

UNIVERSIDAD DE GRANADA
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGÍA



Identificación fenotípica y genotípica de 74 nuevos aislados de Tripanosomátidos de seis países de Latinoamérica y España.

TESIS DOCTORAL

JESÚS URBANO ADAMUZ

GRANADA, SEPTIEMBRE 2009

Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: Jesús Urbano Adamuz
D.L.: GR. 3528-2009
ISBN: 978-84-692-6409-6



Universidad de Granada

Facultad de Ciencias



Identificación fenotípica y genotípica de 74 nuevos aislados de Tripanosomátidos de seis países de Latinoamérica y España.

LOS DIRECTORES

Prof. Dr. Manuel Sánchez Moreno

Catedrático de Parasitología

Universidad de Granada

.....

Dra. Clotilde Marín Sánchez

Doctora en Biología

Universidad de Granada

.....

TUTOR

Prof. Dra. M^a José Rosales Lombardo

Profesora Titular de Parasitología

Universidad de Granada

.....

Tesis presentada para optar al Grado de Doctor,
por el licenciado en biología **JESÚS URBANO ADAMUZ**

.....

Granada, Septiembre de 2009

El trabajo que se presenta en esta memoria de Tesis Doctoral ha sido realizado en el Grupo de Investigación "Bioquímica y Parasitología Molecular" (CTS- 183, Plan Andaluz de Investigación, Junta de Andalucía), del Departamento de Parasitología de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Granada (España), bajo la supervisión del Catedrático en Parasitología D. Manuel Sánchez Moreno y la Doctora en Biología Dña. Clotilde Marín Sánchez. Además, este trabajo ha sido cofinanciado por dicho grupo y por el proyecto de acción complementaria CGL-2008-03687-E/BOS "Biobanco y unidad de caracterización de cepas y especies de tripanosomátidos, responsables de patologías humanas, animales y vegetales" (Ministerio de Ciencia e Innovación). Parte de los resultados mostrados en esta Tesis Doctoral han sido sometidos en revistas internacionales:

- **Veterinary Parasitology, 2007.** (VERC1462)
- **Acta Trópica, 2009.** (ACTROP-D-09-00255)
- **Parasitology International, 2009.** (PARINT-D-09-00173)
- **Experimental Parasitol, 2009.** (EP-09-193)

Asimismo, algunos de los resultados de esta Tesis Doctoral también han sido presentados en los siguientes congresos:

- XII semana científica "Antonio González". Universidad de la Laguna Tenerife (España). Septiembre 2008.

AGRADECIMIENTOS.

Una vez finalizado el trabajo llega el momento de los agradecimientos. Nunca habría imaginado lo difícil que puede llegar a ser la redacción de estas líneas, quizás por ser las más leídas o tal vez por su peso emocional.

¿A quién agradecer este trabajo? Son tantas las personas que han participado de una u otra forma en la consecución de esta tesis, que seguramente muchas de ellas no sean reflejadas por olvido, nunca por voluntad. Pido disculpas a las que aquí no aparezcan; todos, unos y otros, son merecedores de toda mi gratitud. Quiero decir muchas veces gracias. Espero saber transmitir lo agradecido y lo querido que me siento.

Nada de esto sería posible sin el Prof. Dr. Manuel Sánchez Moreno, director de esta tesis. A él le debo la imprescindible ayuda desde el primer día que pisé esta Facultad de Ciencias, la formación profesional y personal que me ha dado, su calidad humana y la oportunidad de llevar a cabo esta tesis. Mi maestro desde el principio, he de decir que si alguien supo contagiarme el interés y entusiasmo por esta materia, ese fue Manuel. Interés que comenzó hace unos 9 años, en el momento en el que asistí a mi primera clase de parasitología general como alumno Universitario, y fue a la culminación de una de las mismas, cuando sentí la necesidad de informarme sobre las investigaciones que se estaban realizando en este área. Tú me has enseñado todo lo que sé desde el punto de vista profesional y científico. Esta tesis nunca se podría haber llevado a cabo sin tus brillantes ideas, sin tu dominio total de este campo de conocimiento y sin tu apoyo y enseñanzas. Creo que se necesitan más personas como tú en ciencia. Gracias por haberme dejado ser partícipe de este mundo científico y por tener siempre a mi alcance todos los medios posibles. Va por ti, maestro.

Mi más sincero gracias a la Dra. Dña. Clotilde Marín Sánchez, codirectora de esta tesis, quien dirigió las correcciones del texto, gracias por darme el mejor ejemplo profesional que uno pueda seguir. Por estar constantemente dispuesta a brindarme parte de tu sabiduría, por tus consejos y por haber aportado siempre luz a todas mis dudas científicas y ayudarme en mis primeros pasos en este complejo mundo científico.

Muchísimas gracias a los dos, por formarme como científico, por orientarme y por ayudarme a crecer como persona.

He de manifestar también mi más sincero agradecimiento a todos los profesores que integran el departamento de Parasitología.

A mis antiguos compañeros de laboratorio con los que compartí alegrías y penas; Silvia, Héctor, Lucía, Gregorio, Luismi, Raquel y Teresa. A todos los miembros del Departamento de parasitología, en especial muchas gracias a Encarna y Carlos, siempre dispuestos a echar una mano y soportar tostones varios, sobre todo por apoyarme en los duros momentos personales y profesionales.

Gracias a todos por haber contribuido a mi formación y por haber hecho mi trabajo mucho más llevadero. A todos, a mi grupo... gracias por acogerme.

Gracias a mis compañeros de trabajo del Instituto del Agua: Javi, Emilio, Laura y Luismi. A los profesores del Departamento de Ecología; José M^a Conde y Carmen Pérez, no puedo dejar de reconocer que gran parte de la gestación de este trabajo se debe a los momentos de inspiración que dieron la Belleza y la tranquilidad vividos en los mejores parques naturales y nacionales de este país. Gracias por haberme dado la oportunidad de sentir la naturaleza al alcance de mis manos.

A todos mis amigos, porque siempre han estado ahí cuando los he necesitado, gracias por haberme hecho tan feliz en todos los momentos que hemos compartido juntos. Gracias a todos por hacerme sentir que puedo contar con vosotros, ahora y siempre. Gracias por vuestra amistad tan sincera.

Gracias a todos mis compañeros de convivencia: A José, un amigo de por vida, pese a lo poco que nos vemos. A Raúl, Rafa, Manuel, Antonio y Juan. A Nieto, gracias por tu entusiasmo contagioso, por tus consejos. Pero, sobre todo, gracias por tu excepcional generosidad, por el apoyo incondicional que he recibido de tí día a día, y por todas y cada una de tus palabras de aliento, que tanto me han animado a seguir adelante, lo que evitó que tirara la toalla en los momentos más duros.

GRACIAS a mis padres, José y Trinidad. A ellos les dedico esta Tesis. Ellos me lo han dado todo. Ellos son mi espejo y mi vida. Sé perfectamente que soy lo que soy gracias a vosotros y quiero que sepáis cuanto os admiro y que me considero la persona más afortunada del mundo por ser vuestro hijo. Mil gracias por creer en mí. Os quiero más que a nada en este mundo. Gracias mamá y papá, por ser los mejores padres, porque vuestros consejos han sido los más importantes para vencer todos y cada uno de los obstáculos de la vida, y me han servido y me servirán siempre para guiar mis pasos. Gracias por ser mi ejemplo, por transmitirme vuestro espíritu positivo ante la vida, vuestra manera de afrontar las cosas, por enseñarme a que todo puede tener solución y que a lo malo siempre hay que saber encontrarle el lado bueno. Gracias por haber sido tan luchadores y por haberos sacrificado por mí. Espero no defraudar la confianza que han depositado en mí.

Gracias al resto de mi familia por el cariño y apoyo moral y por haberme mostrado siempre su afecto e interés.

A mi Abuelo materno, que a pesar de su ausencia, para mí siempre estuvo, está y estará presente, al haber sido el verdadero artífice de toda esta realidad. Porque sé que has seguido a mi lado todo este tiempo. Porque me dejaste unos recuerdos maravillosos. Aunque la vida no te dio oportunidad para verme llegar a conseguir mis ilusiones, creo que serías muy feliz si pudieras compartir conmigo estos momentos. Te quiero, y ahora más que nunca, te echo muchísimo de menos.

Terminaré dándole las gracias a la persona más importante en mi vida. Gracias, Verónica, porque esta Tesis debes sentirla tan tuya como mía, ya que sin tí, jamás hubiera sido posible nada de lo que ahora mismo ves. Tú eres la persona que mejor me conoce y sabe lo gratificante que ha sido para mí el llevar a cabo este trabajo. Muchas de las horas aquí invertidas se las he robado a ella, y a pesar de ello, me ha prestado siempre el apoyo y cariño necesarios que sólo una gran persona puede dar. Mil gracias por compartir tu vida conmigo, por hacerme partícipe de tus ilusiones, tus deseos y tus sueños, y por permitirme ser yo el afortunado que los convierta en realidad. Gracias por quererme y por hacerme tan feliz. Tú me has sostenido en los peores momentos, tú has sido mi cómplice, mi compañera y mi conciencia. Gracias por darme ánimos y consejos,

por tu comprensión, por tu generosidad, por tu afecto y paciencia mostrados durante todo este tiempo. Gracias por ser tan humilde y honesta, tan trabajadora y tan buena persona. Gracias por brindarme tu compañía. Tú eres una de las razones de que haya tardado tanto en escribir estas páginas. Sé que sin tu apoyo nunca hubiera logrado llegar a la meta.

Y en general, estoy agradecido con todas aquellas personas que, de una manera u otra, han aportado algo en favor de esta investigación.

A todos GRACIAS. MIL GRACIAS.

A mis padres y hermanos

A Verónica

*"Conocer algo, es haber logrado las respuestas al qué,
cuándo, cómo, y por qué de ese algo"*

Sócrates

ÍNDICE

ÍNDICE DE MATERIAS.....	III
ÍNDICE DE FIGURAS.....	IX
ÍNDICE DE TABLAS.....	XIII
ABREVIATURAS.....	XVII

I. INTRODUCCIÓN.....1

II. OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO.....7

III. ANTECEDENTES.....11

3.1 Género *Trypanosoma*.....13

3.1.1 Definición.....	13
3.1.2 Clasificación.....	14
3.1.3 Morfología.....	14
3.1.4 Vector.....	16
3.1.5 Ciclo biológico.....	17
3.1.6 Epidemiología.....	18
3.1.7 Diagnóstico.....	20

3.2 Género *Leishmania*.....23

3.2.1 Definición.....	23
3.2.2 Clasificación.....	24
3.2.3 Morfología.....	25
3.2.4 Vector.....	27
3.2.5 Ciclo biológico.....	28
3.2.6 Epidemiología.....	29
3.2.7 Diagnóstico.....	33

3.3 Caracterización bioquímica y molecular de cepas.....37

3.3.1 Caracterización de <i>Trypanosoma cruzi</i>	38
3.3.2 Caracterización de <i>Leishmania Spp</i>	43

IV. MATERIAL Y MÉTODOS	49
4.1 Origen de los aislados	51
4.2 Aislamiento de los parásitos	55
4.2.1 Leishmanias aisladas de perros de Madrid.....	55
4.2.2 Aislados de Leishmanias de Colombia.....	55
4.2.3 Aislados de Leishmanias de Perú.....	56
4.2.4 Aislados de Tripanosomas de México, Perú, Panamá y Chile.....	57
4.3 Cultivo y obtención de masa celular	57
4.4 Crioconservación	58
4.5 Caracterización isoenzimática	59
4.5.1 Elección de los sistemas enzimáticos.....	60
4.5.2 Técnica de isoelectroenfoque.....	60
4.6 Análisis del ADN_K mediante enzimas de restricción	63
4.6.1 Aislamiento del ADN _K	63
4.6.2 Digestión del ADN _K con enzimas de restricción.....	66
4.7 Amplificación mediante PCR y RFLP	66
4.7.1 Leishmanias aisladas de perros de Madrid.....	66
4.7.1.1 Reacción en cadena de la polimerasa.....	66
4.7.1.2 PCR-RFLP.....	67
4.7.2 Aislados de Leishmanias de Perú y Colombia.....	67
4.7.1.3 Reacción en cadena de la polimerasa.....	67
4.7.3 Aislados de Tripanosomas de México, Perú, Panamá y Chile.....	68
4.7.1.4 Reacción en cadena de la polimerasa.....	68
4.8 Tratamiento estadístico	69

V. RESULTADOS.....	71
5.1 Leishmanias aisladas de perros de Madrid.....	73
5.1.1 Análisis isoenzimáticos.....	73
5.1.2 Digestión del ADN _K mediante enzimas de restricción.....	75
5.1.3 Amplificación mediante PCR/ RFLP.....	77
5.2 Aislados de Leishmanias de Colombia.....	78
5.2.1 Análisis isoenzimáticos.....	78
5.2.2 Digestión del ADN _K mediante enzimas de restricción.....	80
5.2.3 Amplificación mediante PCR.....	82
5.3 Aislados de Leishmanias de Perú.....	84
5.3.1 Análisis isoenzimáticos.....	84
5.3.2 Digestión del ADN _K mediante enzimas de restricción.....	87
5.3.3 Amplificación mediante PCR.....	89
5.4 Aislados de Tripanosomas de México, Perú, Panamá y Chile.....	90
5.4.1 Análisis isoenzimáticos.....	90
5.4.2 Digestión del ADN _K mediante enzimas de restricción.....	92
5.4.3 Amplificación mediante PCR.....	94
VI. DISCUSIÓN.....	95
VII. CONCLUSIONES.....	111
VIII. BIBLIOGRAFÍA.....	115
X. PUBLICACIONES GENERADAS EN ESTA TESIS.....	141

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Formas de <i>T. cruzi</i> .	16
Figura 2. Imagen de <i>Triatoma infestans</i> succionando sangre de un humano.	17
Figura 3. Ciclo biológico del género <i>Trypanosoma</i> .	18
Figura 4. Mapas de distribución mundial leishmaniasis cutánea y leishmaniasis visceral.	23
Figura 5. Taxonomía de <i>Leishmania</i> , subrayó las especies que están o han estado en tela de juicio.	24
Figura 6. Representación de los dos estadios de <i>Leishmania</i> ; A. Amastigote; B. Promastigote.	26
Figura 7. Vectores de leishmaniasis. A la izquierda imagen de un vector de leishmaniasis perteneciente al género <i>Phlebotomus</i> y a la derecha imagen de un vector de leishmaniasis perteneciente al género <i>Lutzomyia</i> .	27
Figura 8. Ciclo biológico del género <i>Leishmania</i> .	29
Figura 9. Perfil isoenzimático de los nuevos stocks de <i>Leishmania</i> aisladas de perros en el laboratorio de Salud Animal de la Escuela de Veterinaria de Madrid para los siguientes sistemas: (A) Enzima málico (EM); (B) Glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH); (C) Glucosa fosfato isomerasa (GPI); (D) Superóxido dismutasa (SOD); (E) Malato deshidrogenasa (MDH); (F) Isocitrato deshidrogenasa (IDH).	74
Figura 10. Análisis de restricción con endonucleasas del ADNk de los nuevos stocks de <i>Leishmania</i> aisladas de perros en el laboratorio de Salud Animal de la Escuela de Veterinaria de Madrid: (A) ADNk + BamHI; (B) ADNk + EcoRI; (C) ADNk + HaeIII; (D) ADNk + HinfI y (E) ADNk + MspI.	76

Figura 11.	Resultado de la amplificación por PCR de diferentes especies y aislados de <i>Leishmania</i> aisladas de perros en el laboratorio de Salud Animal de la Escuela de Veterinaria de Madrid usando los primers R174 y R758, y posterior digestión de estos productos con la endonucleasa HaeIII, a cada pocillo se le añadió 10µl de muestra.	77
Figura 12.	Perfil isoenzimático de los nuevos stocks de <i>Leishmania</i> aisladas de pacientes del Instituto Nacional de Dermatología, Colombia para los siguientes sistemas: (A) Enzima málico (EM); (B) Glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH); (C) Isocitrato deshidrogenasa (IDH); (D) Malato deshidrogenasa (MDH); (E) Glucosa fosfato isomerasa (GPI); (F) Superóxido dismutasa (SOD).	79
Figura 13.	Análisis de restricción con endonucleasas del ADNk de los nuevos stocks de <i>Leishmania</i> aisladas de pacientes del Instituto Nacional de Dermatología, Colombia: (A) ADNk + BamHI; (B) ADNk + HinfI; (C) ADNk + HaeIII; (D) ADNk + EcoRI; (E) ADNk + MspI y (F) ADNk + HindI .	82
Figura 14.	Resultado de la amplificación por PCR de diferentes especies y aislados de <i>Leishmania</i> de los nuevos stocks de <i>Leishmania</i> aisladas de pacientes del Instituto Nacional de Dermatología, Colombia usando los primers Lmj 4 y Uni 21.	83
Figura 15.	Perfiles isoenzimáticos de aislados de <i>Leishmania</i> aisladas de pacientes del Instituto Nacional de Salud de Lima, Perú para los siguientes sistemas: (A) Enzima málico (EM); (B) glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH); (C) Isocitrato deshidrogenasa (IDH); (D) 6-fosfogluconico deshidrogenasa (6-PGD); (E) malato deshidrogenasa (MDH); (F) glucosa fosfato isomerasa (GPI); (G) Superóxido dismutasa (SOD).	86
Figura 16.	Análisis de restricción mediante endonucleasas del ADNk de los nuevos stocks de <i>Leishmania</i> aisladas de pacientes del Instituto Nacional de Salud de Lima, Perú: (A) ADNk + MspI; (B) ADNk + BamHI; (C) ADNk + HinfI; (D) ADNk + HaeIII y (E) ADNk + EcoRI.	88
Figura 17.	Amplificación de los productos obtenidos por PCR de las diferentes especies de <i>Leishmania</i> y aislados de pacientes del Instituto Nacional de Salud de Lima, Perú usando los primers Uni21 y Lmj4. En cada pocillo se añadieron 10µl de producto amplificado.	89

Figura 18.

Perfil isoenzimático de los aislados pertenecientes al género *Trypanosoma* para los siguientes sistemas: (A) Glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH); (B) Glucosa fosfato isomerasa (GPI); (C) Malato deshidrogenasa (MDH); (D) Enzima málico (EM); (E) Superóxido dismutasa (SOD); (F) Isocitrato deshidrogenas (IDH).

91

Figura 19.

Análisis de restricción mediante endonucleasas del ADNk de aislados de *Trypanosoma*. (A) ADNk + BamHI; (B) ADNk + EcoRI; (C) ADNk + HaeIII; (D) ADNk + HindI; (E) ADNk + HinfI; (F) ADNk + MspI y (G) ADNk + RSAI.

93

Figura 20.

Amplificación de los productos obtenidos por PCR de las diferentes especies de *Trypanosoma* y aislados usando los primers S35 y S36. En cada pocillo se añadió 10 µl de producto amplificado.

94

Figura 21.

Dendograma basado en el análisis individual de cluster de los nuevos stocks de *Leishmania* aisladas de perros en el laboratorio de Salud Animal de la Escuela de Veterinaria de Madrid (Program Stat-Graphics version 5.0)

99

Figura 22.

Dendograma basado en el análisis individual de cluster de los nuevos stocks de *Leishmania* aisladas de pacientes del Instituto Nacional de Dermatología, Colombia (1995-2005). (Program Stat-Graphics version 5.0).

103

Figura 23.

Dendograma basado en el análisis individual de cluster de los nuevos stocks de *Leishmania* aisladas de pacientes del Instituto Nacional de Salud de Lima, Perú (2000-2005). (Program Stat-Graphics version 5.0).

106

Figura 24.

Mapa de distribución de los aislamientos. (1) Dept. Piura; (2) Dept. Amazonas; Dept. San Martín; (4) Dept. Ancash; (5) Dept. Huanuco; (6) Dept. Pasco; (7) Dept. Junín; (8) Dept. Lima; (9) Dept. Ayacucho; (10) Dept. Cuzco; (11) Dept. Madre de Dios. [nº de aislados].

107

Figura 25.

Dendograma basado en el análisis individual de cluster de los nuevos stocks de *Trypanosoma*. (Program Stat-Graphics version 5.0).

