCGCTGCGCACGGCGTGCAGCGCGCAAGCGCACGCTGTCGT 344  
 GE-095 GCCACCGCGCGCTGCGCCGCTGCGCACGGCGTGCAGCGCGCAAGCGCACGCTGTCGT 352  
 GE-222 GCCACCGCGCGCTGCGCCGCTGCGCACGGCGTGCAGCGCGCAAGCGCACGCTGTCGT 345  
 GE-118 GCCACCGCGCGCTGCGCCGCTGCGCACGGCGTGCAGCGCGCAAGCGCACGCTGTCGT 345  
 GE-216 GCCACCGCGCACTGCGCCGCTGCGCACGGCGTGCAGCGCGCAAGCGCACGCTGTCGT 342  
 GE-2732 GCCACCGCGCACTGCGCCGCTGCGCACGGCGTGCAGCGCGCAAGCGCACGCTGTCGT 346  
 GE-306 GCCACCGCGCACTGCGCCGCTGCGCACGGCGTGCAGCGCGCAAGCGCACGCTGTCGT 343  
 GE-2705 GCCACCGCGCACTGCGCCGCTGCGCACGGCGTGCAGCGCGCAAGCGCACGCTGTCGT 343  
 GE-280 GCCACCGCGCACTGCGCCGCTGCGCACGGCGTGCAGCGCGCAAGCGCACGCTGTCGT 345  
 GA-973 GCCACCGCGCACTGCGCCGCTGCGCACGGCGTGCAGCGCGCAAGCGCACGCTGTCGT 345  
 GE-078 GCCACCGCGCACTGCGCCGCTGCGCACGGCGTGCAGCGCGCAAGCGCACGCTGTCGT 343  
 GE-295 GCCACCGCGCACTGCGCCGCTGCGCACGGCGTGCAGCGCGCAAGCGCACGCTGTCGT 342  
 GE-367 GCCACCGCGCACTGCGCCGCTGCGCACGGCGTGCAGCGCGCAAGCGCACGCTGTCGT 346  
 GE-2447 GCCACCGCGCACTGCGCCGCTGCGCACGGCGTGCAGCGCGCAAGCGCACGCTGTCGT 344  
 GE-2706 GCCACCGCGCACTGCGCCGCTGCGCACGGCGTGCAGCGCGCAAGCGCACGCTGTCGT 345  
 GE-189 GCCACCGCGCACTGCGCCGCTGCGCACGGCGTGCAGCGCGCAAGCGCACGCTGTCGT 345  
 GE-1166 GCCACCGCGCACTGCGCCGCTGCGCACGGCGTGCAGCGCGCAAGCGCACGCTGTCGT 341  
 GE-293 GCCACCGCGCACTGCGCCGCTGCGCACGGCGTGCAGCGCGCAAGCGCACGCTGTCGT 344  
 GE-290 GCCACCGCGCACTGCGCCGCTGCGCACGGCGTGCAGCGCGCAAGCGCACGCTGTCGT 345  
 GE-258 GCCACCGCGCACTGCGCCGCTGCGCACGGCGTGCAGCGCGCAAGCGCACGCTGTCGT 345  
 GE-162 GCCACCGCGCACTGCGCCGCTGCGCACGGCGTGCAGCGCGCAAGCGCACGCTGTCGT 345  
 GE-2708 GCCACCGCGCACTGCGCCGCTGCGCACGGCGTGCAGCGCGCAAGCGCACGCTGTCGT 344  
 GE-649 GCCACCGCGCACTGCGCCGCTGCGCACGGCGTGCAGCGCGCAAGCGCACGCTGTCGT 343  
 GA-1174 GCCACCGCGCACTGCGCCGCTGCGCACGGCGTGCAGCGCGCAAGCGCACGCTGTCGT 345  
 GE-1273 GCCACCGCGCACTGCGCCGCTGCGCACGGCGTGCAGCGCGCAAGCGCACGCTGTCGT 341  
 GE-454 GCCACCGCGCACTGCGCCGCTGCGCACGGCGTGCAGCGCGCAAGCGCACGCTGTCGT 343  
 GE-100 GCCACCGCGCACTGCGCCGCTGCGCACGGCGTGCAGCGCGCAAGCGCACGCTGTCGT 345  
 GE-422 GCCACCGCGCACTGCGCCGCTGCGCACGGCGTGCAGCGCGCAAGCGCACGCTGTCGT 338  
 \*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\*

GE-2543	CCGCGACGCAGGCACGATCGAGATCGACGCGCTGTTTCGACAACGTCGACTTCCAGGCCA	412
GE-271	CCGCGACGCAGGCACGATCGAGATCGACGCGCTGTTTCGACAACGTCGACTTCCAGGCCA	405
GA-1172	CCGCGACGCAGGCACGATCGAGATCGACGCGCTGTTTCGACAACGTCGACTTCCAGGCCA	405
GE-591	CCGCGACGCAGGCACGATCGAGATCGACGCGCTGTTTCGACAACGTCGACTTCCAGGCCA	405
GE-2595	CCGCGACGCAGGCACGATCGAGATCGACGCGCTGTTTCGACAACGTCGACTTCCAGGCCA	411
GE-2602	CCGCGCGCAGGCACGATCGAGATCGACGCGCTGTTTCGACAACGTCGACTTCCAGGCCA	404
GE-095	CCGCGACGCAGGCACGATCGAGATCGACGCGCTGTTTCGACAACGTCGACTTCCAGGCCA	412
GE-222	CCGCGACGCAGGCACGATCGAGATCGACGCGCTGTTTCGACAACGTCGACTTCCAGGCCA	405
GE-118	CCGCGACGCAGGCACGATCGAGATCGACGCGCTGTTTCGACAACGTCGACTTCCAGGCCA	405
GE-216	CCGCGACGCAGGCACGATCGAGATCGACGCGCTGTTTCGACAACGTCGACTTCCAGGCCA	402
GE-2732	CCGCGACGCAGGCACGATCGAGATCGACGCGCTGTTTCGACAACGTCGACTTCCAGGCCA	406
GE-306	CCGCGACGCAGGCACGATCGAGATCGACGCGCTGTTTCGACAACGTCGACTTCCAGGCCA	403
GE-2705	CCGCGACGCAGGCACGATCGAGATCGACGCGCTGTTTCGACAACGTCGACTTCCAGGCCA	403
GE-280	CCGCGACGCAGGCACGATCGAGATCGACGCGCTGTTTCGACAACGTCGACTTCCAGGCCA	405
GA-973	CCGCGACGCAGGCACGATCGAGATCGACGCGCTGTTTCGACAACGTCGACTTCCAGGCCA	405
GE-078	CCGCGACGCAGGCACGATCGAGATCGACGCGCTGTTTCGACAACGTCGACTTCCAGGCCA	403
GE-295	CCGCGACGCAGGCACGATCGAGATCGACGCGCTGTTTCGACAACGTCGACTTCCAGGCCA	402
GE-367	CCGCGACGCAGGCACGATCGAGATCGACGCGCTGTTTCGACAACGTCGACTTCCAGGCCA	406
GE-2447	CCGCGACGCAGGCACGATCGAGATCGACGCGCTGTTTCGACAACGTCGACTTCCAGGCCA	404
GE-2706	CCGCGACGCAGGCACGATCGAGATCGACGCGCTGTTTCGACAACGTCGACTTCCAGGCCA	405
GE-189	CCGCGACGCAGGCACGATCGAGATCGACGCGCTGTTTCGACAACGTCGACTTCCAGGCCA	405
GE-1166	CCGCGACGCAGGCACGATCGAGATCGACGCGCTGTTTCGACAACGTCGACTTCCAGGCCA	401
GE-293	CCGCGACGCAGGCACGATCGAGATCGACGCGCTGTTTCGACAACGTCGACTTCCAGGCCA	404
GE-290	CCGCGACGCAGGCACGATCGAGATCGACGCGCTGTTTCGACAACGTCGACTTCCAGGCCA	405
GE-258	CCGCGACGCAGGCACGATCGAGATCGACGCGCTGTTTCGACAACGTCGACTTCCAGGCCA	405
GE-162	CCGCGACGCAGGCACGATCGAGATCGACGCGCTGTTTCGACAACGTCGACTTCCAGGCCA	405