109

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1.	
Cambios en los parámetros epidemiológicos por la interrupción de la transmisión y descenso de la incidencia de la enfermedad de Chagas, 1990–2000–2006	20
Tabla 2.	
Clasificación de las distintas formas que adopta <i>Leishmania</i> a lo largo de su ciclo biológico.	26
Tabla 3.	
Especies de <i>Leishmania</i> patogénicas para humanos en el continente Americano, manifestaciones clínicas y distribución geográfica. LV: Leishmaniasis visceral; LC: Leishmaniasis cutánea; LMC; Leishmaniasis mucocutánea; LDC: Leishmaniasis difuso-cutánea.	32
Tabla 4.	
Datos de los nuevos stocks de <i>Leishmania</i> aisladas de perros en el laboratorio de Salud Animal de la Escuela de Veterinaria de Madrid.	51
Tabla 5.	
Datos de los nuevos stocks de <i>Leishmania</i> aisladas de pacientes del Instituto Nacional de Dermatología, Colombia (1995-2005).	52
Tabla 6.	
Datos de los nuevos stocks de <i>Leishmania</i> aisladas de pacientes del Instituto Nacional de Salud de Lima, Perú (2000-2005).	53
Tabla 7.	
Hospedadores Biológicos, Vectores y origen geográfico de las cepas de <i>Trypanosoma cruzi</i> .	54
Tabla 8.	
Soluciones de tinción específica para cada enzima y tampón de reacción. Tampón 1 (1 M Tris-CLH, pH 7.0) y Tampón 2 (1 M Tris-CLH, pH 8.0). *Se indica el tampón de reacción y la dilución a realizar para un volumen total de 10ml.	62

ABREVIATURAS

Abreviaturas

6-PGD	6- fosfogluodeshidrogenasa
ADN	Acido desoxirribonucleico
ADN _G	ADN genómico
ADN _K	ADN del Kinetoplasto
ADN _N	ADN nucleolar
ALAT	Alanina aminotransferasa
ARN _R	Acido ribonucleico ribosómico
ASAT	Aspartato aminotransferasa
Can L	Leishmaiasis canina
LC	Leishmaniasis cutánea
LCD	Leishmaniasis difuso-cutánea
EDTA	Acido etilen diamino tetra acético
ELISA	Ensayo inmunológico basado en una reacción enzimática
ENT	Espaciadores no transcritos
G6PDH	Glucosa 6- fosfato deshidrogenasa
GPI	Glucosa Fosfato Isomerasa
GRACE	Medio de cultivo monofásico líquido para <i>Leishmanias</i>
IDH	Isocitrato deshidrogenasa
IEF	Isoelectroenfoque
IFI / IFAT	Inmunofluorescencia indirecta
IgM	Inmunoglobulina M
IgG	Inmunoglobulina G
Kb	Kilobase
Lmj 4	5 'CTA GTT TCC CGC CTC CGAG
mA	Miliamperios
LMC	Leishmaniasis mucocutánea
MDH	Malato deshidrogenasa
EM	Enzima Málico
MEM	Minimum Essential Médium
MgCl ₂	Cloruro de Magnesio
MLEE	Multilocus Enzyme Electrophoresis

MTL	Medio de cultivo monofásico líquido para <i>Trypanosomas</i>
MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetil tiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
NaCl	Cloruro de sodio
NAD	Nicotinamida adenina dinucleótido
NADP	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NBT	Azul del nitrotetrazolio
NNN	Medio bifásico Novy-MacNeal-Nicolle
NTP _d	Desoxinucleótidos
OMS/ WHO	Organización Mundial de la Salud
Pb	Pares de bases
PBS	Tampón salino fosfato
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PGM	Fosfoglucomutasa
pI	Punto isoeléctrico
PMS	Phenazine methosulfate
R _k	Coefficiente cofenético
r.p.m.	Revoluciones por minuto
R174	5'-GGTTCCTTTCCTGATTTACG
R798	5'-GCCGGTAAAGGCCGAATAG
RAPD	Amplificación al azar de regiones anónimas del ADN
RFLP	Análisis polimórfico en el tamaño de los fragmentos de restricción
S35	5'-AAA TAA TGT ACG GGT GAG ATG CAT GA
S36	5'-GGG TTC GAT TGG GGT TGG TGT
SBFI	Suero bovino fetal inactivado
SDS-PAGE	Gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes
SMF	Sistema mononuclear fagocítico
SOD	Superóxido dismutasa
Tampón TAE	Tampón tris acetato
Tampón TE	10 mM Tris-HCL, pH 8.0, 1mM EDTA
UI	Unidades enzimáticas
Uni 21	5 'GGG GTT GGT GTA AAA TAG GCC
VIH	Virus de la inmunodeficiencia humana
LV	Leishmaniasis visceral

Z1	Zimodemo 1
Z2	Zimodemo 2
Z3	Zimodemo 3

1. INTRODUCCIÓN

Los Tripanosomátidos son protozoos flagelados capaces de parasitar a todos los grupos de animales así como plantas e insectos. Los agentes causales de graves problemas sanitarios humanos son los parásitos pertenecientes a los géneros *Trypanosoma* y *Leishmania*. Estas enfermedades son endémicas, tanto en países tropicales como, templados, donde suponen uno de los mayores problemas de salud por ser fuentes principales de morbilidad, mortalidad y perjuicio económico.

Entre dichas afecciones se encuentra la **Tripanosomiasis Africana** causada por tres subespecies de *Trypanosoma brucei*, *T. brucei rhodesiense* y *T. brucei gambiense*, ambos infectivos para humanos y animales, mientras que *T. brucei brucei* no infecta a humanos, sólo ha ganado vacuno al que produce la tripanosomiasis bovina o “nagana”. La Tripanosomiasis Humana Africana o Enfermedad del sueño, está considerada como una de las enfermedades más importantes de las que azotan al continente africano, después de la malaria (Wang, 1995). En el oeste de África se localiza *T. b. gambiense* donde ocasiona una afección crónica, y en el este de África predomina la afección aguda producida por *T. b. rhodesiense* (Bales, 1991). Las epidemias regionales de esta enfermedad son causa de grandes catástrofes sanitarias y económicas. En la actualidad se estima que hay unas 35 millones de personas afectadas, 25 millones de cabezas de ganado están en riesgo y anualmente son documentados de 6000-10000 nuevos casos humanos.

La **Tripanosomiasis Americana, Enfermedad o Mal de Chagas** es una infección generalmente asociada a condiciones socioeconómicas e higiénicas deficitarias que favorecen la proliferación de los chinches hematófagos vectores del agente etiológico: *Trypanosoma cruzi*. Se distribuye ampliamente por todo el continente americano, desde el sur de California hasta el la Republica Argentina (Días-Pinto y Schofield, 1999). La vía natural de transmisión de la enfermedad es vectorial por insectos hematófagos (chinches triatominas), pero existen otras formas secundarias de infección como, transfusión sanguínea, vía transparentaría y a través de transplantes de órganos (Brener y Gazzinelli, 1997). La enfermedad aparece inicialmente como fase aguda que desarrolla a forma crónica y sistémica que lleva de 20% a 30% de los infectados a formas graves de cardiopatía o megaformaciones digestivas. La Organización Mundial de la Salud (O.M.S.) estima que hay más de 18 millones de

personas infectadas, más de 50 millones de personas en riesgo de infección, y anualmente mueren más de 50.000 personas por cardiopatías chagasicas crónicas. El alcance de esta enfermedad plantea un problema de salud pública mundial por la migración de personas infectadas por *T. cruzi*, habiéndose registrado casos de transmisión de *T. cruzi* por productos sanguíneos en países en los que no hay transmisión vectorial del parásito, como Canadá, Estados Unidos y España (<http://www.who.int/tdr/svc/publications/tdr-researchpublications/> reporte-enfermedad-chagas).

Otra especie de *Trypanosoma* que infecta humanos pero sin producir patogenicidad es *Trypanosoma rangeli* que fue descubierto por Tejera en 1920 y comparte con *T. cruzi*, morfología, distribución geográfica (centro y sur de América), así como, una amplia variedad de hospedadores mamíferos y vectores invertebrados (*género Rhodnius*) que permite la existencia de infecciones simples y/o mixtas (Urdaneta-Morales y Tejero, 1992; Machado y col. 2000). Debido a la respuesta humoral inducida por *T. rangeli* y a la similitud antigénica con *T. cruzi*, se origina una reacción cruzada que interfiere en el diagnóstico de la enfermedad de Chagas (D'Alessandro y Saravia, 1992,1998). El principal problema de estas infecciones mixtas es la identificación exacta de los tripanosomátidos que es fundamental en la epidemiología de la Tripanosomiasis Americana.

Las Leishmaniasis son otro grupo de importantes enfermedades producidas por al menos 20 especies patógenas humanas pertenecientes al género *Leishmania* que son transmitidas por insectos dípteros hematófagos de la subfamilia *Phlebotominae* (flebotomos) y se distribuyen en regiones tropicales y subtropicales. Estas enfermedades de evolución crónica pueden localizarse en la piel y/o tejido subcutáneo con o sin adenopatías regionales (Leishmaniasis cutánea, LC), en la mucosa oronasal (Leishmaniasis mucocutánea, LMC) o afectar de forma generalizada al sistema mononuclear fagocitario (Leishmaniasis visceral, LV). El curso clínico de estas enfermedades, sintomatología, lesiones y pronóstico es muy amplio y abarca desde lesiones cutáneas de curación espontánea (LC y LMC) hasta daños viscerales letales (LV), ya que, depende por una parte del hospedador y, sobre todo, de la especie de *Leishmania* responsable.

La OMS en su 60^a asamblea (27 de Marzo de 2007) reconoció que la Leishmaniasis es endémica en 88 países en el mundo, de los que 72 están en vías de desarrollo. Se estima que existen 14 millones de personas infectadas, 350 millones de personas en riesgo de contraer la enfermedad y cada año se registran aproximadamente dos millones de nuevos casos. De este último grupo se considera que 500.000 sufrirán leishmaniasis visceral y casi 1,5 millones sufrirán leishmaniasis tegumentaria (cutánea). Además está considerada como una de las seis enfermedades tropicales de mayor importancia en términos de investigación para la búsqueda de nuevos métodos de prevención, diagnóstico y tratamiento.

2. OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO

La identificación precisa de las especies parásitas implicadas en una afección es fundamental para decidir la estrategia de tratamiento a seguir frente a la enfermedad. La caracterización de especies pertenecientes a los géneros *Leishmania* y *Trypanosoma*, además de ser necesaria para alcanzar los objetivos epidemiológicos, es importante para documentar la distribución de las especies y diseñar unas medidas de control apropiadas (Harris y col., 1998).

La confirmación parasitológica del diagnóstico es crítica porque el amplio espectro de síntomas puede ser causado por numerosos agentes etiológicos. Por otro lado, el tratamiento de estas enfermedades es caro, largo y está asociado con graves efectos tóxicos.

Debido a lo anteriormente dicho, el objetivo de este trabajo es caracterizar diferentes cepas pertenecientes a los géneros *Leishmania* y *Trypanosoma* aisladas por nuestro grupo en diferentes regiones de países tales como: Perú, México, Colombia, Chile, Panamá y España.

► PLAN DE TRABAJO

La caracterización se ha realizado por diversas técnicas bioquímicas y moleculares:

1.- Análisis isoenzimático por isoelectroenfoque en PhastSystem, usando Phast-gel IEF 3-9 (Pharmacia-LKB), utilizando diferentes sistemas enzimáticos: Enzima Mállico (EM), Glucosa 6-Fosfato Deshidrogenasa (G6PDH), Isocitrato Deshidrogenasa (IDH), Malato Deshidrogenasa (MDH), Glucosa Fosfato Isomerasa (GPI), Superóxido Dismutasa (SOD), 6-Fosfogluclucónico deshidrogenasa (6-GPD) y Fosfoglucomutasa (PGM).

2.- Análisis electroforético de los fragmentos de restricción del ADN del Kinetoplasto (ADNk) usando diferentes endonucleasas de restricción: EcoR I, Msp I, HaeIII, BamHI, Hinf I, Hind III y Rsa I.

3.- Amplificación mediante PCR de determinadas secuencias conservadas en el ADNk de Tripanosómátidos.

4.- Análisis de polimorfismos de la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP) de las especies de *Leishmania infantum* con la endonucleasa HaeIII.

3. ANTECEDENTES

3.1 Género *Trypanosoma*.

3.1.1 Definición.

El género *Trypanosoma* es uno de los más importantes dentro de la familia *Trypanosomatidae* por incluir una serie de especies causantes de enfermedades humanas importantes como *T. cruzi*, agente etiológico de la enfermedad de Chagas; *T. brucei rhodesiense* y *T. b. gambiense*, agentes etiológicos de la enfermedad del sueño; y de animales, *T. b. brucei*. Con base en el comportamiento del parásito en sus hospedadores y principalmente en el vector, el género *Trypanosoma* fue dividido en dos grupos. El primero, llamado Stercoraria, incluye a los tripanosomas (*T. cruzi*) que se desarrollan en el tubo digestivo del vector, avanzando hacia la porción intestinal con liberación de formas infectivas a través de las heces. El segundo, llamado Salivaria, incluye tripanosomas que se desarrollan inicialmente en el tubo digestivo y que posteriormente atraviesan el epitelio digestivo, migrando a las glándulas salivales donde podemos encontrar las formas infectantes que son inoculadas mecánicamente. En este grupo encontramos a *T. brucei*. La gran complejidad en el comportamiento biológico de los tripanosomátidos del género *Trypanosoma* llevó a la creación de algunos subgéneros.

Con frecuencia se habla indistintamente de *T. cruzi* y de *T. brucei* como especies hermanas. Sin embargo, pertenecen a subgéneros diferentes y por lo tanto tienen aspectos biológicos particulares: *T. cruzi* se encuentra exclusivamente en América, y *T. brucei* en África, también es frecuente referirse a estas especies como tripanosomas africanos y tripanosomas americanos.

3.1.2 Clasificación.

Dos secciones sin estatus taxonómico fueron creados por Hoare en 1972 para separar los tripanosomas de mamífero cuyo desarrollo ocurre exclusivamente en el intestino de los vectores, y son transmitidos por las heces, la sección Stercolaria, de los tripanosomas transmitidos por inoculación de formas metacíclicas en la saliva; sección Salivaria (Grisard, 2002; De Santa-Izabel y col., 2004).

Aunque la clasificación taxonómica comúnmente aceptada del género *Trypanosoma* (Levine y col., 1980; Corliss, 1994) encuadra a este parásito como se detalla a continuación:

Reino Protozoa

Subreino Protozoa

Subfilo Mastigophora

Clase Zoomastigophora

Orden Kinetoplastida

Familia Trypanosomatidae

Género *Trypanosoma*

3.1.3 Morfología de *T. cruzi*.

Como ya hemos dicho, *Trypanosoma cruzi* es un protozoo flagelado hemático que presenta diferentes formas a lo largo de la evolución de su ciclo de vida:

Forma Amastigote

Son formas tisulares que adquieren forma redondeada (Hoare, 1972) cuando el tripomastigote sanguíneo llega al tejido; penetra en la célula, acorta su cuerpo y retrae el flagelo. Aparecen en agrupaciones dentro del tejido (pseudoquistes). Presentan núcleo, kinetoplasto y carecen de flagelo (Hoare y Wallace, 1996).

Forma Epimastigote

Son las formas intermedias entre amastigotes y tripomastigotes metacíclicos (Mayer y Rocha-Lima, 1914). Son alargadas con el kinetoplasto cercano al núcleo. El flagelo surge cerca del kinetoplasto, emergiendo de la posición lateral del cuerpo y continúa alargándose sobre la superficie formando una membrana ondulante, hasta la parte terminal anterior, donde continua como flagelo libre.

Forma Tripomastigote

Son formas sanguíneas ingeridas por el vector (Urdaneta-Morales, 1983). Son formas alargadas y delgadas con terminación puntiaguda y kinetoplasto posterior al núcleo. El flagelo surge cercano a él, y emerge del lado del cuerpo donde se continúa formando una membrana ondulante estrecha con dos o tres ondulaciones hasta la parte terminal anterior, donde puede o no extenderse como flagelo libre. Dentro de estas formas existe un pleomorfismo característico:

- Formas slender (delgadas): son formas predominantes en el primer período de infección.
- Formas broad (intermedias)
- Formas scout (rechonchas)

Este pleomorfismo sanguíneo ha sido explicado de diversas formas por muchos autores, así (Morel y col., 1980) opinan que dependen de factores del parásito y del hospedador; sin embargo, otros autores consideran que la progresión de las diferentes formas depende de la cepa en cuestión (Brener y Chiari, 1965; Brener y Alvarenga, 1976; Urdaneta-Morales, 1983), permaneciendo constante para una misma cepa.

La variedad de cepas de *T. cruzi* se clasifican en dos grupos: *T. cruzi I* implicado en el ciclo de vida silvestre asociado principalmente a zarigüeyas. *T. cruzi II*, vinculado a roedores, es aislado más a menudo en el ciclo doméstico. Los parásitos de ambos grupos pueden ocasionar lesiones cardiacas pero solamente *T. cruzi II* se asocia a las lesiones digestivas (Develoux y col., 2009).

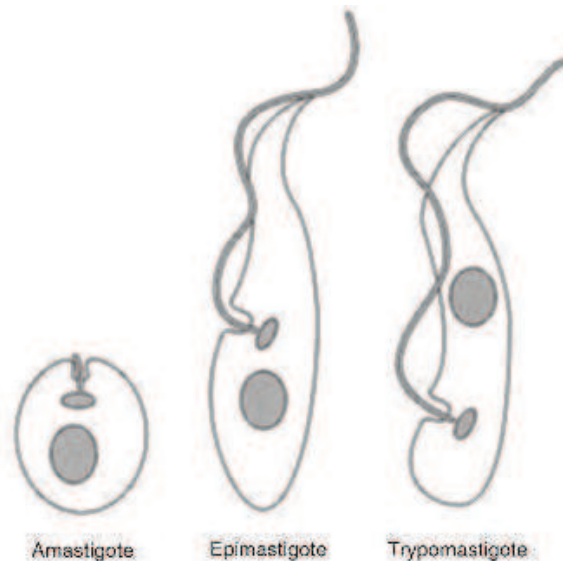


Figura1: Formas de *T. cruzi* (www.losmicrobios.com.ar)

3.1.4 Vector.

Los vectores de la enfermedad de Chagas son chinches hematófagos que pertenecen a la subfamilia *Triatominae*, familia *Reduviidae*, suborden *Heteróptera* y orden *Hemiptera*. Los triatominos son insectos nocturnos, que se ocultan durante el día y salen al anochecer, atacando mientras el individuo duerme. Poseen un potente aparato bucal succionador que les permite ingerir sangre durante aproximadamente un cuarto de hora y el chinche “engordado” tiene tendencia a defecar. Numerosas especies de la subfamilia son parásitas (géneros *Triatoma*, *Rhodnius*, *Pastrongylus* y otros). Las principales especies vectores son *Triatoma infestans*, *Triatoma dimidiata*, *Rhodnius prolixus* y *Pastrongylus megistus*, en algunos de los cuales se descubre la infección hasta en el 50% de los especímenes examinados (Vargas, 2005).

Se distribuyen principalmente por el Continente Americano. Viven más o menos asociadas a las rústicas viviendas de los campesinos, que las conocen comúnmente como, “chinches hocicones” y “cacarachuelos” en México; “pitos” en Colombia; “chinches mamones” y “chinches de monte” en Panamá; “pitos” y “chupos” en Venezuela; “chinchorros”, “chupasangre” y “chinches de caballo” en Ecuador; “hitas” en Bolivia, y “barbeiros” en Brasil. En Argentina, Chile, Uruguay y otras partes de Sudamérica se les denomina “vinchucas”; y en el Perú como: “chinches”, “chinchones” y “chirimachas” (Moncayo, 1999).



Figura 2: Imagen de *Triatoma infestans* succionando sangre de un humano.

3.1.5 Ciclo Biológico.

El parásito presenta un ciclo heteroxeno, que requiere la presencia del hospedador invertebrado (chinche triatomina) en el que se desarrollan varias fases de su ciclo biológico. El parásito penetra en el hospedador definitivo (humano u otro mamífero doméstico o selvático) a través de las heces contaminadas con las formas **tripomastigotes metacíclicos**, comportamiento característico de los parásitos pertenecientes a la sección *Stercoraria*. La forma tripomastigota del vertebrado es incapaz de multiplicarse en sangre, sin embargo, es la única capaz de evolucionar en el triatómino.

En el hospedador definitivo, las formas metacíclicas pueden invadir inmediatamente las células en la puerta de entrada o ser diseminados por la circulación linfática hasta otras localizaciones, transformándose en **amastigotes**, redondeados y con un flagelo externo muy corto o inexistente. Los amastigotes se multiplican intracelularmente, y sufren una nueva transformación hasta **tripomastigotes**, que ocasionan la lisis de la célula, permitiendo su salida al torrente sanguíneo. Estos tripomastigotes pueden infectar otras células colindantes, pero carecen de capacidad multiplicativa, ya que la única forma replicativa en el vertebrado es la forma amastigote intracelular.

Los triatominos nacen libres de infección, infectándose al alimentarse de hospedadores infectados. Los tripomastigotes migran al intestino medio del insecto, donde se transforman en **epimastigotes**. Allí se multiplican por fisión binaria un gran número de veces, dando lugar nuevamente a tripomastigotes metacíclicos, que migran al intestino posterior, desde donde son excretados con las heces en el momento de la picadura, comenzando de nuevo el ciclo (Stevens y col., 1999a, 2001).

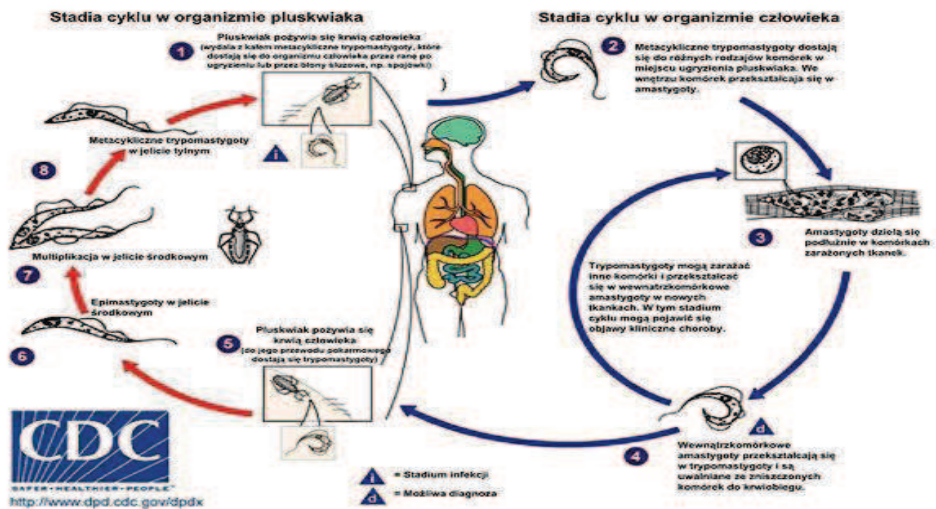


Figura 3: Ciclo biológico del género *Trypanosoma*.

3.1.6 Epidemiología.

La Tripanosomiasis Americana o Mal de Chagas es una infección endémica que ha evolucionado desde un fenómeno primitivo enzootico hasta una antroponosis. Por ello se considera que, la existencia de la enfermedad de Chagas humana es un hecho puramente accidental y una zoonosis muy compleja ampliamente extendida por América Latina donde representa una grave amenaza para la salud de los países de la región. Es una enfermedad asociada a la pobreza y a las malas condiciones de vivienda, ampliamente difundidas, en las áreas rurales de todo el continente latinoamericano y en los cinturones de pobreza alrededor de las grandes ciudades, de los países en vías de desarrollo.

La cuantificación de la enfermedad y su magnitud real como problema de salud pública se hace a través de los indicadores sensibles: presencia de vectores, seroprevalencia, enfermedad clínica y sangre infectada en bancos de sangre. Pero la lucha contra la Tripanosomiasis Americana ofrece dificultades considerables, derivadas especialmente de la extensión de los territorios afectados, la gran cantidad de personas expuestas al riesgo de la infección y la falta de un método único y económico para combatir la enfermedad eficazmente por medio de ataques colectivos en todas las condiciones epidemiológicas.

Es una enfermedad crónica, sistémica y endémica en 21 países de latino América (casi el 25 % de la población del continente sudamericano). Existe una amplia variedad de tasas de prevalencia, vías de transmisión (vectorial, congénita, transfusión y trasplante de órganos), características de los parásitos (con respecto a tropismo tisular, curvas de parasitemia, etc.), patología clínica y reservorios entre una región endémica y otra. Se estima que existen unos 100 millones de individuos que viven bajo el riesgo de infectarse, 8-11 millones de personas infectadas de las que mueren al año 14000. La enfermedad puede encontrarse desde la latitud 42° N (Norte de California) a la latitud 46° S (Sur de Argentina y Chile), sin embargo la distribución de vectores y reservorios es mayor a la de la enfermedad humana (WHO, 2009). En Centroamérica es un importante problema de salud pública, sobre todo en 4 países: El Salvador, Guatemala, Honduras y Nicaragua, donde la prevalencia estimada de la infección es del 7% (unos 2 millones de personas).

Fuera de los focos naturales de transmisión, se ha notificado la transmisión por transfusión sanguínea con creciente frecuencia, aun en países no endémicos, debido a los fenómenos masivos de migración favorecidos por los cambios económicos y sociales de las cuatro últimas décadas. Por lo que las tasas de incidencia, mortalidad y prevalencia, están en constante cambio. La Tabla 1 muestra los cambios en los parámetros epidemiológicos por la interrupción de la transmisión y descenso de la incidencia de la enfermedad de Chagas, 1990–2000–2006 (WHO, 2007).

Tabla 1: Cambios en los parámetros epidemiológicos por la interrupción de la transmisión y descenso de la incidencia de la enfermedad de Chagas, 1990–2000–2006

Parámetros epidemiológicos	1990	2000	2006
Muertes anuales	>45 000	21 000	12 500
Casos de infección humana	30 millones	18 millones	15 millones
Casos nuevos por año	700 000	200 000	41 200
Población en riesgo	100 millones	40 millones	28 millones
Número de países	21	21	21

3.1.7 Diagnóstico.

Los exámenes parasitológicos directos no evidencian las formas tripomastigotes a menos que la parasitemia sea elevada, en el momento de la fase aguda. La detección tradicional de *T. cruzi* se realiza mediante la observación directa de los tripomastigotes en una muestra de sangre, ya sea en un examen en fresco, en una extensión o gota gruesa teñida con Giemsa o después de realizar la prueba de Strout (Anez y col., 1999). Para la identificación morfológica y la diferenciación con *T. rangeli*, es necesario analizar las preparaciones teñidas con Giemsa. Los tripomastigotes de *T. cruzi* se caracterizan por un kinetoplasto prominente, que da la sensación de estar pintado por encima del cuerpo del parásito. Sin embargo, no se puede descartar la dificultad de la diferenciación morfológica de estas 2 especies; por ello, en estos casos es aconsejable recurrir a técnicas moleculares (Sturm y col., 1989; Chiurillo y col., 2003). No obstante, este inconveniente se da principalmente en la fase aguda de la infección y en zonas en las que ambos protozoos son endémicos (Saldana y col., 2005).

Cuando la parasitemia es baja (etapa crónica) es imprescindible recurrir a técnicas que permiten amplificar la presencia del parásito, o de alguno de sus componentes. Sin embargo, los exámenes parasitológicos indirectos tienen el inconveniente de no poder realizarse fuera de los laboratorios especializados y de necesitar más tiempo para obtener los resultados. Así el xenodiagnóstico necesita un número elevado de triatomas que son alimentados de forma directa o indirecta de sangre

del paciente y, transcurrido un mes, examinar las deyecciones en busca de tripomatigotes metacíclicos en movimiento.

La inoculación de animales y los hemocultivos en medio NNN tradicional (Castro y col., 2002) son igualmente menos utilizados desde que la PCR se puso a punto.

La búsqueda de anticuerpos IgG es la base del diagnóstico de la fase indeterminada o de las complicaciones tardías. Los antígenos utilizados son variables, nativos (Inmunofluorescencia, hemaglutinación, ELISA) o recombinantes (ELISA) (Umezawa y col., 2004). Pero ninguno es sensible o específico al 100%, por lo que, se recomienda realizar varios de los métodos utilizando antígenos diferentes. En caso de discordancia, habría que realizar otros test confirmatorios. En los casos de fase aguda y forma congénita, se utiliza la IgM específica.

En los últimos años, la detección de ADN mediante la PCR se ha constituido en la alternativa más accesible cuando se carece de personal especialista en la identificación y diferenciación morfológica de *T. cruzi*, con respecto a otros tripanosomátidos circulantes. La PCR de sangre es una técnica prometedora en la fase crónica, infecciones de baja parasitemia, posibles falsos negativos y sobre todo, para el diagnóstico y seguimiento de las formas congénitas (Russomando y col., 1998), así como, vigilancia de trasplantados (Diez y col., 2007).

3.2 Género *Leishmania*.

3.2.1 Definición.

Las especies del género *Leishmania* pertenecen al grupo de los protozoos tripanosomátidos. Este grupo de protozoos flagelados parásitos de la sangre y otros tejidos de vertebrados, son llamados Kinetoplástidos por la presencia de una estructura (el kinetoplasto) que se encuentra en uno de los extremos de la única mitocondria que poseen; se trata de una masa de ADN mitocondrial que se tiñe intensamente con los colorantes usuales en tinciones hematológicas.

Los protozoos parásitos del género *Leishmania* (Ross, 1903) son los agentes patógenos responsables de la leishmaniasis. Estas parasitosis están presentes en todos los continentes, excepto en la Antártida.

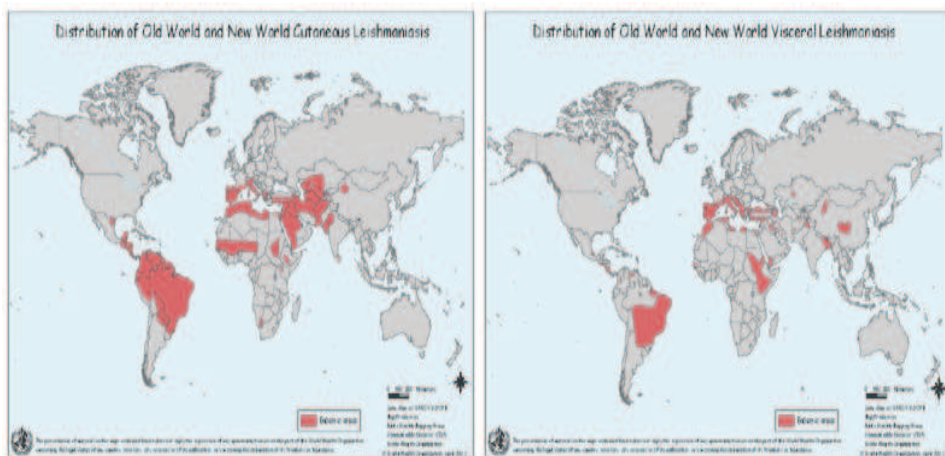


Figura 4: Mapas de distribución mundial leishmaniasis cutánea y leishmaniasis visceral (http://www.who.int/leishmaniasis/leishmaniasis_maps/en/index.html)

Un gran número de especies de animales, selváticos y domésticos, actúan como hospedadores principales y reservorios de las especies de *Leishmania* que afectan al humano (Ashford, 2000). Entre ellas destaca el reservorio canino cuya sintomatología es frecuentemente a la vez cutánea y visceral (Dereure, 1999).

3.2.2 Clasificación.

A lo largo de la historia ha habido varias clasificaciones, la clasificación más clásica incluía al parásito en el Phylum Protozoa, Clase Zoomastigofora, Orden Kinetoplastida, Suborden *Trypanosomatida* (Schmidt y Roberts, 1985). La clasificación más reciente de los protozoos propone otra localización taxonómica para el género *Leishmania* (Cavalier-Smith, 2003; Moreira y col., 2004).

El tipo de hospedador vertebrado hace posible la diferenciación de los distintos géneros de este suborden: los parásitos de mamíferos pertenecen al género *Leishmania* y los de reptiles, al género *Sauroleishmania* (Killick-Kendrick y col., 1986).

Las diferencias en el desarrollo en el interior del vector son utilizadas para definir los subgéneros. *Leishmania* (*Leishmania*), que lleva a cabo su desarrollo en las partes superior y media del aparato digestivo (desarrollo suprapilórico), mientras que *Leishmania* (*Viannia*) necesita un desarrollo adicional en la parte final del aparato digestivo (desarrollo peripilórico) (Lainson y Shaw, 1987).

Por último, las características morfológicas del parásito no permiten diferenciar las especies de *Leishmania*.

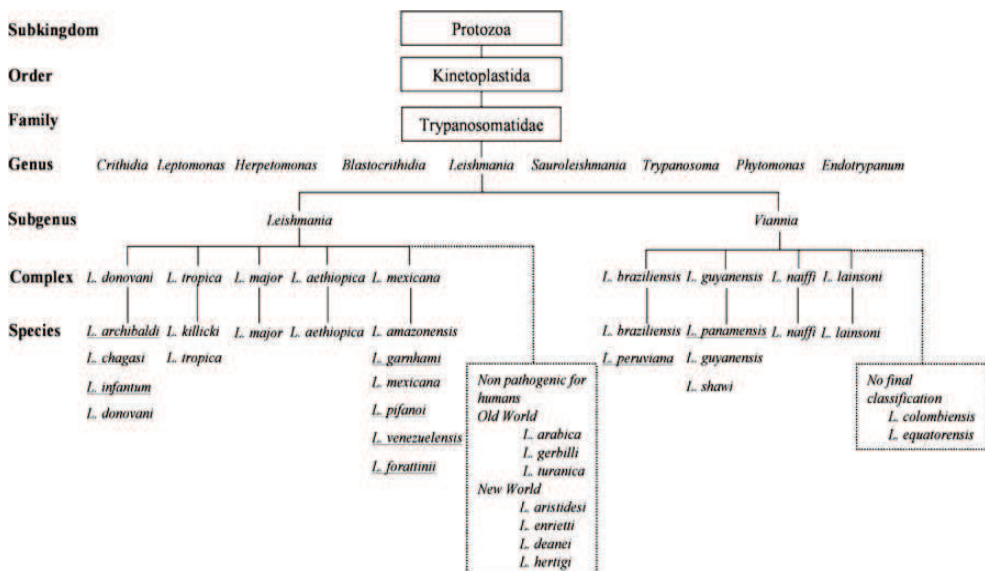


Figura 5: Taxonomía de *Leishmania*, subrayó las especies que están o han estado en tela de juicio.

3.2.3 Morfología

Leishmania tiene un ciclo de vida complejo en el que los parásitos están expuestos a diferentes ambientes extra e intracelular. Estos parásitos son digenéticos o heteroxenos, es decir, tienen dos estadios básicos en su ciclo: uno extracelular que se desarrolla en el huésped invertebrado (Phlebotomino) y un estadio intracelular en el huésped vertebrado (Trager, 1953).

Forma libre, extracelular o promastigote

El promastigote constituye la forma extracelular que se desarrolla en el aparato digestivo del flebótomo, vector de la enfermedad, y constituye la forma infectante para el hospedador vertebrado. Tiene forma alargada, de 15 a 20 μm de longitud y presenta un flagelo libre en su parte anterior que puede llegar a medir el doble de la longitud del cuerpo del parásito (Figura 6.B). La visión al microscopio electrónico muestra un núcleo central, ribosomas, retículo endoplasmático, aparato de Golgi, una única mitocondria y el kinetoplasto que aparece como un cuerpo electrodensito en la zona anterior (Lofgren, 1950; Crowther y col., 1954).

Forma aflagelada, intracelular o amastigote

El amastigote es la forma que se observa en los tejidos parasitados de los hospedadores vertebrados, generalmente en el interior de las células del sistema mononuclear fagocitario (SMF). En el interior de estas células se pueden encontrar los amastigotes englobados en una vacuola (vacuola parasitófora) que se forma tras la fusión del lisosoma y el fagosoma una vez que el parásito ha sido internalizado (Chang y Dwyer, 1978). Los amastigotes son formas ovoides con un tamaño comprendido entre 2 y 5 μm de diámetro (Crowther y col., 1954).



Figura 6: Representación de los dos estadios de *Leishmania*; A. Amastigote; B. Promastigote.

Tabla 2: Clasificación de las distintas formas que adopta *Leishmania* a lo largo de su ciclo biológico. (Rogers y col, 2002).

MORFOLOGIAS	LONGITUD	FLAGELO	ANCHURA	IMAGEN
Amastigote	Ovoide	no	2-5 μm	
Promastigote procíclico	6'5 - 11'5 μm	flagelo < cuerpo	variable	
Promastigote nectomonas	$\geq 12 \mu\text{m}$	variable	variable	
Promastigote leptomonas	6'5 - 11'5 μm	variable	variable	
Promastigote haptomonas	variable	Pequeño flagelo con forma de disco	variable	
Promastigote metacíclico	$\leq 8 \mu\text{m}$	flagelo > cuerpo	$\leq 1'0 \mu\text{m}$	

3.2.4 Vector

Leishmania es transmitida por dípteros nematóceros pertenecientes a la Subfamilia *Phlebotominae*, un total de 800 especies de vectores de leishmaniasis han sido descritas y encuadradas dentro de cinco géneros: *Phlebotomus* y *Ergentomyia* en el Viejo Mundo y *Lutzomyia*, *Brumptomyia* y *Warileya* en el Nuevo Mundo (Lewis, 1974). Aunque solamente, 70 especies, pertenecientes al género *Phlebotomus* y *Lutzomyia*, son vectores de *Leishmania*, existiendo una especificidad entre la especie de *Leishmania* y su vector.

Los flebotomos adultos son dípteros de 1'5 a 3 mm de longitud, color amarillento y alas lanceoladas. Generalmente estos insectos se alimentan de fuentes naturales de azúcar excepto en el momento de la oviposición, que recurren a la picadura para obtener sangre de mamífero que les proporcione suplementos alimenticios. Cuando los flebotomos hembra se alimentan de un individuo infectado, ingieren los macrófagos con amastigotes en su interior. En este momento comienza su papel como vector de la leishmaniasis (Craig y Faust, 1951; Kamhawi, 2006).

La especificidad existente entre el vector y el parásito depende de la composición química de la membrana peritrófica del insecto y las moléculas de superficie del promastigote. La unión de ambos evita la excreción de los parásitos y permite su desarrollo en el interior del aparato digestivo del flebótomo (Pimenta y col., 1994; Sacks y Kamhawi, 2001; Kamhawi, 2006).



Figura 7: Vectores de leishmaniasis. A la izquierda imagen de un vector de leishmaniasis perteneciente al género *Phlebotomus* y a la derecha imagen de un vector de leishmaniasis perteneciente al género *Lutzomyia*.

3.2.5 Ciclo Biológico.

La mayoría de las leishmaniasis son zoonosis en las que distintas especies animales actúan como reservorio del parásito. En su inicio se trataría de parasitosis de animales salvajes, con la introducción accidental del hombre en el ciclo bio-epidemiológico del parásito (ciclo enzoótico o primario). Al desaparecer el reservorio salvaje del entorno humano, la adopción de animales domésticos susceptibles es el origen de las leishmaniasis de carácter zooantroponótico o secundario. Finalmente, el reservorio animal puede desaparecer y el hombre actuar como único hospedador vertebrado en un ciclo antroponótico o terciario. Así, en el mantenimiento de las leishmaniasis juega un papel fundamental la existencia de mamíferos hospedadores habituales de estos parásitos que constituyen la fuente de partida para su posterior propagación al hombre a través de los flebotomos vectores. Los carnívoros, fundamentalmente los cánidos, y diferentes grupos de roedores ejercen usualmente este papel. Otras especies animales como los osos hormigueros, los perezosos, las zarigüeyas o los damanes pueden actuar también como reservorios en Sudamérica.

El inicio del **ciclo en el hospedador vertebrado** tiene lugar cuando el flebótomo le inocula con su picadura los promastigotes infectantes o metacíclicos. Una vez llegados al hospedador vertebrado son captados por los macrófagos de la dermis y pasan a su citoplasma donde son englobados en una vacuola parasitófora, el parásito se transforma en la forma amastigota y se divide activamente por sucesivas divisiones binarias. La multiplicación y desarrollo en los macrófagos finaliza cuando la célula, que contiene unas decenas de parásitos, estalla. Los parásitos libres invaden otros macrófagos de la zona, en los que se repite el proceso multiplicativo, o bien se diseminan directamente a través de la piel o de la circulación cutánea hasta alcanzar las mucosas, o son arrastrados por el torrente sanguíneo y linfático, junto a los macrófagos circulantes, para localizarse en territorios orgánicos ricos en células macrofágicas fijas (médula ósea, hígado y bazo principalmente).

El **paso del parásito al vector** tiene lugar cuando las hembras de los flebotomos se dirigen al hospedador vertebrado con objeto de ingerir sangre para alimentarse y poder desarrollar sus huevos. Las leishmanias se multiplican bajo la forma amastigota a su llegada al tubo digestivo del vector para pasar luego rápidamente a la forma

promastigota que se multiplica activamente en su estómago e intestino. Finalmente, y después de pasar por el estadio de paramastigota que también sufre procesos de división binaria, los promastigotes metacíclicos se sitúan en la región bucal o trompa del vector, desde donde pasarán al hospedador vertebrado. Este ciclo general presenta distintas modalidades en las diferentes especies de leishmanias, dependiendo de la zona del intestino en que tiene lugar la presencia y multiplicación de las formas parásitas.

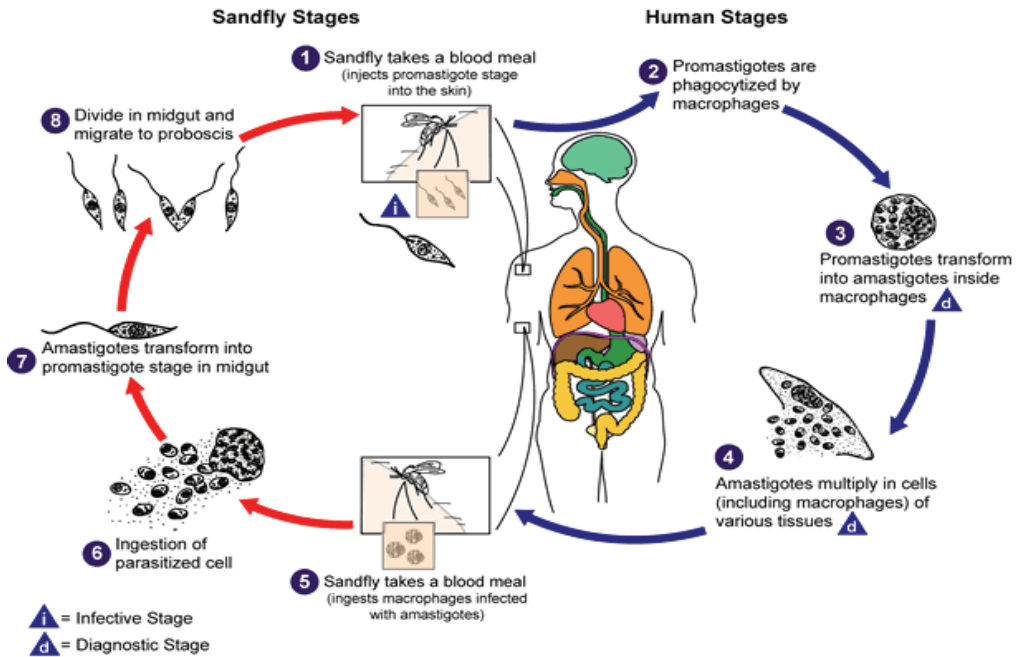


Figura 8: Ciclo biológico del género *Leishmania*.

3.2.6 Epidemiología.

La epidemiología de la leishmaniasis se puede alterar por cambios en algún punto de la triada epidemiológica (humanos, reservorios y flebótomos). Los factores ambientales, el desarrollo económico, el aumento en la urbanización, la deforestación, la migración de áreas rurales a urbanas con creación de nuevas zonas de asentamiento humano y el conflicto armado pueden ser responsables de la dispersión del vector, lo cual hace que la epidemiología de la enfermedad cambie y, por consiguiente, la distribución de las cepas de *Leishmania*.

No existe vacuna específica frente a esta enfermedad por lo que la prevención de la misma se basa en evitar la picadura de insectos. Hay que mencionar la importancia que tiene la vigilancia entomológica como principal medida de control en el manejo de la leishmaniasis, es necesario contar con información actualizada acerca de la distribución y ecología de los insectos involucrados en la transmisión para optimizar las estrategias de prevención. La distribución de las diferentes especies de *leishmania* está directamente relacionada con la distribución del insecto vector (González y col, 2006).

La leishmaniasis tanto en su forma cutánea como visceral ha sido descrita en Europa, Asia, África y América donde se puede encontrar en más de 80 países, fundamentalmente en regiones tropicales y subtropicales. El 90% de los casos de leishmaniasis cutáneas ocurren en Afganistán, Brasil, Irán, Perú, Arabia Saudí y Siria, el 90% de los casos de leishmaniasis visceral ocurren en Bangladesh, Brasil, India, Nepal y Sudán, el 90% de los casos de leishmaniasis mucocutánea ocurren en Bolivia, Colombia, Brasil y Perú. Esta enfermedad amenaza a 350 millones de personas y podría haber 14 millones de personas infectadas en todo el mundo. (<http://www.who.int/>).

En Perú se describen cuatro formas clínicas: cutánea, mucocutánea, cutánea difusa y visceral. Se estima que del 75% a 80% de los casos reportados corresponden a la forma cutánea y el 10% a 25%, a la forma mucocutánea (Robert y col., 2005). La leishmaniasis tegumentaria es endémica en dos regiones geográficas completamente diferentes en cuanto al clima y la topografía del terreno: la sierra y la selva, conociéndose como sierra a la región montañosa de la Cordillera de los Andes. En la sierra la leishmaniasis tegumentaria prevalece entre los 1,200 y 3,000 metros de altura sobre el nivel del mar y se la conoce con el nombre de UTA, región donde el clima es templado o ligeramente frío de acuerdo con la altura del lugar que se considere (Herrer, 1951) y cutáneo-mucosa metafísica o espundia en la selva, aunque también en ambas regiones pueden presentarse las dos formas (Zuño y col., 2002).

En Colombia, en el año 2005 se notificaron 18.097 casos de leishmaniasis, que representa un incremento de 3.794 casos (21,9%) al compararla con el número de casos notificados en el 2004 (Zambrano, 2006). De ellos, 17.983 casos correspondieron a la forma cutánea (99,4%), 60 (0,3%) a la mucosa y 54 a la visceral (0,3%). Es

considerada como una enfermedad endémica en casi todo el territorio con excepción de algunas zonas y la capital, Bogotá D.C (Ovalle y col., 2006).