GE-2708	CCGCGACGCAGGCACGATCGAGATCGACGCGCTGTTTCGACAACGTCGACTTCCAGGCCA	404
GE-649	CCGCGACGCAGGCACGATCGAGATCGACGCGCTGTTTCGACAACGTCGACTTCCAGGCCA	403
GA-1174	CCGCGACGCAGGCACGATCGAGATCGACGCGCTGTTTCGACAACGTCGACTTCCAGGCCA	405
GE-1273	CCGCGACGCAGGCACGATCGAGATCGACGCGCTGTTTCGACAACGTCGACTTCCAGGCCA	401
GE-454	CCGCGACGCAGGCACGATCGAGATCGACGCGCTGTTTCGACAACGTCGACTTCCAGGCCA	403
GE-100	CCGCGACGCAGGCACGATCGAGATCGACGCGCTGTTTCGACAACGTCGACTTCCAGGCCA	405
GE-422	CCGCGACGCAGGCACGATCGAGATCGACGCGCTGTTTCGACAACGTCGACTTCCAGGCCA	398
	*****	

GE-2543	ACATCACGCGCGCGCTTCGAGGAGCTGTGCGGC---GACCTGTTCCGACGACAATGC	469
GE-271	ACATCACGCGCGCGCTTCGAGGAGCTGTGCGGC---GACCTGTTCCGACGACAATGC	462
GA-1172	ACATCACGCGCGCGCTTCGAGGAGCTGTGCGGC---GACCTGTTCCGACGACAATGC	462
GE-591	ACATCACGCGCGCGCTTCGAGGAGCTGTGCGGC---GACCTGTTCCGACGACAATGC	465
GE-2595	ACATCACGCGCGCGCTTCGAGGAGCTGTGCGGC---GACCTGTTCCGACGACAATGC	468
GE-2602	ACATCACGCGCGCGCTTCGAGGAGCTGTGCGGC---GACCTGTTCCGACGACAATGC	461
GE-095	ACATCACGCGCGCGCTTCGAGGAGCTGTGCGGC---GACCTGTTCCGACGACAATGC	469
GE-222	ACATCACGCGCGCGCTTCGAGGAGCTGTGCGGC---GACCTGTTCCGACGACAATGC	462
GE-118	ACATCACGCGCGCGCTTCGAGGAGCTGTGCGGC---GACCTGTTCCGACGACAATGC	462
GE-216	ACATCACGCGCGCGCTTCGAGGAGCTGTGCGGC---GACCTGTTCCGACGACAATGC	459
GE-2732	ACATCACGCGCGCGCTTCGAGGAGCTGTGCGGC---GACCTGTTCCGACGACAATGC	463
GE-306	ACATCACGCGCGCGCTTCGAGGAGCTGTGCGGC---GACCTGTTCCGACGACAATGC	460
GE-2705	ACATCACGCGCGCGCTTCGAGGAGCTGTGCGGC---GACCTGTTCCGACGACAATGC	460
GE-280	ACATCACGCGCGCGCTTCGAGGAGCTGTGCGGC---GACCTGTTCCGACGACAATGC	462
GA-973	ACATCACGCGCGCGCTTCGAGGAGCTGTGCGGC---GACCTGTTCCGACGACAATGC	462
GE-078	ACATCACGCGCGCGCTTCGAGGAGCTGTGCGGC---GACCTGTTCCGACGACAATGC	460
GE-295	ACATCACGCGCGCGCTTCGAGGAGCTGTGCGGC---GACCTGTTCCGACGACAATGC	459
GE-367	ACATCACGCGCGCGCTTCGAGGAGCTGTGCGGC---GACCTGTTCCGACGACAATGC	463
GE-2447	ACATCACGCGCGCGCTTCGAGGAGCTGTGCGGC---GACCTGTTCCGACGACAATGC	461
GE-2706	ACATCACGCGCGCGCTTCGAGGAGCTGTGCGGC---GACCTGTTCCGACGACAATGC	462