En España la mayoría de los casos de leishmaniasis datados se producen en perro (Leishmaniasis canina) o en humanos comprometidos inmunológicamente, principalmente casos de VIH. Según datos del boletín epidemiológico del Instituto de Salud Carlos III, en España se produjeron unos 2-3 casos de leishmaniasis humana por semana en los años 2007-2008. Hasta ahora la mayor prevalencia de coinfecciones leishmania/VIH se ha dado en la zona Mediterránea, con más de 2000 casos, de los cuales el 90% se dieron en España, Francia, Italia y Portugal (Cruz y col., 2006).

La seroprevalencia de leishmaniasis canina en la mayoría de las regiones españolas es de un 5-7%, aunque se puede encontrar zonas donde la seroprevalencia es mayor. En Madrid existe una prevalencia de un 5% (Amela y col., 1995), en Granada un 12% (Acedo-Sánchez y col., 1998), mientras que Málaga presenta los mayores índices con un 34% (Morillas y col., 1996).

Tabla 3: Especies de *Leishmania* patogénicas para humanos en el continente Americano, manifestaciones clínicas y distribución geográfica. LV: Leishmaniasis visceral; LC: Leishmaniasis cutánea; LMC; Leishmaniasis mucocutánea; LDC: Leishmaniasis difuso-cutánea (Lainson y Shaw, 1998).

PAÍS	ESPECIES	FORMA CLÍNICA DE LEISHMANIASIS
ARGENTINA	<i>L. chagasi</i>	LV
	<i>L. (V) braziliensis s.l</i>	LC
BELIZE	<i>L. mexicana</i>	LC
	<i>L. (V) braziliensis s.l</i>	LC
BOLIVIA	<i>L. amazonensis</i>	LC, LDC
	<i>L. chagasi</i>	LV
	<i>Leishmania sp.</i>	LC
	<i>L. (V) braziliensis s.l</i>	LC, LMC
BRASIL	<i>L. amazonensis</i>	LC, LDC, LMC
	<i>L. chagasi</i>	LV, (LC)
	<i>Leishmania sp.</i>	LC
	<i>L. (V) braziliensis</i>	LC, LMC
	<i>L. (V) guyanensis</i>	LC, LMC
	<i>L. (V) lainsoni</i>	LC
	<i>L. (V) naiffi</i>	LC
<i>L. (V) shawi</i>	LC	
COLOMBIA	<i>L. amazonensis</i>	LC, LDC
	<i>L. chagasi</i>	LV
	<i>L. mexicana</i>	LC, LDC
	<i>L. (V) braziliensis s.l</i>	LC, LMC
	<i>L. (V) colombiensis</i>	LC
	<i>L. (V) guyanensis</i>	LC
COSTA RICA	<i>L. mexicana</i>	LC
	<i>L. (V) braziliensis s.l</i>	LC, LMC
	<i>L. (V) panamensis</i>	LC
REPÚBLICA DOMINICANA	<i>L. mexicana-like</i>	LDC
ECUADOR	<i>Leishmania sp.</i>	LC
	<i>L. (V) braziliensis s.l</i>	LC, LMC
	<i>L. (V) panamensis</i>	LC
EL SALVADOR	<i>L. chagasi</i>	LV
	<i>L. mexicana</i>	LC
GUAYANA FRANCESA	<i>L. amazonensis</i>	LC, LDC
	<i>L. (V) braziliensis s.l</i>	LC, LMC
	<i>L. (V) guyanensis</i>	LC
	<i>L. (V) naiffi</i>	LC
GUADALUPE	<i>L. chagasi</i>	LV
	<i>Leishmania sp.</i>	LC
GUATEMALA	<i>L. chagasi</i>	LV
	<i>L. mexicana</i>	LC
	<i>L. (V) braziliensis s.l</i>	LC
GUYANA	<i>L. (V) guyanensis</i>	LC
	<i>Leishmania sp.</i>	LMC

HONDURAS	<i>L. chagasi</i>	LV, LC
	<i>L. mexicana</i>	LC, LDC
	<i>L. (V) braziliensis s.l</i>	LC, LMC
	<i>L. (V) panamensis</i>	LC, LMC
MARTINIQUE	<i>Leishmania sp.</i>	LC
MEXICO	<i>L. chagasi</i>	LV
	<i>L. mexicana</i>	LC, LDC
NICARAGUA	<i>Leishmania sp.</i>	LC, LDC
	<i>L. chagasi</i>	LV
	<i>L. (V) braziliensis s.l</i>	LC, LMC
	<i>L. (V) panamensis</i>	LC, LMC
	<i>L. (V) braziliensis/panamensis</i>	LC
PANAMA	<i>L. aristedesii</i>	LC
	<i>L. (V) braziliensis s.l</i>	LC
	<i>L. (V) panamensis</i>	LC
	<i>Leishmania sp.</i>	LMC
PARAGUAY	<i>L. amazonensis</i>	LC, LDC
	<i>L. chagasi</i>	LV
PERÚ	<i>L. (V) braziliensis s.l</i>	LC, LMC
	<i>L. (V) peruviana</i>	LC
	<i>L. (V) braziliensis/peruviana</i>	LC, LMC
SURINAM	<i>Leishmania sp.</i>	LC
USA	<i>L. mexicana</i>	LC, LDC
VENEZUELA	<i>L. chagasi</i>	LV
	<i>L. garnhami</i>	LC
	<i>L. pifanoi</i>	LC, LMC
	<i>L. venezuelensis</i>	LC
	<i>L. (V) braziliensis s.l</i>	LC, LMC
	<i>L. (V) colombiensis</i>	LV
	<i>L. (V) braziliensis/guyanensis</i>	LC

3.2.7 Diagnóstico e identificación.

El diagnóstico clínico de la leishmaniasis es complicado debido al amplio espectro de manifestaciones clínicas, a menudo inespecíficas, que puede mostrar la enfermedad. Los métodos de diagnóstico más habituales incluyen la observación directa del parásito, a menudo en combinación con técnicas inmunológicas o moleculares (Reithinger y Dujardin, 2006).

La observación directa trata de demostrar que el paciente está albergando *Leishmania*, mediante la visualización, en el frotis o en la histopatología, de amastigotes en los tejidos infectados utilizando muestras biológicas de ganglio, médula, piel o, con menor frecuencia, sangre. Estos métodos siguen siendo técnicas estándar por su gran especificidad y sencillez. La muestra biológica puede usarse para realizar un frotis sobre un porta que tras ser fijado y teñido se observa al microscopio para identificar amastigotes en el interior de las células del SMF. También puede inocularse la muestra en un medio de cultivo apropiado e incubar hasta que los parásitos se multipliquen. La realización de un frotis permite la observación inmediata de la muestra mientras que el cultivo necesita varios días para permitir la diferenciación y crecimiento de los parásitos y obtener un diagnóstico. Sin embargo, la observación directa podría conducir a diagnosticar un falso negativo si la muestra que se toma no es representativa o no se realiza una tinción adecuada (Barrouin-Melo y col., 2004; Reithinger y Dujardin, 2006).

Los métodos inmunológicos e basan en la detección de la enfermedad mediante la respuesta inmune celular, y/o respuesta inmune humoral a través de anticuerpos específicos desarrollados como consecuencia de la enfermedad como son el IFI (inmunofluorescencia indirecta), ELISA (ensayo inmunológico basado en una reacción enzimática contra un antígeno adherido) o el Western-blot.

El IFI o IFAT es la técnica más utilizada por su rapidez, sencillez y posibilidad de titular ofreciendo un grado relativo de la enfermedad. Esta metodología es llevada a cabo sobre portas multipocillos con promastigotes fijados. Éstos se incuban con varias diluciones del suero a diagnosticar y posteriormente con un anticuerpo secundario marcado con un fluorocromo. Si el suero contiene anticuerpos anti-*Leishmania* éstos se unirán a los promastigotes observándose fluorescentes al microscopio (Guillén Llera y col., 2002). El IFI sigue considerándose la técnica estándar a pesar de no ser la más sensible, pues ciertos estudios han demostrado que un 38% de los resultados pueden ser falsos negativos (Reale y col., 1999).

La técnica ELISA se realiza en placas de poliestireno de 96 pocillos tapizadas con antígeno del parásito (antígeno total o una o varias proteínas con gran poder antigénico y valor pronóstico). Los sueros problema se añaden a los pocillos que

posteriormente se incuban con un anticuerpo secundario (anti-inmunoglobulina de humano) marcado enzimáticamente. La adición de un sustrato resulta en una señal colorimétrica cuya densidad óptica puede ser cuantificada obteniendo un valor numérico proporcional a la intensidad de color y al nivel de anticuerpos contra *Leishmania* (Vercammen y col., 2002; Fernández-Pérez y col., 2003; Ferreira y col., 2006).

El Western-blot permite conocer qué anticuerpos están presentes en la muestra problema o la detección de antígenos circulantes. El proceso de esta técnica comienza separando las proteínas del parásito por su peso molecular. Para ello se realiza una electroforesis en un gel de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE). Las proteínas incluidas en el gel y separadas por su peso molecular son transferidas a una membrana de nitrocelulosa sometiendo al conjunto gel-membrana a una corriente eléctrica que atrae las proteínas hacia la membrana donde quedan atrapadas. Posteriormente esta membrana es incubada con los sueros problema. Tras la incubación con un anticuerpo secundario marcado con un enzima se revela el resultado añadiendo un sustrato precipitable para que produzca una reacción enzimática colorimétrica o fotométrica. Como resultado se obtienen unas bandas correspondientes a las proteínas contra las que el individuo ha generado anticuerpos. Esta técnica es más utilizada en investigación que en diagnóstico clínico (Carrera y col., 1996; Aisa y col., 1998; Fernández-Pérez y col., 2003; Lasri y col., 2003).

Las pruebas moleculares se centran en la detección de ADN del parásito mediante PCR (reacción en cadena de la polimerasa), PCR anidada o PCR en tiempo real. Estas técnicas son las más específicas y sensibles; sin embargo resultan más costosas y necesitan un equipo técnico más amplio y personal técnico más preparado (Piarroux y col., 1993).

Para la realización de la PCR de *Leishmania* se parte de una muestra biológica (ganglio, médula, piel o sangre). Tras la extracción de ADN total o ADN de kinetoplasto se realiza la polimerización de un fragmento del genoma mediante la incubación con el enzima polimerasa, los cebadores y los nucleótidos a distintas temperaturas utilizando un termociclador (Roura y col., 1999; Inieta y col., 2002).

En el caso de la PCR anidada se necesitan dos pares de cebadores ya que se polimeriza un fragmento que se encuentra en el interior de una zona previamente polimerizada. Esta técnica es más sensible que la PCR convencional permitiendo detectar un solo parásito presente en la muestra (Fisa y col., 2001; Oliva y col., 2006).

Se han llevado a cabo varios estudios con el fin de comparar las distintas técnicas de diagnóstico existentes, confirmando que la técnica más sensible y específica es la PCR (Piarroux y col., 1994; Ikonopoulou y col., 2003; Saridomichelakis y col., 2005). Sin embargo, Moreira y col. observaron una excepción en los casos asintomáticos, donde la inmunocitoquímica mostró un 100% de especificidad frente al 95% de la PCR (Moreira y col., 2007). Asimismo se ha hallado una ausencia de correlación en casos asintomáticos entre los resultados inmunológicos y los moleculares (Iniesta y col., 2002).

3.3 CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA Y MOLECULAR DE CEPAS.

La diferencia en cuanto a la severidad de las enfermedades producidas por tripanosomátidos en el hospedador humano y en otros mamíferos, se ha atribuido al pleomorfismo natural que presentan estas cepas. Esta variabilidad en su comportamiento biológico y su heterogeneidad ha impedido establecer parámetros adecuados para su clasificación y taxonomía, haciendo que la caracterización sea una condición necesaria para el estudio y control de los tripanosomátidos (Guzmán-Marín y col., 1999).

Tradicionalmente, la identificación de los tripanosomátidos se ha basado en la observación microscópica (morfología, morfometría y movilidad de los parásitos en los tejidos de los hospedadores), tipo de hospedador y origen geográfico, así como, la presencia en un órgano específico del vector y la capacidad de estos parásitos para crecer in vivo (en un roedor o en el vector) o in vitro (Desquesnes y Dávila, 2002). Sin embargo, la descripción de cepas o especies basada en estos parámetros se ha mostrado insuficiente. Además, es frecuente encontrar infecciones mixtas entre algunas especies, como por ejemplo en el caso de *T. cruzi* y *T. rangeli* en el género *Trypanosoma*, o *L. brasiliensis* y *L. chagasi* en *Leishmania*, u otros flagelados que infectan a los mismos hospedadores y se transmiten por los mismos vectores.

Por lo tanto existe una necesidad real de diferenciar y caracterizar las poblaciones de los parásitos para mejorar el diagnóstico y tratamiento. Además, la taxonomía de estos parásitos, no está definitivamente cerrada. En general, se utilizan métodos extrínsecos, métodos basados en el fenotipo (análisis isoenzimático), frente a métodos de caracterización intrínsecos, que analizan el genoma del parásito (cariotipo molecular, enzimas de restricción, secuenciación y síntesis del ADN, las sondas de ADN y la PCR), y que son más sensibles y específicos en taxonomía, impulsado considerablemente la identificación, caracterización y la mejora del diagnóstico (Miles y col. 1977, Nunes y col. 1997, Rodríguez y col. 1998, Miralles y col. 2002; Rodríguez y col. 2007).

3.3.1. Caracterización de *Trypanosoma cruzi*.

El análisis de los perfiles isoenzimáticos es una de las técnicas que nos permiten analizar los productos de expresión génica, la electroforesis de isoenzimas (Multilocus Enzyme Electrophoresis, MLEE) es uno de los métodos empleados para detectar diferencias entre enzimas con propiedades catalíticas similares pero con distinta estructura molecular, lo que permite agrupar cepas de acuerdo a sus perfiles isoenzimáticos idénticos, que reciben el nombre de **zimodemos**.

Miles y col (1977 y 1980) introdujeron la técnica de los perfiles isoenzimáticos en el estudio de *T. cruzi* identificando 3 zimodemos en cepas de Brasil. El zimodemo 1 (Z1) es de origen selvático y circula entre animales triatomínicos selváticos y es infectivo para el hombre; el zimodemo 2 (Z2) es de origen doméstico y comprende cepas aisladas de pacientes con enfermedad de Chagas crónica y de animales domésticos; el zimodemo 3 (Z3) comprende cepas de casos humanos autóctonos de Brasil y comparte el ciclo selvático, puesto que se ha aislado de armadillos y de algunos casos humanos con la forma aguda de la enfermedad (Widner y col., 1985; Saravia y col 1987).

La existencia del Z2 donde participan hospederos selváticos y domiciliarios en el ciclo de transmisión de *T. cruzi*, señala la fuerte posibilidad de que las isoenzimas pueden ser usadas para localizar o rastrear la transferencia de parásitos del ciclo enzoótico al doméstico. También se ha reportado heterogeneidad isoenzimática relacionada con la distribución geográfica de las cepas del parásito. El Z2 se encuentra sobre todo en el centro y el oriente de Brasil donde abundan los triatomínicos domiciliarios y han sido aislados de enfermos crónicos y de animales domésticos (Miles y col., 1981).

Una importante contribución a la caracterización enzimática fue reportada por Steinder y col., (1994), quienes usaron 16 cepas de *T. rangeli*, de las cuales 8 fueron aisladas de *Rhodnius prolixus* y de pacientes de Honduras, Colombia y Venezuela, mientras que las otras 8 cepas se tomaron de *Panstrongylus megistus* o roedores (*Echimys dasythrix*) del estado de Santa Catarina, al sur de Brasil. Los autores estudiaron las enzimas Aspartato aminotransferasa (ASAT), Alanina aminotransferasa

(ALAT), fosfoglucoisomerasa (GPI), Fosfoglucomutasa (PGM), y la Enzima málico (ME), encontrando que todas las cepas de Santa Catarina fueron isoenzimáticamente idénticas, mientras que las cepas de Honduras, Colombia y Venezuela también formaron un grupo altamente homogéneo. Los dos grupos presentaron diferentes patrones para todas las enzimas, excepto para la enzima málico, sugiriendo la existencia de dos grupos diferentes de cepas de *T. rangeli* (Steinder y col., 1994; Guhl y Vallejo, 2003).

En 1995 Steinder y col caracterizaron 59 aislados de *T. cruzi* utilizando 6 sistemas isoenzimáticos. El dendograma final agrupó a 54 (91.5%) de éstos aislados como pertenecientes al zimodemo Z1, 3 (5.1%) aislados pertenecientes al zimodemo Z2 y las 2 (3.4%) restantes pertenecían a una mezcla de ambos zimodemos (Z1 y Z2) (Steindel y col., 1995).

Esta técnica también es útil para estudiar subpoblaciones clonadas de una cepa, las cuales presentan diferencias entre sus patrones isoenzimáticos respecto a la cepa patrón, demostrando que las cepas del parásito pueden ser heterogéneas en su composición (Penin y col. 1998).

Algunos autores reportan que han detectado inestabilidad en los patrones electroforéticos isoenzimáticos después de pases sucesivos de las cepas por hospederos vertebrados e invertebrados y por medios de cultivo (Brenner, 1985; Magalhaes y col., 1996). También se ha demostrado la existencia de patrones isoenzimáticos diferentes según la etapa del ciclo biológico en que se encuentra el tripanosoma, según el número de bandas, posición e intensidad de las mismas, dando lugar a zimodemos distintos. Esto puede ser parte del proceso regulatorio asociado con cambios metabólicos y morfológicos del parásito (Bogliolo y col. 1986; Higo y col. 2004).

La conclusión principal de estos estudios fue que la estructura de la población de *T. cruzi* es clonal, más que sexual y, por consiguiente, la actual variabilidad biológica genética es el resultado de la evolución independiente de líneas de clones (www.who.int/tdr, Julio 2007).

En 1980 Morel y col fueron los pioneros en desarrollar la técnica de los **esquizodemos**, método sencillo y rápido, considerado complemento del método isoenzimático para caracterizar cepas de *T. cruzi*, aisladas de vectores y por hemocultivo y de pacientes con la enfermedad de Chagas (Morel y col. 1980). Estos autores establecieron los patrones de polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción o RFLP (del inglés *Restriction Fragment Length Polymorphism*) de los minicírculos de ADNk de diversas cepas de *T. cruzi*. Esta técnica, desarrollada a finales de los 70, se basa en la acción de endonucleasas de restricción capaces de encontrar dianas específicas en la secuencia de ADN (de cuatro a seis nucleótidos), y cortar en tantos fragmentos como dianas existan. La detección de fragmentos de ADN de distinto peso molecular es mediante separación por electroforesis y se visualizan en geles de agarosa. Los fragmentos más fáciles de analizar son los pequeños derivados de la digestión del genoma de las mitocondrias o los cloroplastos, puesto que delecciones, sustituciones o mutaciones pueden alterar significativamente el patrón de bandas identificable por electroforesis en geles de agarosa, donde migran de acuerdo con su peso molecular. En los tripanosomátidos, la técnica de RFLP se ha venido realizando digiriendo el ADNk previamente separado del ADNg, y los fragmentos obtenidos se denominan de manera particular esquizodemos, los cuales presentan unos patrones útiles en estudios de caracterización del parásito (Morel y col., 1980; Angelici y col., 1989; Pacheco y col., 1995). En cambio, para moléculas de ADN de mayor tamaño, como el ADN cromosómico, el patrón de bandas es tan complejo que es necesario utilizar sondas específicas para visualizar sólo ciertos fragmentos mediante la técnica de Southern Blot. Aunque la RFLP evalúa sólo un tipo de polimorfismo en cada ensayo, el resultado es muy preciso. Los primeros mapas genómicos basados en la distribución física de los genes en vez de la frecuencia de entrecruzamiento se hicieron utilizando esta técnica. Los datos confirmaron la alta variabilidad intra-específica genética, una vez fueron obtenidos los patrones característicos de diferentes cepas (a esto se le llamó eschizodemos). Los patrones de RFLP del ADNk se exploraron y se puso de manifiesto que podían existir diferentes cepas de parásitos circulando en un mismo hospedador.

Se conoce bastante sobre el análisis por las enzimas de restricción del ADNk de *T. cruzi*, pero está mucho más restringido este análisis en *T. rangeli*. En 1981 Frasci y col. analizaron el ADNk de seis cepas simpátricas de *T. cruzi*. Los patrones de EcoRI

son altamente heterogéneos, característica de la región del minicírculo de *T. cruzi* y contracta con los perfiles de los fragmentos de restricción homogéneos de *T. rangeli*.

Carneiro y col. (1991) estudiaron cepas provenientes de pacientes chagásicos crónicos de Brasil que pertenecían a diferentes zimodemos y esquizodemos agrupándolas de acuerdo a su virulencia.

Todas las cepas presentaron parasitemia independiente de los zimodemos y esquizodemos a los que pertenecían, confirmando la heterogeneidad encontrada por patrones isoenzimáticos y los de restricción (Carneiro y col., 1991).

Zavala-Castro y col. (1992) determinaron que los fragmentos de restricción de los maxicírculos del ADNk son útiles en la formación de agrupaciones de cepas del parásito y que correlacionan con el árbol filogenético que se forma por la hibridación del ADN total de los parásitos contra la sonda del ADN ribosomal. Lo importante de este método es la estabilidad y conservación que presentan a través del tiempo los kinetodemos obtenidos (Zavala-Castro y col., 1992).

La técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) mejoró el estudio de las poblaciones de *T. cruzi*. Sturn y col. 1989 amplificaron la región variable del minicírculo y usaron el producto amplificado (330 pb) como sustrato para una posterior digestión con endonucleasas de restricción. Y en los últimos años se han utilizado técnicas de amplificación del ADN y de la subunidad pequeña del ribosoma (18S) del *T. cruzi*, para la caracterización de especies, para estimar la distancia fenotípica entre las cepas (Oliveira y col. 1998), así como, su uso como método de diagnóstico parasitológico en las diferentes etapas de la enfermedad, permitiendo no solamente reconocer la presencia de *T. cruzi* en sangre sino también caracterizar las cepas circulantes (Noireau, 1999, Morel y col. 1980).

El estudio genético de los tripanosomatidos puede desarrollarse mediante la amplificación al azar de regiones anónimas del ADN (RAPD). Mediante el uso de diversos primers se amplifican secuencias anónimas y las secuencias resultantes pueden usarse para construir árboles genéticos. El análisis por RAPD de cepas de *T. cruzi* ha

mostrado altos niveles de similitud entre cepas pertenecientes al mismo zimodema (Tibayrenc y col, 1993; Steindel y col., 1993).

En 2002, Rodríguez y col analizaron seis cepas colombianas de *T. cruzi*, procedentes de distintas regiones geográficas del país, huéspedes y ciclos de transmisión, mediante las técnicas de amplificación aleatoria del ADN polimórfico (RAPD) utilizando 5 endonucleasas diferentes, también se sometieron estas cepas a análisis isoenzimático en el que se utilizaron 13 sistemas enzimáticos diferentes y a la técnica de polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (RFLP) usando como sonda el gen que codifica para la histona H2A del parásito. Se encontró que las distancias genéticas entre los aislados varían considerablemente (Rodríguez y col., 2002).

Santos y col en 2002 publicaron los resultados de unos estudios recientes sobre genes bien definidos, estos resultados han revelado que *T. cruzi* puede ser dividido en dos grandes linajes filogenéticos, conocidos como *T. cruzi I* y *T. cruzi II*, en aislados clínicos de cinco regiones representativas de Brasil, utilizando los espaciadores internos transcritos que flanquean el gen 5.8S del ARN_R. Estas regiones fueron amplificadas por PCR y los productos fueron digeridos con seis enzimas de restricción antes de ser sometidos a análisis de RFLP en geles de poliacrilamida. Los resultados fueron utilizados para la construcción de un complejo árbol evolutivo, en el que las cepas fueron agrupadas en dos grandes linajes filogenéticos con un bajo nivel de similitud. Para investigar la relación evolutiva entre los aislamientos, productos de la PCR fueron clonados y secuenciados. Los resultados del posterior análisis filogenético confirmaron la presencia de los dos principales grupos de *T. cruzi* y demostraron que el Zimodemo 3(un tercer subgrupo isoenzimático), está más cerca de *T. cruzi I* que de *T. cruzi II* (Santos y col., 2002).

Se han reportado otros trabajos sobre caracterización molecular de *T. cruzi* donde utilizan los espaciadores no transcritos (ENT) del ARN ribosomal y los fragmentos de restricción de los maxicírculos del ADNk para formar agrupaciones que filogenéticamente coincidan, estos fragmentos reciben el nombre de kinetodemos (Dietrich y col., 1990; Zavala-Castro y col., 1992).

Esta complejidad se puso de manifiesto también mediante el análisis del ADNk por polimorfismo de longitud del fragmento de restricción amplificado al azar (RAPD) (Morel y col., 1980), los análisis de otros estudios revisados, sugieren una casi absoluta individualidad genética de los clones del parásito. De hecho, los tres **zimodemos** originales se convirtieron en 43 poblaciones estudiándose una gama más amplia enzimas (Tibayrenc y col., 1986). La reconstrucción filogenética de estos **zimodemos** permitió la identificación de dos grandes grupos, cada uno exhibiendo una considerable variabilidad genética. (Tibayrenc, 1998).

Más recientemente, con la identificación de marcadores de ADN nuclear se ha construido un consenso sobre la existencia de dos grandes linajes filogenéticos en *T. cruzi* (Liarte y col., 2008). El linaje 1 corresponde al **zimodemo Z2**, mientras que el linaje 2 corresponde al **zimodemo Z1**. Las cepas pertenecientes al **zimodemo Z3** no se pueden clasificar ni en el linaje 1 o 2 (Mendonça y col., 2002). La ecológica y los datos moleculares sugieren que las cepas Z3 están más relacionados con el linaje 1 que al linaje 2, pero su filogenia exacta es muy controvertida (Kawashita y col., 2001).

En general, los regímenes propuestos por diferentes autores sobre la base de bioquímica y genética han convergido en una visión de conjunto. En un esfuerzo por unificar la nomenclatura se propuso la agrupación de las cepas de *T. cruzi* en dos grupos principales que fueron recientemente llamado *T. cruzi* I y II, (Buscaglia y Noia, 2003). Sin embargo, la evidencia indica que esta clasificación filogenética es preliminar y debe tomarse como una evolución de marco teórico para el estudio de las poblaciones de *T. cruzi*. Además, dentro de estos dos grupos, deben considerarse varios subgrupos diferentes (Souto y col., 1996; Brisse y col., 2000; Henriksson y col., 2002; Robello y col., 2000; Machado y Ayala, 2000).

3.3.2. Caracterización de *Leishmania* spp.

La marcada diversidad fenotípica de *Leishmania* ha dado lugar a una compleja taxonomía de más de 20 especies descritas, la mayoría en América Latina (Lainson y Shaw, 1987). Dada la complejidad epidemiológica de algunas de las regiones, con una distribución muy heterogénea de parásitos, la transmisión de los ciclos de las diferentes

especies pueden superponerse y varias especies pueden encontrarse en el mismo punto focal de la enfermedad (Lucas y col., 1998). La intensa migración humana, así como el turismo, puede extender y propagar a *Leishmania* más allá de sus lugares ecológicos tradicionales de distribución (Victoir y col., 2003), esto justifica la necesidad de tipificar las especies en circulación. Es decir, la capacidad de distinguir entre especies de *Leishmania* es crucial a la hora de prescribir el tratamiento, así como la hora de determinar posibles medidas de control en los estudios epidemiológicos. Con frecuencia, se identifican las especies de *Leishmania* sobre la base de su distribución geográfica y sobre las manifestaciones clínicas de la enfermedad resultante. Sin embargo, la procedencia geográfica es un criterio insuficiente en áreas no endémicas, así como en regiones endémicas, donde múltiples especies de *Leishmania* pueden coexistir. La identificación de las especies infecciosas basado en los síntomas clínicos puede ser problemático, porque varias especies provocan enfermedades cutáneas y mucocutáneas mientras que otras causan enfermedad cutánea y visceral (Schönian y col., 2003).

Diversos métodos de caracterización se han aplicado al estudio de este género, tales como la electroforesis de isoenzimas (Chance y Walton, 1982; Shamsuzzaman y col., 2000; Belhadj y col., 2003; Rodríguez-González y col. 2006 y 2007), el análisis del ADN del kinetoplasto (ADNk) (Gramiccia y col., 1992; Rodríguez-González y col. 2006 y 2007), la técnica de ADN polimórfico amplificado al azar (RAPD) (Tybairnc y col., 1993; Giuziani y col. 2002) y el cariotipaje molecular (Marfurt y col., 2003a). En los últimos años, la PCR, seguida de la restricción del producto amplificado (PCR-RFLP) se ha convertido en una herramienta importante, no sólo para la identificación, sino también para la caracterización, las especies de este género, en diferentes áreas geográficas (Quispe Tintaya y col., 2004, García y col., 2005).

Mediante el uso de zimodemos (análisis isoenzimático), en el Nuevo Mundo se establecieron las diferencias bioquímicas entre *L. amazonensis*, *L. braziliensis* y *L. guyanensis* (Miles y co., 1980). Además el subgénero *Viannia* fue estudiado con profundidad (Evans y col., 1984) y el papel de los reservorios y vectores en las especies americanas se resolvió aislando los parásitos de ellos y tipificándolos mediante

isoenzimas. En el Viejo Mundo se aplicó esta técnica para la separación de *L. tropica* y *L. major* (Aljeboori y Evans, 1980).

En 1979 (Rassam y col. 1979) consiguieron caracterizar 43 stocks del género *Leishmania* aislados de diferentes órganos de diferentes pacientes, determinando que 37 de estos aislados se podían clasificar como *L. major* y los 6 restantes como pertenecientes a *L. tropica*. Desde esta fecha hasta la actualidad, han sido numerosos los autores que utilizando esta técnicas han caracterizados diferentes aislado del género *Leishmania* (Lucas y col. 1994; Travi y col. 1994; Ibrahim y col. 1995).

En el 2000 Knio y col aislaron 27 cepas de *leishmanias* en las heridas de pacientes que presentaban leishmaniasis cutánea. Los aislados fueron posteriormente estudiados por análisis de isoenzimas utilizando 13 sistemas isoenzimáticos, en este estudio se utilizaron 8 leishmanias del viejo mundo como cepas de referencia. Contrariamente a lo esperado la mayoría de los aislados se relacionaron con el complejo *Leishmania donovani*, más concretamente como la especie *Leishmania infantum* (Knio y col., 2000). En otro estudio realizado en el año 2000 se caracterizaron 5 aislados de leishmanias de pacientes que padecían Kala-azar mediante análisis isoenzimático, se utilizaron 11 sistemas enzimáticos comparando los perfiles de estos con los perfiles resultantes para 5 cepas de referencia (Shamsuzzaman y col., 2000).

En 2004 Moheballi y col aislaron y caracterizaron varias cepas de leishmanias aisladas de diferentes roedores en distintas áreas de Irán por análisis isoenzmáticos y por análisis moleculares. Utilizando 12 sistemas enzimáticos vieron que la mayoría de estas infecciones estaban causadas principalmente por 2 especies: *L. donovani* y *L. infantum*, que *L. major* estaba presente en 4 especies de roedores: *Rhombomys opimus*, *Meriones libycus*, *Tatera indica* y *Meriones hurrianae* y que *L. turanica* solo fue encontrada en una especie de roedor: *Rhombomys opimus* (Moheballi y col., 2004).

En 2004 Calvopina y col aislaron 6 cepas procedentes de lesiones cutáneas de 6 pacientes en la región subtropical de Ecuador. Tras el análisis isoenzimático de estas 6 cepas utilizando 11 sistemas enzimáticos se identificaron 5 de ellas como *L. (V) panamensis* (Calvopina y col., 2004).

En el año 2005 Hosseini y col lograron caracterizar varias cepas de *Leishmanias* aisladas de soldados que se inmunizaron en la guerra entre Iraq e Iran por análisis isoenzimáticos utilizando 11 sistemas enzimáticos, comparando los resultados con los perfiles isoenzimáticos mostrados por *L. major*. De estos 11 sistemas enzimáticos los que lograron una mayor diferenciación de estas cepas fueron la enzima Glucosa6-fosfato deshidrogenasa y la fosfoglucomutasa (Hosseini y col., 2005).

En el año 2006 Khatri y col estudiaron el perfil clínico-epidemiológico de la leishmaniasis cutánea en Yemen, así como la identificación de las especies de leishmanias responsables de la enfermedad. De un total de 136 personas incluidas en el estudio (96 mujeres y 40 hombres) y tras el análisis por electroforesis de isoenzimas utilizando 15 sistemas enzimáticos, los resultados revelaron que *L. tropica* es la especie responsable de la leishmaniasis cutánea en este País (Khatri y col., 2006).

La caracterización de las diferentes especies de leishmanias mediante el estudio de ADN ha sido otra de las vías ampliamente utilizadas en la identificación de especies de este género. Ya en 1997 Minodier y col, lograron caracterizar 30 cepas de leishmanias aisladas de médula ósea, sangre periférica y piel de un total de 33 pacientes en Marsella (sur de Francia) mediante PCR y posterior digestión de los productos amplificados por PCR con la endonucleasa Hae III (RFLP) (Minodier y col., 1997).

Harris y col en 1998 utilizaron la PCR para la detección de todas las especies de leishmanias del nuevo mundo y para la diferenciación de los tres complejos de leishmanias del nuevo mundo, mostrando la utilidad que tiene esta técnica para una rápida identificación de los complejos de leishmania existentes (importante en estudios epidemiológicos), su utilidad en el diagnóstico clínico y la detección de parásitos de leishmania en reservorios y vectores la leishmaniasis, particularmente cuando estos tres complejos están presentes en la misma región geográfica. Para ello utilizaron unos primers que amplifican unas secuencias de oligonucleótidos altamente conservadas en el genero *Leishmania* (LU-5A; LB-3C; LM-3A Y LC-3L) (Harris y col., 1998).

En 1999 Grisard y col aislaron 4 cepas de *Leishmania* de pacientes con leishmaniasis cutánea, estas cepas se caracterizaron por PCR entre otras técnicas, dos de

estos cuatro aislados se identificaron como *L. (Leishmania) amazonensis* y dos como *L. (Viannia) braziliensis* (Grisard y col., 2000).

Marfurt y col en 2003 consiguieron diferenciar 22 especies del género *leishmania* del nuevo mundo (*L. naife*, *L. panamensis*, *L. peruviana*, *L. braziliensis* y *L. guyanensis*) y viejo mundo (*L. donovani*, *L. infantum*, *L. topica*, *L. killicki*, *L. aethiopia* y *L. mayor*) amplificando por PCR la región del miniexón del ADNk utilizando los primers **Fme** y **Rme** y haciendo una posterior digestión de estos productos amplificados con las endonucleasas Eae I y Hae III (PCR-RFLP) (Marfurt y col., 2003b).

Volpini y col en 2004 utilizaron la PCR-RFLP para diagnosticar la leishmaniasis cutánea e identificar a 2 de las especies que pueden producir esta enfermedad en el continente Americano como son: *L. (V) braziliensis* y *L. (L) amazonensis* (Volpini y col., 2004).

Recientemente, Montalvo y col, reportaron la utilidad de la amplificación y posterior digestión del producto amplificado (PCR-RFLP) como una buena técnica destinada a la identificación de especies de *leishmania* del nuevo mundo, así como para especies de tripanosomas demostrando su aplicabilidad al estudio de muestras clínicas. En este estudio, los patrones de bandas obtenidos tras la digestión enzimática, utilizando la enzima Hae III, les permitió establecer diferencias entre las cepas estudiadas: *L. guyanensis* y *L. lainsoni* se diferenciaban entre sí y estas a su vez de *L. mexicana* y *L. amazonensis* (Montalvo y col., 2006).

Tojal da Silva y col, aislaron 40 cepas de *Leishmania* procedentes de cincuenta pacientes que padecían leishmaniasis cutánea en Rio Branco (Brasil). 30 de estos aislados fueron caracterizados e identificados por análisis isoenzimático, PCR y PCR-RFLP. 16 cepas fueron identificadas como *L. (V) braziliensis*, 12 como *L. (V) lainsoni*, 1 como *L. (V) guyanensis* y una como un híbrido de *L. (V) naiffi* y *L. (V) lainsoni* (Tojal da Silva y col., 2006).

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1. Origen de los aislados.

Para la realización de la presente memoria hemos estudiado un total de 74 nuevos tripanosomátidos, aislados de diferentes áreas geográficas de países tales como: España, Colombia, Perú, Panamá, México y Chile. De estos nuevos aislados, 59 cepas pertenecían al género *Leishmania* y 15 al género *Trypanosoma*.

El origen y las características de las cepas caracterizadas vienen reflejados en las siguientes tablas: Tabla 4; Tabla 5; Tabla 6 y Tabla 7.

Tabla 4: Datos de los nuevos stocks de *Leishmania* aisladas de perros en el laboratorio de Salud Animal de la Escuela de Veterinaria de Madrid.

Código del laboratorio	Código Internacional	Procedencia	Hospedador
UCM 9	-----	Madrid (España)	<i>C. familiaris</i>
UCM 12	-----	Madrid (España)	<i>C. familiaris</i>
UCM 14	-----	Madrid (España)	<i>C. familiaris</i>
UCM 17	-----	Madrid (España)	<i>C. familiaris</i>
UCM 20	-----	Madrid (España)	<i>C. familiaris</i>
UCM 21	-----	Madrid (España)	<i>C. familiaris</i>
UCM 45	-----	Madrid (España)	<i>C. familiaris</i>
UCM 75	-----	Madrid (España)	<i>C. familiaris</i>

Tabla 5: Datos de los nuevos stocks de *Leishmania* aisladas de pacientes del Instituto Nacional de Dermatología, Colombia (1995-2005).

Código del laboratorio	Datos del paciente			
	Manifestación Clínica	Sexo	Edad	Procedencia
LL 01	Cutánea	F	31	Guaviare
LL 03	Cutánea	M	25	Cauca
LL 04	Cutánea	M	20	Casanare
LL 05	Cutánea	M	34	Valle del Cauca
LL 08	Cutánea	M	20	Santander
LL 09	Cutánea	F	36	Cundinamarca
LL 012	Cutánea	M	39	Cundinamarca
LL 035	Cutánea	F	48	Cundinamarca
LL 092	Cutánea	M	24	Casanare
LL 104	Cutánea	M	50	Vichada
LL 106	Cutánea	M	38	Guaviare
LL 109	Cutánea	F	13	Cundinamarca
LL 110	Cutánea	M	20	Vichada
LL 113	Cutánea	M	33	Santander
LL 119	Cutánea	M	31	Boyaca
LL 125	Cutánea	M	55	Boyaca

Tabla 6: Datos de los nuevos stocks de *Leishmania* aisladas de pacientes del Instituto Nacional de Salud de Lima, Perú (2000-2005).

Código del laboratorio	Manifestación Clínica	Datos del paciente		
		Sexo	Edad	Procedencia
LP20	Cutáneo-selvática	M	26	Huanaco
LP21	Cutáneo-selvática	F	10	Pasco
LP22	Cutáneo-selvática	F	13	Junin
LP23	Cutáneo-selvática	M	24	Junin
LP24	Cutáneo-selvática	M	22	San Martín
LP25	Cutáneo-diseminada	M	53	Junin
LP26	Cutáneo-andina	M	25	Cuzco
LP28	Cutáneo-selvática	M	62	Piura
LP29	Cutáneo-andina	M	40	Piura
LP30	Cutáneo-selvática	F	50	Piura
LP31	Cutánea	M	38	Cuzco
LP32	Cutáneo-selvática	F	17	Junin
LP33	Cutáneo-andina	F	33	Amazonas
LP35	Cutáneo-andina	F	69	Amazonas
LP36	Cutáneo-andina	F	13	Junin
LP37	Cutáneo-selvática	M	6	Huanuco
LP38	Cutáneo-selvática	M	62	Piura
LP39	Cutáneo-andina	F	64	Lima
LP40	Cutáneo-andina	F	72	Ayacucho
LP41	Cutáneo-selvática	M	22	Cuzco
LP42	Cutáneo-andina	M	19	Ayacucho
LP43	Cutáneo-selvática	M	23	San Martín
LP44	Cutáneo-selvática	F	49	Junin
LP45	Cutáneo-andina	M	12	Lima
LP46	Cutáneo-selvática	M	21	Huanuco
LP47	Cutáneo-andina	F	32	Ancash
LP48	Cutáneo-selvática	M	40	Madre de Dios
LP50	Cutáneo-selvática	M	23	Madre de Dios
LP51	Cutáneo-selvática	M	47	Madre de Dios
LP52	Cutáneo-selvática	M	20	Madre de Dios
LP53	Cutáneo-selvática	M	18	Madre de Dios
LP54	Cutáneo-andina	F	55	Ancash
LP55	Cutáneo-selvática	F	38	Madre de Dios
LP56	Cutáneo-andina	M	29	Piura
LP57	Cutáneo-selvática	M	31	San Martín

Tabla 7: Hospedadores Biológicos, Vectores y origen geográfico de las cepas de *Trypanosoma cruzi*.

Código del laboratorio	Código Internacional	Procedencia	Vector/hospedador
TMF	-----	Chile	<i>Homo sapiens</i>
TW3539	-----	Chile	<i>Homo sapiens</i>
TH5	-----	Mérida (México)	<i>Homo sapiens</i>
TH7	-----	Mérida (México)	<i>Homo sapiens</i>
TH4	-----	Mérida (México)	<i>Homo sapiens</i>
TH17	-----	Mérida (México)	<i>Homo sapiens</i>
TP 27	-----	Perú	<i>Homo sapiens</i>
TP 34	-----	Perú	<i>Homo sapiens</i>
TP 59	-----	Perú	<i>Homo sapiens</i>
TCMP1	-----	Campeche (México)	<i>Homo sapiens</i>
TH1	-----	Mérida (México)	<i>Homo sapiens</i>
TCMP2	-----	Campeche (México)	<i>Homo sapiens</i>
TCPa 1	-----	Panamá	<i>Rhodnius pallicepedes</i>
TCPa 3	-----	Panamá	<i>Rhodnius pallicepedes</i>
TCPa 4	-----	Panamá	<i>Rhodnius pallicepedes</i>

4.2. Aislamiento de los parásitos.

4.2.1. Leishmanias aisladas de perros de Madrid.

Las ocho nuevas cepas de *Leishmania* fueron aisladas de perros en la provincia de Madrid por el grupo del profesor José María Alunda en el Laboratorio de Salud Animal, Escuela de Veterinaria (Madrid, España). Incluimos en el estudio, tres cepas de referencia de *L. (L.) infantum*, pertenecientes al zimodemo MON-1: MCAN/ES/01/UCM1, MCAN/ES/02/UCM6 y MCAN/ES/00/UCM11 (Bulle y col., 2002).

Las nuevas cepas fueron aisladas de sangre de perros enfermos de Leishmaniasis. Para lo que, en primer lugar se le realizó un frotis con una muestra de sangre sobre un porta que tras ser fijado y teñido se observa al microscopio en busca de formas amastigotas en el interior de las células del SMF (Sistema Mononuclear Fagocitario). Una vez obtenidos los aislados fueron enviados a nuestro laboratorio del Departamento de Parasitología de la Universidad de Granada, donde se cultivaron in vitro como se describirá a continuación (Apartado 4.3).

4.2.2. Aislados de Leishmanias de Colombia.

Las dieciséis cepas fueron aisladas de pacientes por dermatólogos en la consulta especial de Leishmaniasis del Instituto Nacional de Dermatología de Bogota D.C (Colombia) en el periodo comprendido de 1995 a 2005. Todos los pacientes presentaban diagnóstico confirmado de leishmaniasis cutánea, la historia clínica fue revisada y se extrajo información relacionada con la forma clínica, sitio probable de infección, edad, sexo y procedencia del paciente (Tabla 5).

La muestra se obtuvo por aspiración del borde de las lesiones cutáneas, que se caracterizaban por múltiples placas ulceradas con bordes violáceos infiltrados de diferentes tamaños, localizadas en varios sitios anatómicos. El aspirado se colocó en medio de Seneckjie, se incubó a 27 °C y se observó durante cinco semanas. Los parásitos aislados se cultivaron en medio de Schneider *Drosophila* (Sigma Chemical

Co.) suplementado con suero fetal bovino al 10%, inactivado. Una vez que el cultivo de parásitos se encontraba en fase logarítmica de crecimiento, estos aislados se enviaron desde el laboratorio del Instituto Nacional de Dermatología de Bogotá D.C (Colombia) a nuestro laboratorio en Granada y se cultivaron in vitro como se describe en el apartado 4.3.