GE-189	ACATCACGCGCGCGCTTCGAGGAGCTGTGCGGC---GACCTGTTCCGACGACAATGC	462
GE-1166	ACATCACGCGCGCGCTTCGAGGAGCTGTGCGGC---GACCTGTTCCGACGACAATGC	458
GE-293	ACATCACGCGCGCGCTTCGAGGAGCTGTGCGGC---GACCTGTTCCGACGACAATGC	461
GE-290	ACATCACGCGCGCGCTTCGAGGAGCTGTGCGGC---GACCTGTTCCGACGACAATGC	462
GE-258	ACATCACGCGCGCGCTTCGAGGAGCTGTGCGGC---GACCTGTTCCGACGACAATGC	462
GE-162	ACATCACGCGCGCGCTTCGAGGAGCTGTGCGGC---GACCTGTTCCGACGACAATGC	462
GE-2708	ACATCACGCGCGCGCTTCGAGGAGCTGTGCGGC---GACCTGTTCCGACGACAATGC	461
GE-649	ACATCACGCGCGCGCTTCGAGGAGCTGTGCGGC---GACCTGTTCCGACGACAATGC	460
GA-1174	ACATCACGCGCGCGCTTCGAGGAGCTGTGCGGC---GACCTGTTCCGACGACAATGC	462
GE-1273	ACATCACGCGCGCGCTTCGAGGAGCTGTGCGGC---GACCTGTTCCGACGACAATGC	458
GE-454	ACATCACGCGCGCGCTTCGAGGAGCTGTGCGGC---GACCTGTTCCGACGACAATGC	460
GE-100	ACATCACGCGCGCGCTTCGAGGAGCTGTGCGGC---GACCTGTTCCGACGACAATGC	462
GE-422	ACATCACGCGCGCGCTTCGAGGAGCTGTGCGGC---GACCTGTTCCGACGACAATGC	455
	*****	

GE-2543 AGCCGGTGGAGCGCGTG - CTGCAGGACGCGAAGATGGACAAG --- CGCTCCGTGCACGAC 525  
 GE-271 AGCCGGGTGGAGCGCGTGCTGCAGGACGCGGAAGGATGGACAAGG --- CGGCT 517  
 GA-1172 AGCCGAGTGAAGCGCGTGCTGCAGGACGCGGAAGGATGAGACAAGCGCTCCGGTGAC --- 520  
 GE-591 AGCCGAGTGAAGCGCGTGCTGCAGAACGCGAAGGATGAACAA - GCGCTCCGTGCACGAC 524  
 GE-2595 AGCCGGTGGAGCGCGTG - CCGCAGGACGCGAAGATGGACAAG --- GCGCTCCGTGCACGAC 524  
 GE-2602 AGCCGGTGGAGCGCGTGCTGCAGGACGCGAAGATGAACAAG - GCGCTCCGTGCACGGA 520  
 GE-095 AGCCGGTGGAGCGCGT - GCTGCAGGACGCGAAGATGGACAAG --- CGCTCCGTGCACGGC 525  
 GE-222 AGCCGGTGAAGCGCGT - GCTGCAGGACGCGAAGATGAACAAG --- CGGCTCCGTGCACGG 518  
 GE-118 AGCCGGTGGAGCGCGT - GCTGCAGGACGCGAAGATGGACAAG --- CGCTCCGTGCACGAC 518  
 GE-216 AGCCGGTGGAGCGCGT - GCTGCAGGACGCGAAGATGGACAAG --- CGCTCCGTGCACGAC 515  
 GE-2732 AGCCGGTGGAGCGCGT - GCTGCAGGACGCGAAGATGGACAAG --- CGCTCCGTGCACGAC 519  
 GE-306 AGCCGGTGGAGCGCGT - GCTGCAGGACGCGAAGATGGACAAG --- CGCTCCGTGCACGAC 516  
 GE-2705 AGCCGGTGGAGCGCGT - GCTGCAGGACGCGAAGATGGACAAG --- CGCTCCGTGCACGAC 516  
 GE-280 AGCCGGTGGAGCGCGT - GCTGCAGGACGCGAAGATGGACAAG --- CGCTCCGTGCACGAC 518  