Se usaron 8 cepas de referencia:

- *L. peruviana* (MHOM/PE/1984/LC26)
- *L. guyanensis* (MHO/BR/75/M4147)
- *L. colombiensis* (IHAR/CO/85/CL500)
- *L. braziliensis* (MHOM/BR/1975/M2904)
- *L. panamensis* (MHOM/PA/71/LS94)
- *L. mexicana* (MHOM/BZ/82/BEL21)
- *L. amazonensis* (MHOM/BR/73/PH8)
- *L. chagasi* (MHOM/BR/74/PP75)

4.2.3. Aislados de Leishmanias de Perú.

Las treinta y cinco nuevas cepas de *Leishmania* fueron aislados de origen humano, a partir de lesiones cutáneas, mucocutáneas y viscerales, en el Instituto Nacional de la Salud de Lima (Perú), por la doctora Gloria Minaya. Estos parásitos se aislaron de forma similar como se ha descrito anteriormente en la cepas de origen colombiano. Los detalles de los aislados vienen reflejados en la Tabla 6.

Las cepas de referencia que se usaron para la caracterización de estos 35 aislados son las mismas que se citan en el apartado 4.2.2.

4.2.4. Aislados de Tripanosomas de México, Perú, Panamá y Chile.

Se trata de aislados de humanos procedentes de las provincias de Yucatán y Campeche. Fueron facilitados por el Doctor Mario Barrera del Centro de Investigaciones Regionales “Dr. Hideyo Noguchi” (Universidad Autónoma de Yucatán). Los detalles de su aislamiento vienen reflejados en la Tabla 7.

En total, son quince aislados los presentes en este estudio. Se incluyeron seis cepas de referencia ya caracterizadas, son las siguientes:

- *T. cruzi* cepa Maracay (MHOM/VE/1994/ Maracay)
- *T. cruzi* 1 (TPRX/CO2000/Cas7)
- *T. cruzi* cepa Y (MHOM/BR/0000Y)
- *T. cruzi* cepa CL (TINF/BR/1963/CLBrener)
- *T. rangeli* sousa (MHOM/PA/2000/SA)
- *T. rangeli* (IRECU/PE/2002/TRa605)

4.3 Cultivo y obtención de masa celular.

Las cepas aisladas pertenecientes al género *Leishmania* se cultivaron como formas promastigotas y las pertenecientes al género *Trypanosoma* se cultivaron como formas epimastigotes. Como modo de precaución en todas las fases iniciales de los cultivos se complementó a dilución 1/10 de una mezcla antibiótica y antimicótica (*GIBCO*[®] 15240) para evitar contaminación por bacterias, hongos y levaduras. Los cultivos exentos de contaminantes fueron clonados y transferidos a frascos de cultivo celular de 75 ml (Roux) con medio de cultivo monofásico líquido MTL/ GRACE suplementado con un 10% de SBFI (suero bovino fetal inactivado a 56° C durante 30 minutos) a 27° C.

Las cepas de referencia de ambos géneros fueron mantenidas en nuestro laboratorio mediante sucesivos pases en medio bifásico Novy-MacNeal-Nicolle (NNN) con una fase líquida de medio MEM (Minimum Essential Médium) o MTL (Medium for Trypanosome Liquid) (Ruiz-Pérez y col., 1986).

Tras ser adaptados los nuevos aislados al medio de cultivo, los tripanosomátidos fueron clonados mediante diluciones sucesivas. Para llevar a cabo los estudios de caracterización bioquímica y molecular fue necesaria la obtención de una densidad celular aproximada de 2.10^7 cél/ml, contada en la cámara hemocitométrica de Neubauer. Esta masa celular se consiguió tras partir de aproximadamente 500 ml de medio de cultivo de cada aislado cultivado libre de cualquier tipo de contaminación. Este volumen de cultivo se centrifugó en ciclos de 2500 rpm durante 10 minutos, finalmente se procedió al lavado del pellet o precipitado obtenido con tampón PBS (pH 7.4), centrifugándolo 2 veces en las mismas condiciones que anteriormente. Desechamos el sobrenadante y nos quedamos con el pellet limpio de medio de cultivo que se guardó a -20° C hasta su utilización.

4.4 Crioconservación.

Mediante la congelación en nitrógeno líquido logramos mantener una línea celular durante mucho tiempo. Para deshidratar la célula usamos un agente crioprotector como es el dimetilsulfóxido o glicerol, que es un soluto de bajo peso molecular y por ello permeable a la membrana plasmática que protegen a esta congelación. Cuando en el medio extracelular ocurre la cristalización se forma hielo puro, dejando los solutos progresivamente más concentrados en la fracción líquida a medida que el cambio de fase progresa. De esta manera las células en suspensión deben deshidratarse para mantener el equilibrio osmótico con un medio extracelular cada vez más hipertónico y permaneciendo así congeladas (Bosio, 2001).

Hay que indicar que la densidad de crecimiento óptima para congelar los parásitos es de aproximadamente 1.10^6 cél/ml. Es importante también que en el momento de la congelación la temperatura descienda de forma gradual, evitando cambios bruscos que pueden llegar a romper las células. Para que esto sea posible se guardan en un contenedor Cryo 1° C (Nalgene) que contiene alcohol isopropílico, de modo que la temperatura desciende a una velocidad de 1° C/min.

Procedimiento:

(Todo este procedimiento debe hacerse en condiciones de esterilidad, evitando de esta forma posibles contaminaciones por bacterias, hongos o levaduras)

1. Centrifugamos nuestro cultivo de parásitos en fase logarítmica de crecimiento a 1500 rpm durante 10 minutos.
2. Retiramos el sobrenadante y añadimos al pellet 5 ml de Medio de Congelación (medio de cultivo más 10% de glicerol estéril), resuspendiendo dicho pellet.
3. Repartimos las células en medio de congelación en viales de 1,5 ml de capacidad.
4. Introducimos los viales en un tanque de isopropílico y éste a su vez, en el congelador de -80°C durante 24 horas.
5. Pasado este tiempo, guardamos nuestros viales en Nitrógeno líquido hasta su uso posterior.

Por último, indicar que la recuperación de los parásitos se obtiene por descongelación rápida, en una estufa de 37°C , con el fin de evitar destruir las estructuras intracelulares, aun así, alrededor del 10% de los parásitos muere en este proceso.

4.5 Caracterización isoenzimática.

Las isoenzimas, enzimas que catalizan el mismo sustrato, tienen una migración diferente en la electroforesis y son el reflejo directo del polimorfismo del ADN. Las diferencias de migración observadas, traducen diferencias en cuanto a la carga neta de las proteínas estudiadas. Estas diferencias de cargas son el reflejo de la estructura primaria (secuencias de aminoácidos) de las proteínas en cuestión, la cual depende directamente de la secuencia de ADN que codifica la proteína.

4.5.1 Elección de los sistemas enzimáticos.

Se han elegido los siguientes sistemas enzimáticos por su claridad de revelación e interpretación y por su significación en el metabolismo energético de los tripanosomátidos presentes e este estudio: Enzima málico (EM) [E.C.1.1.1.40], Malato deshidrogenasa (MDH) [E.C.1.1.1.37], Isocitrato deshidrogenasa (IDH) [E.C.1.1.1.42], Glucosa fosfato isomerasa (GPI) [E.C.5.3.1.9], Glucosa 6 fosfato deshidrogenasa (G6PDH) [E.C.5.3.1.9], Fosfoglucomutasa (PGM) [E.C.2.7.5.1], 6-fosfogluconico deshidrogenasa (6-PGD) [E.C.1.1.1.44] y Superóxido dismutasa (SOD) [E.C.1.15.1.1].

4.5.2 Técnica de isoelectroenfoque.

Los flagelados obtenidos según se ha descrito en el apartado 4.2 fueron resuspendidos a una densidad de 2.10^7 células/ml en 2 ml de una solución hipotónica, compuesta por 2mM ditioneitol, 2mM ácido n-aminocaproico y 2mM EDTA (Golfrey y Kilgour, 1976). Para asegurar la lisis de estos organismos se sometieron a ultrasonidos en un aparato sonicador (Vibra Cell, Sonics y Materials Inc Danubury CT, USA), sumergiendo la sonda 1 cm en el líquido en intervalos de 30 segundos 3 veces, teniendo un periodo de reposo de 1 minuto entre cada intervalo.

Una vez lisados los parásitos fueron centrifugados a 3500 rpm durante 10 minutos a 4°C (Sánchez-Moreno y col. 1992). El proceso fue continuado con el sobrenadante que se desalinizó en una columna P-10 (Sphadex G-25) (GE Healthcare).

Seguidamente, se determinó la concentración de proteínas mediante el método Bradford (Bradford, 1976) y se hicieron alícuotas en tubos eppendorff a una concentración entre 10-20 µg/µl de proteína y se almacenaron a -80°C hasta su utilización.

Las muestras se separaron mediante isoelectroenfoque de pH (pI) 3-9 en geles de poliacrilamida (Phast-gel IEF-3-9), usando el aparato Phast-System (Pharmacia). Siguiendo el protocolo del programa del aparato, los geles se sometieron a un

preenfoque bajo las siguientes condiciones: 2000mV; 2,5 mA; 3,5 W; 75Vh. Y en segundo lugar, se pincha la muestra en el gel. Aunque el punto de aplicación de la muestra no es crítico pues las moléculas siempre se desplazan hacia la región de su pI, con objeto de conseguir una mejor visualización de los resultados aplicamos la muestra de la solución proteica (10-20 µg/µl) según la enzima a revelar en la parte ácida, básica o central del gel. El tercer paso es la migración de la muestra el gel conteniendo los anfólitos (el corrido se realizó a 2000 V; 2,5 mA; 3,5 W; 15 Vh, con un número total de 410 Vh).

Una vez finalizada la electroforesis, los geles fueron colocados en una placa de Petri, donde se llevó a cabo el proceso de revelado siguiendo los procedimientos descritos por Ben Abderrazak y col. (1993) que se reflejan a continuación (Tabla 8).

Tabla 8: Soluciones de tinción específica para cada enzima y tampón de reacción. Tampón 1 (1 M Tris-CLH, pH 7.0) y Tampón 2 (1 M Tris-CLH, pH 8.0). *Se indica el tampón de reacción y la dilución a realizar para un volumen total de 10ml.

ENZIMA	TAMPÓN DE REACCIÓN*	SOLUCIÓN DE TINCIÓN
GPI	1(1/4)	10mg fructosa 6 fosfato, 5 UI glucosa 6 fosfato deshidrogenasa, 50 mg MgCl ₂ , 5 mg NADP, 1,2 MTT, 3mg PMS.
IDH	2(1/10)	10mg D-L-ácido isocítrico, 50 mg MgCl ₂ , 5 mg NADP, 1,2 MTT, 3mg PMS.
MDH	2(1/10)	0,9ml ácido málico pH=7.0 (D-L-ácido málico), 4 mg NAD, 1,2 MTT, 3mg PMS.
EM	1(1/4)	0,6ml ácido málico pH=7.0 (D-L-ácido málico) ,50 mg MgCl ₂ , 5 mg NADP, 1,2 MTT, 3mg PMS.
G6PDH	1(1/4)	5mg fructosa 6 fosfato, ,50 mg MgCl ₂ , 5 mg NADP, 1,2 MTT, 3mg PMS.
6-PGD	2(1/4)	10mg ácido fosfogluconico, 50 mg MgCl ₂ , 5 mg NADP, 1,2 MTT, 3mg PMS.
PGM	2(1/4)	20mg glucosa 1 fosfato, 8 UI glucosa 6 fosfato deshidrogenasa, 50mg MgCl ₂ , 5 mg NADP, 1,2 MTT, 3mg PMS.

Para revelar la actividad SOD se utilizó el revelado negativo donde se determina la inhibición de la reducción del azul del nitrotetrazolio (NBT) fotoquímicamente según lo descrito por Beyer y Fridovich (1987). Los geles fueron sumergidos en 10 ml de una solución stock (27 ml de tampón fosfato potásico 50mM, pH 7.8; 1,5 ml L-metionina (300 mg/10ml), 1ml de NBT (14,1 mg/10ml) y 0,75 ml de 1% (v/v) Tritón X-100),

adicionándole 100 µl de una solución de riboflavina (4,4 mg/100 ml), incubándose bajo luz a temperatura ambiente hasta la aparición de las bandas.

4.6 Análisis del ADNk mediante enzimas de restricción.

4.6.1 Aislamiento del ADNk.

El ADNk fue aislado según el procedimiento de Gonçalves y col. (1984), que a continuación se detalla:

- 1- Se toma una concentración de aproximadamente $5 \cdot 10^9$ células obtenidas como se ha descrito anteriormente.
- 2- Resuspendemos el pellet en 2,5 ml de tampón de lisis (10 mM Tris HCL pH 8.0, 100 mM EDTA, pH 8.0, 20 µg/ml Pancreatic Rnase y 0.5 % SDS) y una vez resuspendidos se adicionan 100 µl de proteinasa k (20 mg/ml) y 100 µl de N-lauril-sarcocine al 30 % (3gr/10ml). Dejamos incubando 3 horas a 60° C o bien toda la noche a 60° C en agitación suave.
- 3- Centrifugamos 3 horas a 15000 rpm y 4° C. En el sobrenadante tenemos el ADN nuclear y en el pellet el ADNk, a continuación decantamos y eliminamos el sobrenadante(o guardar si interesa el ADN_N) teniendo la precaución de que no resuspender el precipitado.
- 4- Resuspendemos nuevamente el precipitado obtenido en la primera centrifugación (ADNk) en 10 ml de Tampón TE (10 mM Tris-HCL, pH 8.0, 1mM EDTA).
- 5- Se vuelve a centrifugar 3 horas a 15000 rpm y 4° C.
- 6- Volvemos a decantar eliminando nuevamente el sobrenadante y nos quedamos con el pellet (asegurarse de que eliminamos todo el sobrenadante, si fuera

- necesario limpiar las paredes del tubo con papel para eliminar los posibles restos de sobrenadante que haya podido quedarse adherido).
- 7- Resuspender el pellet en un volumen mínimo de 300 μ l de Tampón TE y pasar a Eppendorf en alícuotas de 150 μ l.
 - 8- Añadimos un volumen igual (150 μ l) de fenol cloroformo alcohol-isoamílico (1:1) saturado con 50 mM Tris pH 7,4 100 mM NaCl.
 - 9- Mezclamos la mezcla por inversión suave en varios tiempos y centrifugamos durante 2 minutos a T° ambiente en microfuga de alta velocidad (13200 rpm).
 - 10- Extraemos la parte acuosa superior (sobrenadante) y la pasamos a otro Eppendorf con cuidado de no coger parte de la interfase.
 - 11- Repetir el proceso 3 veces más, sustituyendo el fenol cloroformo alcohol-isoamílico por tampón TE desde el punto 8 juntando toda la parte acuosa en mismo Eppendorf.
 - 12- Medir el volumen recogido de la parte acuosa y añadirle 3 volúmenes más de éter-etílico saturado con agua (1:1).
 - 13- Centrifugamos 2 minutos y quitamos el éter (fase superficial) por aspiración.
 - 14- Dejar a 37° C durante 30 minutos para permitir que se evapore todo el éter (el tiempo puede sufrir variaciones, lo dejaremos hasta que se haya evaporado todo el éter, es recomendable dejarlo varias horas evaporando).
 - 15- Medir el volumen que tenemos juntándolo todo en un solo tubo calibrado.
 - 16- Añadir 3 volúmenes de etanol absoluto (muy frío), tapamos con papel parafilm y agitamos.

- 17- Dejar 12 horas como mínimo a -20°C , para que precipite todo el ADNk.
- 18- Centrifugar 30 minutos a 13200 rpm en microfuga de alta velocidad. Tras la centrifugación eliminaremos el sobrenadante (lo decantamos) y continuamos hasta que no nos quede mas volumen (el pellet que se observa es ya ADNk).
- 19- Resuspendemos muy bien el pellet en 120 μl de tampón TE y se deja en reposo a 4°C durante 30 minutos para permitir que se hidrate el ADNk.
- 20- Medir la concentración de ADNk en espectrofotómetro a 260 y 280 nm.

MEDIDA DE LA CONCENTRACIÓN DEL ADNk

- 1- Tomar 20 μl de ADNk y le añadimos 480 μl de TE (preparamos un blanco con 500 μl de TE), a continuación medir la concentración ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ADNk) en espectrofotómetro a 260 nm y a 280 nm y anotar los resultados.
- 2- Calcular la cantidad de ADNk presente utilizando la siguiente relación.

$$ADNk = A_{260} \times \text{dilución } 25 \times 0,05 \mu\text{g}/\mu\text{l}$$

$$ADNk = A_{260} \times 1,25 \mu\text{g}/\mu\text{l}$$

4.6.2 Digestión del ADNk con enzimas de restricción.

Las endonucleasas son enzimas que cortan el ADN en secuencias específicas dentro de la molécula de ADN (Granner, 1992). Estas enzimas se encuentran en una amplia variedad de especies bacterianas y su función biológica consiste en reconocer y romper el ADN ajeno que pueda penetrar en la célula (por ejemplo, ADN procedente de bacteriófagos).

Una vez aislado el ADNk fue digerido con las siguientes endonucleasas de restricción (EcoRI, MspI, HindIII, HinfI y BamHI, Hae III y RasI), bajo las condiciones y tampones recomendados por la casa comercial suministradora (Boehringer®). La digestión de 1µl (3µg ADNk / µl) de cada una de las muestras se realizó a 37°C durante 3 horas y los productos resultantes de las mismas fueron sometidos a electroforesis en geles de agarosa al 1,3% en tampón TAE 1X, (0,04 M Tris-Acetato, 0,001 M EDTA, pH 8,0), tal y como describieron Riou y Yot (1977). El tamaño de los fragmentos obtenidos fue determinado por comparación de sus movilidades con las del marcador utilizado de 1 Kb ADN ladder (Gibco BRL). Los geles fueron teñidos con bromuro de etidio (10 µg/ml durante 10 min). Finalmente el resultado fue fotografiado bajo luz ultravioleta con una cámara Olympus Camedia digital camera, C-4000 Zoom.

4.7 Amplificación mediante PCR y RFLP.

4.7.1 Leishmanias aisladas de perros de Madrid.

4.7.1.1 Reacción en cadena de la polimerasa.

El ADNk extraído según el método descrito anteriormente y adjunto en el anexo 4.6.1, fue sometido al análisis PCR que amplifica una parte de los genes que codifican la subunidad pequeña del ARNr (ssu rRNA) de *Leishmania* (Van Eys y col., 1992). Se usaron unos primers específicos para *Leishmania* spp. (Brenière y col., 1999).

R174 (5-GGTTCCCTTTCCTGATTTACG-3)

R798 (5-GCCGGTAAAGGCCGAATAG-3)

Estos primers generan unos fragmentos de aproximadamente 600 pb. La PCR fue realizada en un volumen final de 50 µl de mezcla de reacción que comprende 5 µl de ADNk, Tampón PCR, 4 mmol/L MgCl₂, 250 µmol/L de NTP_d, 1 µmol/L de cada primers y 1 U de Gold star Taq polimerasa. Las reacciones fueron realizadas en un MyCycler™ Thermal Cycler (BioRad®) en los siguientes ciclos: Predesnaturalización a 95° C durante 5 minutos, 35 ciclos de con los siguientes cuatro pasos (desnaturalización 60° C por 30 segundos, anillaje a 72° C por 30 segundos y a 95° por 30 segundos, extensión a 60° C por 30 segundos.), y finalmente una extensión final a 72° C durante 10 minutos. También se incluyó un control negativo, sin ADNk. Seguidamente, los productos de amplificación fueron sometidos a electroforesis en gel de agarosa al 1.3 % que contiene 0.5 µg/ml de bromuro de etidio, finalmente se visualizaron los resultados en un transiluminador de luz ultravioleta y fotografiados con una cámara Olympus Camedia digital camera, C-4000 Zoom.

4.7.1.2 PCR-RFLP

La PCR-RFLP ADNk se hizo según el protocolo descrito por (Volpini y col., 2004). Se cogieron 5µl del producto amplificado por PCR a los que se les añadió 1U HaeIII (Boehringer-Ingelheim, Barcelona, España) y se incubaron a 37° C durante 3 horas. El producto digerido fue sometido a electroforesis en gel de agarosa al 1.3 % que contiene 0.5 µg/ml de bromuro de etidio y fotografiado con una cámara Olympus Camedia digital camera, C-4000 Zoom.

4.7.2 Aislados de Leishmanias de Perú y de Colombia.

4.7.2.1 PCR

Se usaron una pareja de cebadores diseñados en base a la secuencia publicada de los micrósculos de ADNk de *L. major*. El oligo Uni 21 es homólogo de la secuencia conservada (5 'GGG GTT GGT GTA AAA TAG GCC 3'), y primer Lmj 4 se diseñó en base a la región variable (5 'CTA GTT TCC CGC CTC CGAG 3') (Anders y col., 2002).

Las reacciones de amplificación fueron realizadas en un volumen final de 25 μ l de mezcla de reacción que comprende 1 μ l de ADNk, 2.5 μ L 10X Tampón (Promega), 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM de cada nucleótido 1 μ L de cada primers y 1.25 Taq polimerasa (Promega).

La amplificación se hizo en termociclador MyCycler™ Thermal Cycler (BioRad®) con el siguiente programa: Predesnaturalización a 94° C por 5 minutos, 36 ciclos con el siguiente perfil; Desnaturalización a 94° C por 1 minuto, alineaje a 54° C por 1 minuto y elongación a 72^a C por 1.5 minutos, seguidos de una extensión final a 72^a C por 10 minutos. El resultado esperado es de fragmentos de tamaño comprendido entre 150-500 pb.

También fue ensayado un control negativo, sin ADNk. Seguidamente, los productos de amplificación fueron sometidos a electroforesis en gel de agarosa al 1.3 % que contiene 0.5 μ g/ml de bromuro de etidio y su posterior visualización en un transiluminador de luz ultravioleta etidio y fotografiado con una cámara Olympus Camedia digital camera, C-4000 Zoom.

4.7.3 Aislados de Tripanosomas de México, Perú, Panamá, y Chile.

4.7.3.1 PCR

Una vez extraído el ADNk se procedió a la amplificación de determinadas secuencias mediante PCR. Los iniciadores elegidos para este lote de tripanosomátidos se denominan S35/S36, se trata de primers que amplifican la región variable de los minicírculos del ADNk de *T. cruzi*.

S35 5'-AAA TAA TGT ACG GGT GAG ATG CAT GA-3'

S36 5'-GGG TTC GAT TGG GGT TGG TGT-3'

El tamaño generado de los fragmentos amplificados es de 330 pb y 760 pb de la región variable para *T. cruzi* y *T. rangeli*, respectivamente (Sturm y col., 1989).

Las reacciones de amplificación fueron realizadas en un volumen final de 25 μ l de mezcla de reacción que comprende 1 μ l de ADNk aislado, 2.5 μ L 10X tampón

(Promega), 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM de cada nucleótido, 25 μM de cada primers y 1.25 U Taq polimerasa (Promega). También fue ensayado un control negativo, sin ADNk.

La amplificación se hizo en termociclador MyCycler™ Thermal Cycler (BioRad®) con la siguiente rutina térmica: 5 minutos a 94° de predesnaturalización, 36 ciclos con el siguiente perfil: Desnaturalización a 94° C por 1 minuto, alineación a 60° C por 1 minuto, elongación y extensión a 72° C por 10 minuto. Seguidamente, los productos de amplificación fueron sometidos a electroforesis en gel de agarosa al 1.3 % que contiene 0.5 μg/ml de bromuro de etidio, su posterior visualización en un transiluminador de luz ultravioleta etidio y fotografiado con una cámara Olympus Camedia digital camera, C-4000 Zoom.

4.8 Tratamiento estadístico.

El tratamiento estadístico se basó en el análisis Cluster Jerárquico por individuos, seleccionando la distancia Euclídea al cuadrado como la base para medir las asociaciones entre individuos. La distancia Euclídea al cuadrado fue calculada según los procedimientos de agrupación siguientes: el acoplamiento simple (R K 0.7355), el acoplamiento medio entre grupos (R K 0.7518), el acoplamiento medio (R K 0.7726), el método del centroide (R K 0.7586), el método de mediana (R K 0.7204), y el método de Sala (R K 0.7570). El coeficiente cofenético (R k) mide el grado de distorsión entre relaciones, es decir, las distancias originales entre individuos y aquellos que quedan al final del análisis. El que presentaba la correlación cofenética más alta fue escogido como el método óptimo.

En los procedimientos de selección el acoplamiento medio entre grupos fue considerado, usando el coeficiente R K de R, el cual, es un índice de semejanza entre clasificaciones. Este análisis fue hecho con el programa StatGraphics, versión 5.0.

5. RESULTADOS

5.1 Leishmanias aisladas de perros de Madrid.

5.1.1 Análisis isoenzimáticos.

El empleo de seis sistemas enzimáticos nos ha permitido caracterizar a los aislados de perros de la provincia de Madrid por isoelectroenfoque de pI 3-9, usando un Phas-System (Pharmacia) y geles de poliacrilamida (**Material y Métodos apartado 4.5.2**).

En la figura 9 se muestran los perfiles isoenzimáticos correspondientes a los seis sistemas (EM; G6PDH; GPI; IDH; MDH y SOD) que se caracterizaron por el número de bandas y por su movilidad.

En general, podemos decir que estos seis sistemas revelaron pocas variaciones en cuanto al número de bandas y a su movilidad electroforética. Todos los aislados mostraron dos perfiles isoenzimáticos, para las enzimas G6PDH, GPI y SOD (Figura 9. B, C y D).

Las 3 cepas de referencia tienen el mismo número de bandas y movilidad electroforética para la IDH y la SOD (Figura 9.F y D. Líneas 5, 9 y 11). Las cepas UCM 6 y UCM 1 comparten el mismo patrón para los enzimas EM y MDH (Figura 9.A y E. Líneas 5 y 11), mientras que las cepas UCM 1 y UCM 11 tienen el mismo perfil para las enzimas: G6PDH y GPI (Figura 9.B y C. Líneas 11, y 9).

Las enzimas EM, MDH e IDH presentaron un perfil diferenciable para los aislados UCM 45, UCM 17 y UCM 21, entre si y a su vez diferente de los otros aislados (Figura 9.A, E y F, líneas 6, 2 y 7).

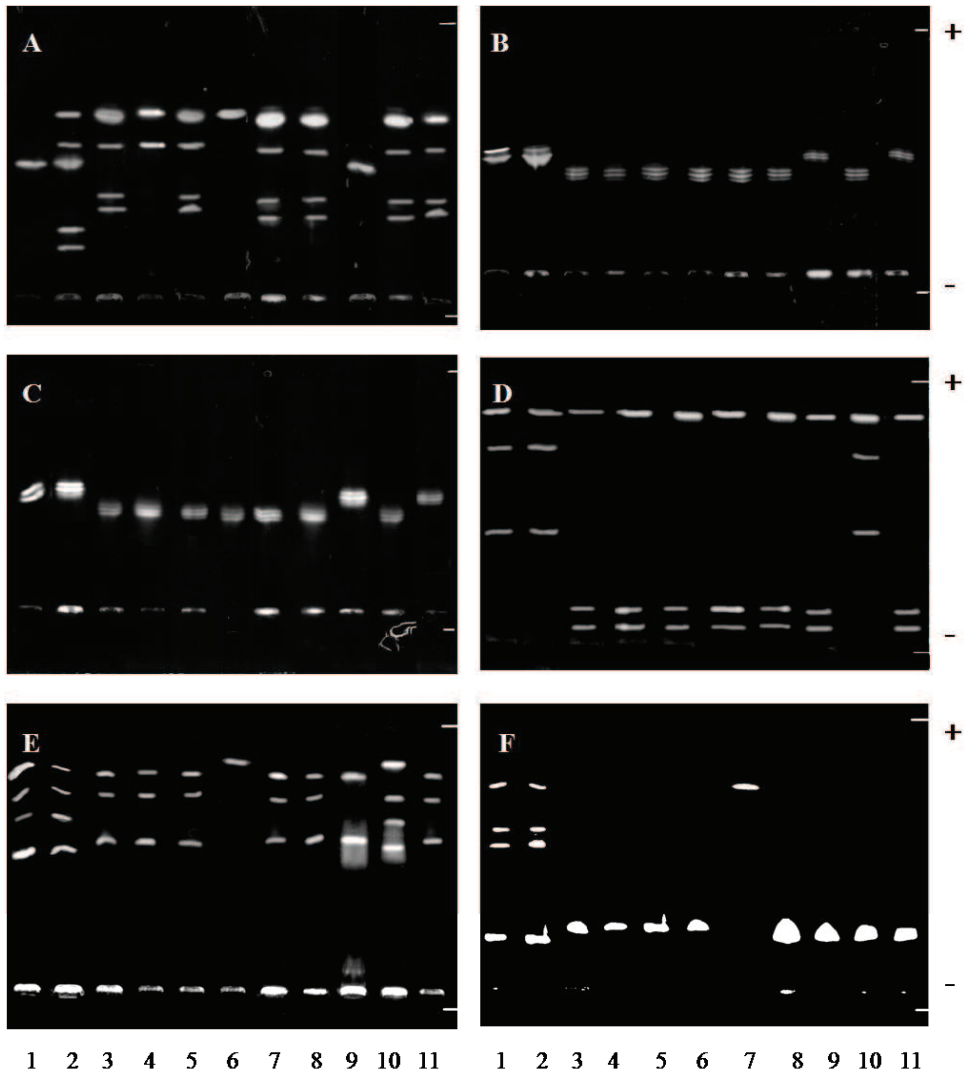


Figura 9: Perfil isoenzimático para los siguientes sistemas: (A) Enzima málico (EM); (B) Glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH); (C) Glucosa fosfato isomerasa (GPI); (D) Superóxido dismutasa (SOD); (E) Malato deshidrogenasa (MDH); (F) Isocitrato deshidrogenasa (IDH). Organismos: (1) UCM 09; (2) UCM 17; (3) UCM 75; (4) UCM 14; (5) UCM 06; (6) UCM 45; (7) UCM 21; (8) UCM 12; (9) UCM 11; (10) UCM 20; (11) UCM 1.

5.1.2 Digestión del ADNk por enzimas de restricción.

La digestión del ADNk purificado de los aislados con las endonucleasas (EcoRI, MspI, HindIII, HinfI y BamHI) nos permitió caracterizar a estos aislados genotípicamente por medio de esta técnica. Todas las endonucleasas ensayadas fueron capaces de digerir los diferentes ADNk en fragmentos de diferente tamaño y que fueron visualizados por electroforesis en gel de agarosa al 1.3 % (Figura 10).

La heterogenicidad de los perfiles de restricción fue destacable en todos los ADNk estudiados. Las cepas UCM1 y UCM 6 presentan el mismo patrón de digestión con la enzima HaeIII (Figura 10.C, líneas 5 y 11)

La figura 10.A presentó cuatro perfiles diferentes tras la digestión con la endonucleasa BamHI: un primer perfil con 5 fragmentos (UCM 12 y UCM 11), un segundo con 4 fragmentos (UCM 9, UCM 17, UCM 75, UCM 21 y UCM 1), un tercer perfil con 2 fragmentos (UCM 14, UCM 6 y UCM 45) y un cuarto perfil con un solo fragmento (UCM 20).

El enzima de restricción EcoRI digirió el ADNk en 2 fragmentos, aunque de tamaños diferentes, excepto para la UCM 14 cuyo ADNk se corto en 3 (Figura 10.B, línea 4).

El enzima de restricción HinfI (Figura 10.D) mostró unos perfiles de digestión homogéneos, con 4 fragmentos de igual tamaño para las cepas UCM 9, UCM 17, UCM 75, UCM 1. De igual manera la digestión con MspI (Figura 10.E) produjo un perfil homogéneo, con 2 fragmentos de ADNk en los aislados UCM 9, UCM 17, UCM 75, UCM 21 y UCM 1.

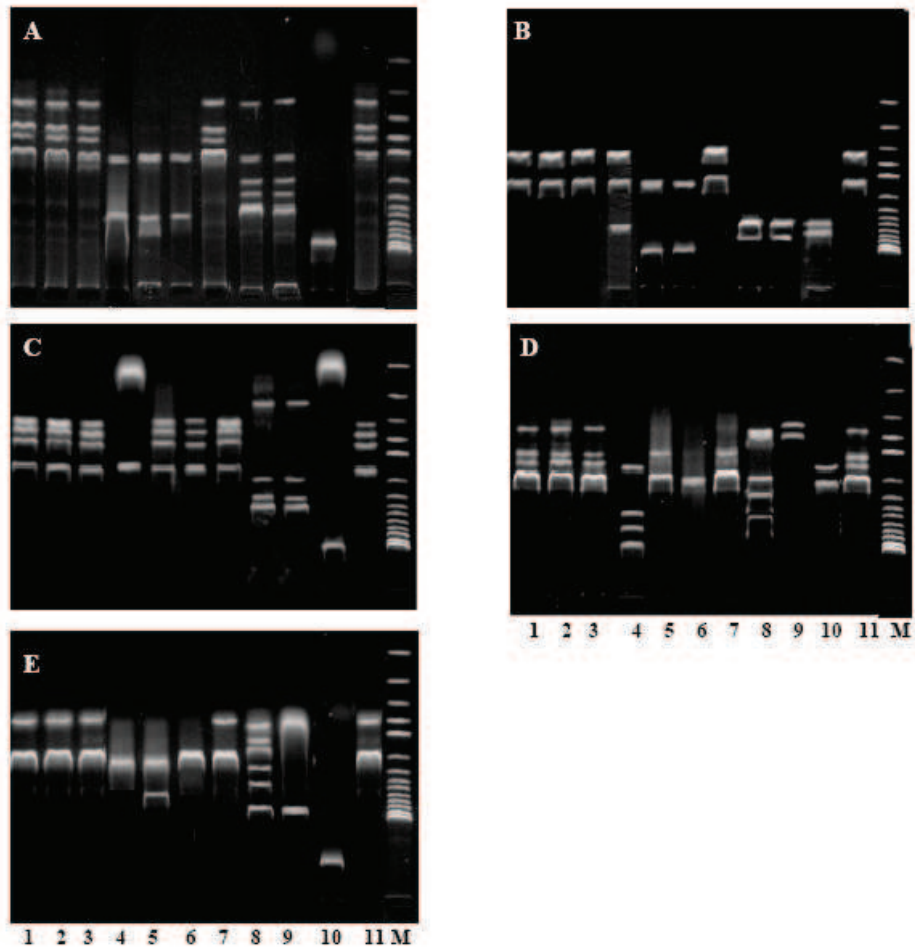


Figura 10: Análisis de restricción con endonucleasas del ADNk: (A) ADNk + BamHI; (B) ADNk + EcoRI; (C) ADNk + HaeIII; (D) ADNk + HinfI y (E) ADNk + MspI. Líneas: (1) UCM 09; (2) UCM 17; (3) UCM 75; (4) UCM 14; (5) UCM 06; (6) UCM 45; (7) UCM 21; (8) UCM 12; (9) UCM 11; (10) UCM 20; (11) UCM 1. (M) Marcador 1000-bp.

5.1.3 PCR y PCR-RFLP.

La PCR amplificó una parte de los genes de la subunidad pequeña del ARNr produciendo una banda de un tamaño aproximadamente de 400 pb para las cepas de referencia y los nuevos aislados UCM 9, UCM 17, UCM 75, UCM 14, UCM 12 y UCM 20 (Figura 11. Líneas 1, 3, 4, 5, 8, 9,10 y 11), mientras que, para las cepas UCM 45 y UCM 21 amplificó un fragmento de aproximadamente 700 pb.

La digestión del producto de la PCR con la endonucleasa HaeIII revela 2 perfiles diferentes de RFLP de acuerdo al grupos obtenidos por PCR: 4 fragmentos comprendidos entre 150-bp a 400-bp y 3 fragmentos entre 150 y 700-bp.

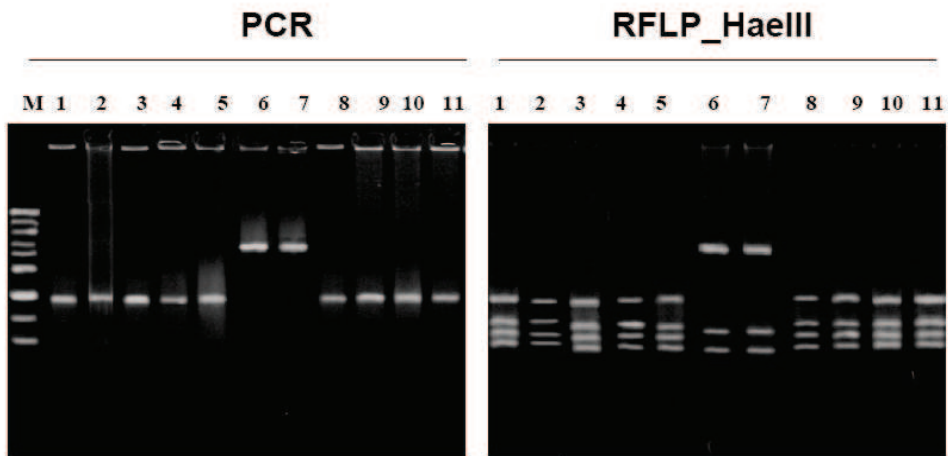


Figura 11: Resultado de la amplificación por PCR de diferentes especies y aislados de *Leishmania* usando los primers R174 y R758, y posterior digestión de estos productos con la endonucleasa HaeIII, a cada pocillo se le añadió 10µl de muestra. Organismos: (1) UCM 09; (2) UCM 17; (3) UCM 75; (4) UCM 14; (5) UCM 06; (6) UCM 45; (7) UCM 21; (8) UCM 12; (9) UCM 11; (10) UCM 20; (11) UCM 1. (M) Marcador 1000-pb de peso molecular.

5.2 Aislados de Leishmanias de Colombia.

Dieciséis nuevos stocks de especies de *Leishmania* obtenidas de pacientes en la consulta del Instituto Nacional de Dermatología de Bogotá D.C (Colombia), fueron aisladas, clonadas y cultivadas en medio MTL suplementado con un 10% de suero bovino fetal inactivado (IFBS) hasta que la densidad celular en el cultivo fue de 2×10^7 cell.ml⁻¹.

5.2.1 Análisis isoenzimáticos.

Estos dieciséis stocks junto con 8 cepas de referencia (*L. peruviana*, *L. guyanensis*, *L. colombiensis*, *L. braziliensis*, *L. panamensis*, *L. mexicana*, *L. amazonensis* y *L. chagasi*) fueron analizadas por sus perfiles isoenzimáticos utilizando seis sistemas enzimáticos (EM, G6PDH, IDH, MDH, GPI y SOD).

Algunos de los sistemas enzimáticos estudiados nos revelaron diferencias significativas entre las cepas de referencia en cuanto al número y sus puntos isoeléctricos (Figura 12).

Cinco de estos sistemas (EM, MDH, IDH, GPI y SOD) nos permitieron diferenciar a la especie de *L. peruviana* del resto de las cepas de referencia (Figura 12.A, C, D, E y F; línea 1). EM, IDH y MDH nos diferenció a *L. panamensis* del resto (Figura 12.A, C y D; línea 5). *L. braziliensis* puede ser diferenciada por la EM y MDH (Figura 12.A y D; línea 4). *L. colombiensis* y *L. mexicana* lo son por las enzimas G6PDH y MDH (Figura 12.B y D; líneas 3 y 6, respectivamente). *L. amazonensis* no es identificada por ninguno de los seis sistemas utilizados. Mientras que *L. guyanensis* es diferenciada por MDH (Figura 12.D; línea 2) y *L. chagasi* por EM, IDH and SOD (Figura 12.A, C y F; línea 8).

Cuando los dieciséis nuevos stocks de *Leishmanias* son sometidos al análisis isoenzimático. Fuimos capaces de establecer relaciones filogenéticas entre estos aislados y las cepas de referencia.

Los aislados LL 01, LL 04, LL 106, LL 113, LL 119 y LL 125 presentaron unos perfiles isoenzimáticos similares a *L. panamensis* con al menos cinco de las enzimas (Figura 12; líneas 9, 11, 19, 22, 23 y 24), igual sucede con los aislados LL 09, LL 035, LL 92, LL 104 y LL 110, pero en este caso sus perfiles se asemejan a *L. braziliensis* (Figura 12; líneas 14, 16, 17, 18 y 21). Los aislados LL 03 y LL 012 tienen un perfil semejante a *L. amazonensis* para cuatro o más sistemas (Figura 12; línea 10 y 15). Por últimos los aislados LL 05, LL 08 y LL 109 no presentaron un perfil claramente semejante a alguna de las cepas de referencia (Figura 12; líneas 12, 13 y 20).

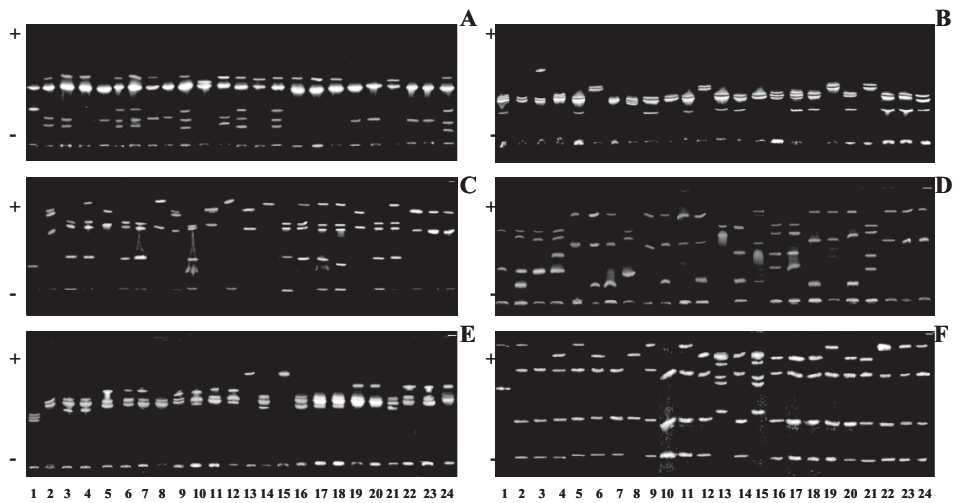


Figura 12: Perfil isoenzimático para los siguientes sistemas: (A) Enzima málico (EM); (B) Glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH); (C) Isocitrato deshidrogenasa (IDH); (D) Malato deshidrogenasa (MDH); (E) Glucosa fosfato isomerasa (GPI); (F) Superóxido dismutasa (SOD). Organismos: (1) *L. peruviana*; (2) *L. guyanensis*; (3) *L. colombiensis*; (4) *L. braziliensis*; (5) *L. panamensis*; (6) *L. mexicana*; (7) *L. amazonensis*; (8) *L. chagasi*; (9) LL01; (10) LL03; (11) LL04; (12) LL05; (13) LL08; (14) LL09; (15) LL012; (16) LL035; (17) LL092; (18) LL104; (19) LL106; (20) LL109; (21) LL110; (22) LL113; (23) LL119; (24) LL125.

5.2.2 Digestión del ADNk por enzimas de restricción.

El ADNk de los dieciséis aislados y de las ocho cepas de referencia fue purificado y posteriormente digerido con seis endonucleasas de restricción (BamH I, Hinf I, Hae III, EcoR I, Hind III, y Msp I). Los productos de la digestión fueron sometidos a electroforesis en geles de agarosa al 1.3 % (Figura 13). Todas las endonucleasas fueron capaces de digerir el ADNk en fragmentos de diferentes tamaños, mostrando una clara heterogeneidad de todos los perfiles de restricción generados.

L. mexicana presenta un patrón completamente diferente a las otras cepas de referencia utilizadas en este estudio, con cuatro de las seis endonucleasas utilizadas (Figura 13.A; C; D y F; línea 6). El patrón de *L. peruviana* con las endonucleasas Hae III y EcoR I se diferenció del resto de las cepas de referencia (Figura 13.C y D; línea 1). *L. colombiensis* se identificó con las endonucleasas Hinf I y EcoR I (Figura 13.B y D; línea 3) y *L. chagasi* con las endonucleasas EcoR I y Hind III (Figura 13.D y F; línea 8), las cepas pertenecientes a *L. braziliensis* y *L. guyanensis* fueron caracterizadas con la endonucleasa Hind III (Figura 13.F; líneas 2 y 4); y por último, las cepas de *L. amazonensis* y *L. panamensis* no son identificadas con ninguna de las seis endonucleasas.

Los dieciséis nuevos aislados presentan dos patrones de restricción cuando su ADNk es digerido con la endonucleasa BamH I: los aislados LL 01, LL 03, LL 04, LL 05, LL 08, LL 12 LL 106, LL 109; LL 110, LL 113, LL 119 y LL 125, tienen un perfil semejante a las cepas *L. panamensis* y *L. amazonensis* (Figura 13.A; líneas: 9 a la 13, 15 y 19 a la 24); el resto de los aislados presentaron un perfil semejante a *L. braziliensis* y *L. guyanensis* (Figura 13.A).