 GA-973 AGCCGGTGGAGCGCGT - GCTGCAGGACGCGAAGATGGACAAG --- CGCTCCGTGCACGAC 518  
 GE-078 AGCCGGTGGAGCGCGT - GCTGCAGGACGCGAAGATGGACAAG --- CGCTCCGTGCACGAC 516  
 GE-295 AGCCGGTGGAGCGCGT - GCTGCAGGACGCGAAGATGGACAAG --- CGCTCCGTGCACGAC 515  
 GE-367 AGCCGGTGGAGCGCGT - GCTGCAGGACGCGAAGATGGACAAG --- CGCTCCGTGCACGAC 519  
 GE-2447 AGCCGGTGGAGCGCGT - GCTGCAGGACGCGAAGATGGACAAG --- CGCTCCGTGCACGAC 517  
 GE-2706 AGCCGGTGGAGCGCGT - GCTGCAGGACGCGAAGATGGACAAG --- CGCTCCGTGCACGAC 518  
 GE-189 AGCCGGTGGAGCGCGT - GCTGCAGGACGCGAAGATGGACAAG --- CGCTCCGTGCACGAC 518  
 GE-1166 AGCCGGTGGAGCGCGT - GCTGCAGGACGCGAAGATGGACAAG --- CGCTCCGTGCACGAC 514  
 GE-293 AGCCGGTGGAGCGCGT - GCTGCAGGACGCGAAGATGGACAAG --- CGCTCCGTGCACGAC 517  
 GE-290 AGCCGGTGGAGCGCGT - GCTGCAGGACGCGAAGATGAACAAG --- CGCTCCGTGCACGAC 518  
 GE-258 AGCCGGTGGAGCGCGT - GCTGCAGGACGCGAAGATGGACAAG --- CGCTCCGTGCACGAC 518  
 GE-162 AGCCGGTGGAGCGCGT - GCTGCAGGACGCGAAGATGGACAAG --- CGCTCCGTGCACGAC 518  
 GE-2708 AGCCGGTGGAGCGCGT - GCTGCAGGACGCGAAGATGGACAAG --- CGCTCCGTGCACGAC 517  
 GE-649 AGCCGGTGGAGCGCGT - GCTGCAGGACGCGAAGATGGACAAG --- CGCTCCGTGCACGAC 516  
 GA-1174 AGCCGGTGGAGCGCGT - GCTGCAGGACGCGAAGATGGACAAG --- CGCTCCGTGCACGAC 518  
 GE-1273 AGCCGGTGGAGCGCGT - GCTGCAGGACGCGAAGATGGACAAG --- CGCTCCGTGCACGAC 514  
 GE-454 AGCCGGTGGAGCGCGT - GCTGCAGGACGCGAAGATGGACAAG --- CGCTCCGTGCACGAC 516  
 GE-100 AGCCGGTGGAGCGCGT - GCTGCAGGACGCGAAGATGGACAAG --- CGCTCCGTGCACGAC 518  
 GE-422 AGCCGGTGGAGCGCGT - GCTGCAGGACGCGAAGATGGACAAG --- CGCTCCGTGCACGAC 511

\*\*\*\*\* \*

GE-2543 GTGCTGCTGG ----- 535  
 GE-271 CCGTGCACGGACGGGCGGGTGCAGCGCATCCC GAAGGTGCAGTCCCTCGTTCG --- 571  
 GA-1172 -----GGACGGTGGGCGGGTCGACGCGCATCCC GAAGGTGCACTCCTC ----- 563  
 GE-591 GT -----GGTGGGCGGGTCTACACACATCCC GAAGGTGCAGTCCCTCGTATGGA- 574  
 GE-2595 GTGGTGCTGGTGGGCGGGTCTGACGCGCATCCC GAAGGTGCAGTCCCTCGTACGGA- 580  
 GE-2602 CTGC --- TGGTGGGCGGGT - GACTCACATCCAGAAGGTCCAGTCCCTCGTACG --- 570  
 GE-095 GTGGTGCTGGTGGGCGGGT - GACGCGCATCCC GAAGGTGCAGTCCCTCGTTCG --- 578  
 GE-222 ACGGTGCTGGTGGGCGGGT - GACGCGCATCCC GAAGGTGCAGTCCCTCGTA --- 569  
 GE-118 GTGGTGCTGGTGGGCGGGTCTGACGCGCATCCC GAAGGTGCAGTCCCTCGTAC --- 571  
 GE-216 GTGGTGCTCGTGGGCGGGTCTGACTCGCATCCC GAAGGTCCAGTCCCTGTATGGAC - 571  
 GE-2732 GTGCTGCTGGTGGGCGGGT - TACTCGCATCCC GAAGGTCCAGTCCCGTATG --- 571  
 GE-306 GTGGTGCTGGTGGGCGGGC - GACCCACATCCC GAAGGTCCAGCCCTATG --- 567  
 GE-2705 GTGGTGCTGGTGGGCGGGT - GACGCGCATCCC GAAGGTGCAGGCCCTCGTACGG -- 570  
 GE-280 GTGGTGCTGTTGGGCGGGT - TA ----- 540  
 GA-973 GTGGTGCTGGTGGGCGGGT - ACGGCGCATCCC GAAGGTGCAGTCCCTCGTAC --- 570  
 GE-078 GTGGTGCTGGTGGGCGGGT - TAATCACATCCC GAAGGTGCAGGCCCTGTAC --- 567  
 GE-295 GTGGTGCTGGTGGGCGGGT - GACGCGCATCCC GAAGGTGCAGTCCCTCCGAC --- 566  
 GE-367 GTGGTGCTGGTGGGCGGGT - GACGCGCATCCC GAAGGTGCAGTCCCTCC --- 567  
 GE-2447 GTGGTGCTGGTGGGCGGGT - GACGCGCATCCC GAAGGTGCAGTCCCTGATC --- 568  
 GE-2706 GTGGTGCTGGTGGGCGGGT - GACGCGCATCCC GAAGGTGCAGTCCCTCGTATGGGA 574  
 GE-189 GTGGTGCTGGTGGGCGGGT - GACTCACATCCC GAAGGTGCAGTCCCTCGAC --- 569  
 GE-1166 GTGGTGCTGGTGGGCGGGT - GACGCGCATCCC GAAGGTGCAGTCCCTGTAC --- 565  
 GE-293 GTGGTGCTCGTGGGCGGGT - GACACACATCCC GAAGGTGCAGTCCCTCGTACGGA- 572  
 GE-290 GTGGTGCTGGTGGGCGGGT - GACGCGCATCCC GAAGGTGCAGTCCCTCGTACGGA- 573  
 GE-258 GTGGTGCTGGTGGGCGGGT - GACCCGATCCC GAAGGTGCAGTCCCTC ----- 565  
 GE-162 GTGGTGCTGGTGGGCGGGT - GACGCGCATCCC GAAGGTGCAGTCCCTCGTAC --- 570  
 GE-2708 GTGGTGCTGGTGGGCGGGT - GACGCGCATCCC GAAGGTGCAGTCCCTCGTAC --- 569  
 GE-649 GTGGTGCTGGTGGGCGGGT - GACGCGCATCCC GAAGGTGCAGTCCCTC ----- 564  
 GA-1174 GTGGTGCTGGTGGGCGGGT - GACGCGCATCCC GAAGGTGCAGTCCCTCGTATGGA- 573  
 GE-1273 GTGGTGCTGGTGGGCGGGT - GACGCGCATCCC GAAGGTGCAGTCCCTCGTACGGA- 569  
 GE-454 GTGGTGCTGGTGGGCGGGT - GACGCGCATCCC GAAGGTGCAGT ----- 559  
 GE-100 GTGGTGCTGGTGGGCGGGT - GACGCGCATCCC GAAGGTGCAGTCCCTCGTAC --- 570  
 GE-422 GTGGTGCTGGTGGGCGGGT - GACTCGCATCCC GAAGGTGCAGTCCCTCGTAC --- 563