Cuando el ADNk de los nuevos aislados se sometió a la acción de la endonucleasa Hinf I nos proporcionó cinco patrones de restricción diferentes: el aislado LL 04 presenta dos fragmentos semejantes al de *L. colombiensis*, los aislados LL 08, LL 35, LL 119 y LL 125 un solo fragmento y no hay correspondencia con las cepas de referencia (Figura 13.B; líneas 13,16,23 y 24), igual sucede con los aislados LL 12 y LL 110 que presentaron seis y cuatro fragmentos de ADNk sin correspondencia con las cepas de referencia (Figura 13.B; líneas 15 y 21), el resto de los aislados tenían un perfil

semejante a *L. peruviana*, *L. braziliensis*, *L. panamensis*, *L. amazonensis* y *L. guyanensis* (Figura 13.B).

Con la enzima Hae III, se produjeron dos perfiles que nos relacionaban a algunos de los aislados con algunas de las cepas de referencia, por ejemplo, los aislados LL 03, LL 04, LL 09, LL 106, LL 119 y LL 125 con las cepas *L. braziliensis*, *L. panamensis* y *L. chagasi* (Figura 13.C; líneas 10-11, 14, 18-20, 23 y 24; líneas 4-5 y 8 respectivamente). En el otro perfil, donde se agrupaban los aislados LL 05, LL 08, LL 12, LL 35, LL 92, LL 104 y LL 113 (Figura 13.C; líneas 12, 13, 15 a la 17 y 22), se asemejaba al perfil que presentan las cepas *L. colombiense* y *L. amazonensis* (Figura 13.C; líneas 3 y 7); los aislados LL 01 y LL 110 presentaron un perfil que no se asemejó a ninguna de las cepas de referencia estudiadas (Figura 13.C; líneas 9 y 21).

Con el enzima EcoR I el aislado LL 08 presentó un perfil que no tiene correspondencia al de las cepas de referencia (Figura 13.D; línea 13), igual sucedía con la enzima MspI que dio un patrón de restricción diferente a las cepas de referencias para los aislados LL 05 y LL 109 (Figura 13.E; línea 12 y 20). Cuando el ADNk de los aislados LL 09, y LL 12 fueron sometidos a la acción de la enzima Hind III, los perfiles difirieron de los de las cepas de referencia (Figura 13.F; líneas 14 y 15).

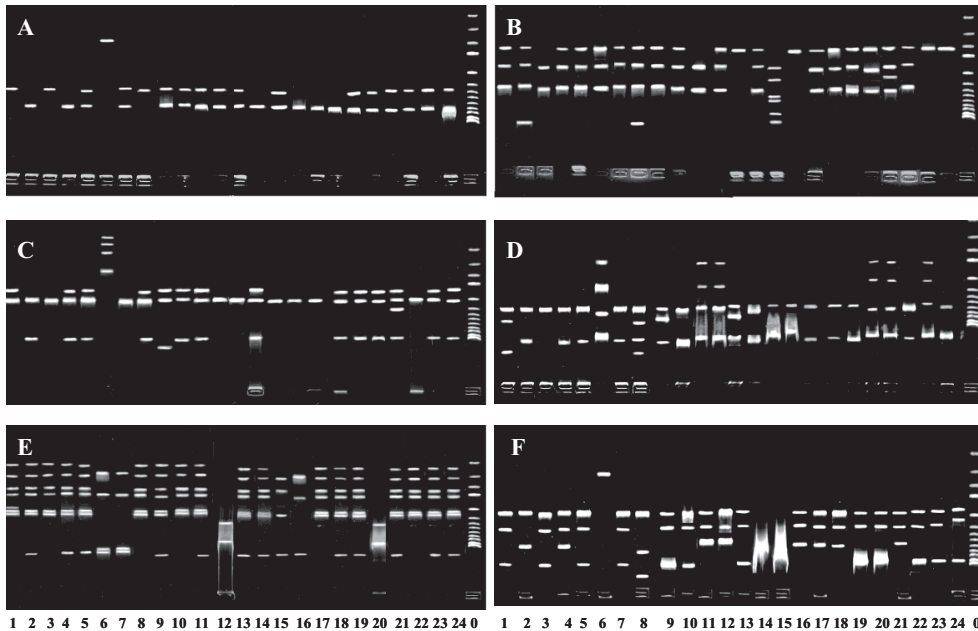


Figura 13: Análisis de restricción con endonucleasas del ADNk: (A) ADNk + BamHI; (B) ADNk + HinfI; (C) ADNk + HaeIII; (D) ADNk + EcoRI; (E) ADNk + MspI y (F) ADNk + HindI. Organismos:(1) *L. peruviana*; (2) *L. guyanensis*; (3) *L. colombiense*; (4) *L. braziliense*; (5) *L. panamensis*; (6) *L. mexicana*; (7) *L. amazonensis*; (8) *L. chagasi*; (9) LL01; (10) LL03; (11) LL04;(12) LL05;(13)LL 08;(14)LL 09;(15)LL 012;(16)LL 035;(17)LL 092;(18)LL 104;(19)LL 106;(20)LL 109;(21)LL 110;(22)LL 113;(23)LL 119;(24)LL 125;(0) Marcador 10000-bp.

5.2.3 PCR.

En la Figura 14 se presentan los resultados correspondientes a la amplificación del ADNk por PCR de las dieciséis nuevos aislados y de las ocho cepas de referencia, caracterizados previamente por análisis isoenzimático y por enzimas de restricción.

Una banda de amplificación de aproximadamente de 370 pb fue visible en todos los aislados, así como en las ocho cepas de referencia (Figura 14). En el caso de *L. colombiense*, *L. panamensis*, *L. mexicana* y *L. amazonensis* se visualizó una segunda banda de 270 pb, al igual que sucedió con los aislados LL 01, LL 03, LL 04, LL 05, LL 08, LL 12, LL 106, LL 113, LL 119 y LL 125 (Figura 14; líneas 9 a 13,15, 19 y 22 a 24). *L. chagasi* presentó 3 bandas amplificadas de aproximadamente 150, 360 y 450 pb (Figura 14; línea 8).

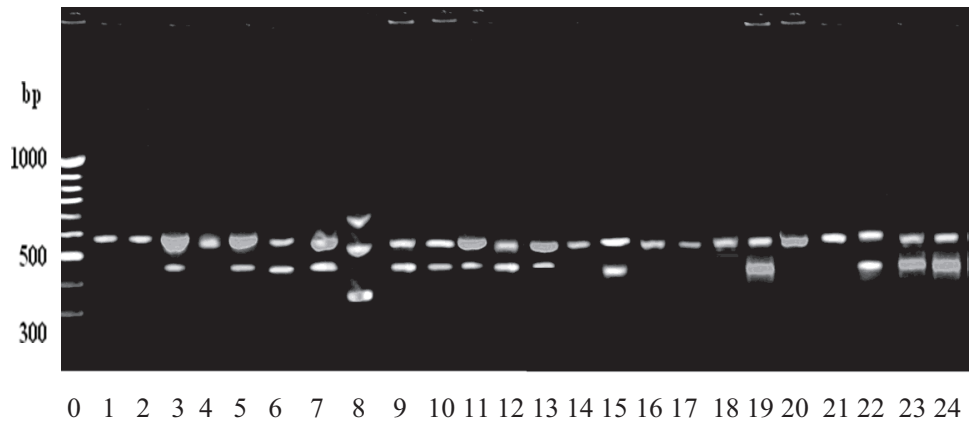


Figura 14: Resultado de la amplificación por PCR de diferentes especies y aislados de *Leishmania* usando los primers Lmj 4 y Uni 21. Organismos: (0) marcador de 1000-pb.; (1) *L. peruviana*; (2) *L. guyanensis*; (3) *L. colombiensis*; (4) *L. braziliensis*; (5) *L. panamensis*; (6) *L. mexicana*; (7) *L. amazonensis*; (8) *L. chagasi*; (9) LL01; (10) LL03; (11) LL04; (12) LL05; (13) LL 08; (14) LL 09; (15) LL 012; (16) LL 035; (17) LL 092; (18) LL 104; (19) LL 106; (20) LL 109; (21) LL 110; (22) LL 113; (23) LL 119; (24) LL 125.

5.3 Aislados de Leishmanias de Perú.

Treinta y cinco nuevos stocks de especies de *Leishmania* obtenidas de pacientes en diferentes departamentos de Perú fueron aislados, clonados y cultivados en medio MTL al que se le añadió un 10% IFBS hasta que el cultivo alcanzó la densidad celular de 2×10^7 cell.ml⁻¹.

5.3.1 Análisis isoenzimáticos.

Estos treinta y cinco stocks junto con 8 cepas de referencia (*L. peruviana*, *L. guyanensis*, *L. colombiensis*, *L. braziliensis*, *L. panamensis*, *L. mexicana*, *L. amazonensis* y *L. chagasi*) se sometieron a análisis utilizando siete sistemas enzimáticos (EM, G6PDH, IDH, 6-PGD, MDH, GPI y SOD). Algunos de los sistemas enzimáticos estudiados revelaron diferencias significativas entre las cepas de referencia en cuanto a su número de bandas y sus puntos isoeléctricos, presentado perfiles diferentes (Figura 15).

La enzima málico diferenció a las cepas *L. peruviana*, *L. braziliensis*, *L. mexicana*, *L. amazonensis* y *L. chagasi* entre sí y con respecto al resto de las cepas de referencia (Figura 15.A; líneas 1, 4, 6, 7 y 8). De los treinta y cinco nuevos stocks, los aislados: LP 20, LP 28, LP 30, LP 31, LP 35, LP 42, LP 45, LP 50 y LP 51 (Figura 15.A; líneas: 9, 16, 18, 19, 22, 29,32, 39 y 43) presentaron un perfil semejante al de *L. peruviana*. Los aislados LP 21, LP 25, LP 37, LP 43 y LP 47 tuvieron un perfil semejante a *L. braziliensis* (Figura 15.A; líneas: 10, 14, 24, 30 y 34). Y solamente los aislados LP 32, LP 39 y LP 52 no tenían un patrón electroforético parecido a ninguna de las cepas de referencia (Figura 15.A; líneas 19, 25 y 37).

Con el enzima G6PDH se diferenció claramente a *L. colombiensis*, *L. mexicana* y *L. chagasi*, del resto. El perfil que presenta *L. peruviana* y *L. braziliensis* para este enzima es muy semejante entre sí (Figura 15.B; líneas 1 y 4), y este patrón es compartido por la mayoría de los aislados estudiados.

El enzima IDH nos diferenció a *L. peruviana* (Figura 15.C; línea 1) del resto de las cepas de referencia e identifica a los aislados LP 20, LP 23, LP 25, LP 28, LP 30, LP 33, LP 39, LP 48, LP 50, LP 54 y LP 55 (Figura 15.C, líneas 9, 12, 14, 16, 18, 21, 26, 35, 36, 40 y 41). El enzima 6GPDH no aporta ninguna información útil para la identificación (Figura 15.D).

La MDH permitió diferenciar claramente a *L. braziliensis*, *L. panamensis* y *L. mexicana* entre si y del resto de las cepas de referencia utilizadas, los aislados LP 48, LP 52 y LP 54 presentaron un patrón de bandas que no se corresponde con ninguna de las cepas de referencia (Figura 15.E; líneas 35, 37 y 40), mientras que los otros aislados presentaron un patrón isoenzimático parecido al de las diferentes cepas de referencia.

El enzima GPI diferencia a *L. guyanensis* y *L. amazonensis* entre si y del resto de las cepas de referencia (Figura 15.F; líneas 2 y 7). Los aislados LP 35 y LP 53 muestran una sola banda que no coincidió con ninguna de las cepas de referencia (Figura 15.F; líneas 22 y 39), mientras que los perfiles del resto de los aislados se asemejaron principalmente a las cepas de referencia. El aislado LP 26 presentó un perfil único (Figura 15.F; línea 15).

La enzima SOD nos dio unos perfiles que permiten diferenciar claramente a *L. peruviana*, por un lado, *L. guyanensis* por otro, *L. colombiensis* y *L. braziliensis* también se diferencian con esta enzima (Figura 15.G; líneas: 1, 2, 3 y 4), mientras que el resto de los stock analizados se asemejaron a las cepas de referencia, excepto los aislados LP 20, LP 33 y LP 37 cuyo perfil isoenzimático no se pareció a ninguna de ellas (Figura 15.G; líneas 9, 21 y 25).

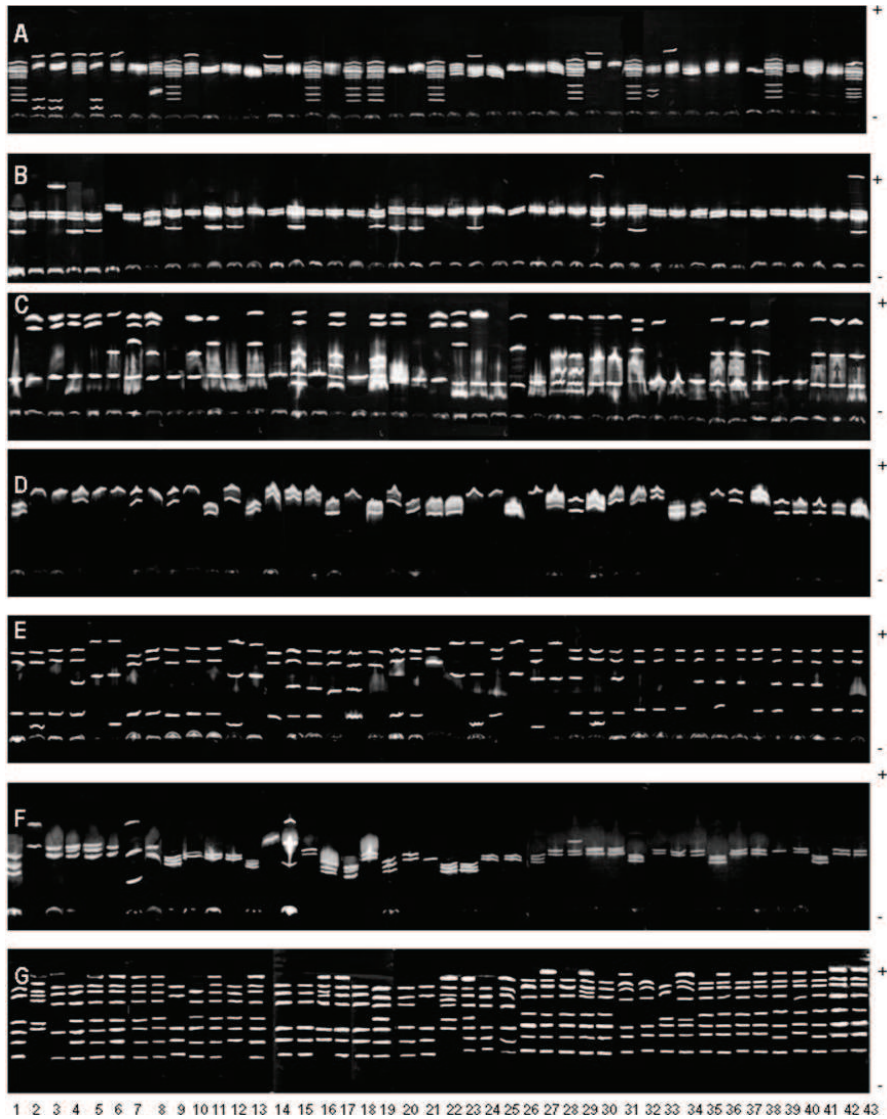


Figura 15: Perfiles isoenzimáticos de aislados de *Leishmania*. Organismos: (1) *L. peruviana*; (2) *L. guyanensis*; (3) *L. colombiense*; (4) *L. braziliense*; (5) *L. panamense*; (6) *L. mexicana*; (7) *L. amazonense*; (8) *L. chagasi*; (9) LP20; (10) LP21; (11) LP22; (12) LP23; (13) LP24; (14) LP25; (15) LP26; (16) LP28; (17) LP29; (18) LP30; (19) LP31; (20) LP32; (21) LP33; (22) LP35; (23) LP36; (24) LP37; (25) LP38; (26) LP39; (27) LP40; (28) LP41; (29) LP42; (30) LP43; (31) LP44; (32) LP45; (33) LP46; (34) LP47; (35) LP48; (36) LP50; (37) LP51; (38) LP52; (39) LP53; (40) LP54; (41) LP55; (42) LP56 y (43) LP57. Enzimas: (A) Enzima málico (EM); (B) glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH); (C) Isocitrato deshidrogenasa (IDH); (D) 6-fosfogluconico deshidrogenasa (6-PGD); (E) malato deshidrogenasa (MDH); (F) glucosa fofato isomerasa (GPI); (G) Superóxido dismutasa (SOD).

5.3.2 Digestión del ADNk por enzimas de restricción.

El ADNk de los treinta y cinco aislados y de las ocho cepas de referencia fue purificado y posteriormente digerido con cinco endonucleasas de restricción (Msp I, BamH I, Hinf I, Hae III y EcoR I). Cabe resaltar la enorme heterogeneidad resultante de los perfiles de restricción tras la digestión de los ADNk de los aislados.

L. peruviana mostró un patrón de restricción diferente a las otras cepas de referencia utilizadas en este estudio, con el enzima EcoR I (Figura 16.E; línea: 1). *L. guyanensis* se diferenció con la endonucleasa Hae III (Figura 16.D; línea: 2), mientras que *L. colombiensis* se diferenció del resto de las cepas de referencia con las enzimas Hinf I, Hae III y EcoR I (Figura 16.C, D y E; línea: 3). La enzima Hinf I permitió diferenciar a *L. braziliensis* del resto (Figura 16.C; línea: 4). El patrón de restricción de *L. mexicana* fue característico bajo la acción de las endonucleasas BamH I, Hae III y EcoRI (Figura 16.B, D y E; línea: 6). Las cepas *L. panamensis* y *L. amazonensis* no se diferenciaron con ninguna de las endonucleasas ensayadas (Figura 16; líneas: 5 y 7).

Los treinta y cinco nuevos aislados presentan cinco patrones de restricción cuando su ADNk es sometido a la endonucleasa Msp I: los aislados LP 21, LP 25, LP 26, LP 29, LP 33 y LP 48, tienen patrones de restricción completamente diferentes a los que presentan las cepas de referencia (Figura 16.A; líneas: 10, 14, 15, 17, 21 y 35). El ADNk de los aislados LP 29 al LP 32, el LP 36, los aislados LP 38 al 41, junto con los aislados LP 45 al LP 48 y LP 51 al 53, cuando se sometieron a la acción de la endonucleasa BamH I solo nos proporcionaron un fragmento de restricción que no se corresponde a ninguno de los obtenidos para la cepas de referencia (Figura 16.B; líneas: 17 a la 20, la 23, de la 25 a la 28, de la 32 a la 35 y de la 37 a la 39).

La endonucleasa Hinf I presentó un perfil de restricción muy uniforme para la mayoría de los aislados y semejante a las cepas de referencia *L. peruviana*, *L. braziliensis*, *L. panamensis* y *L. amazonensis*, (Figura 16.C), y solamente los aislados LP 20, LP 21, LP 25, LP 26, LP 30, LP 31, LP 51 y LP 52 presentaron un patrón que no se corresponde con ninguna de las cepas de referencia (Figura 16.C; líneas: 9, 10, 14, 15, 18, 19, 37 y 38).

Todos los aislados presentaron diferentes fragmentos de restricción con la endonucleasa Hae III y que se correspondieron con las cepas de referencia (Figura 16.D) e igual sucedió con la endonucleasa EcoR I y solamente los aislados LP 29 y LP 37 presentaron un solo fragmento no coincidente con los de las cepas de referencia (Figura 16.E; líneas: 17 y 24).

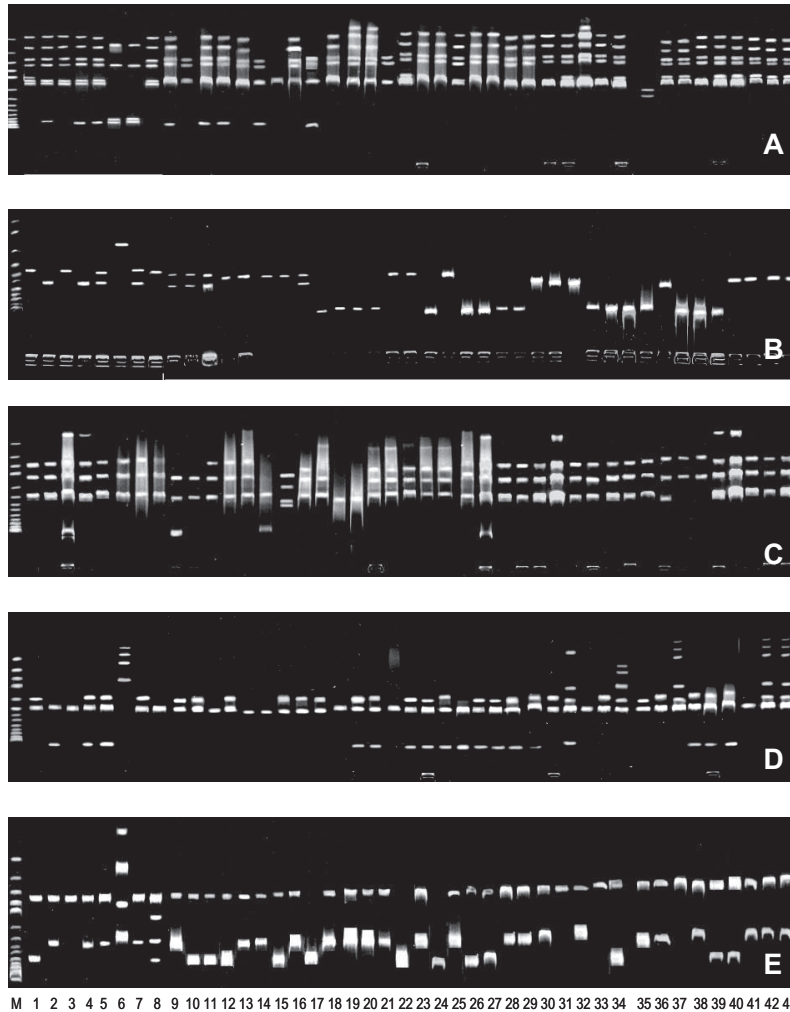


Figura 16: Análisis de restricción mediante endonucleasas del ADN_K de aislados de *Leishmania*. (A) ADN_K + MspI; (B) ADN_K + BamHI; (C) ADN_K + HinfI; (D) ADN_K + HaeIII y (E) ADN_K + EcoRI. Organismos: (1) *L. peruviana* (2); *L. guyanensis*; (3) *L. colombiense*; (4) *L. braziliense*; (5) *L. panamense*; (6) *L. mexicana*; (7) *L. amazonense*; (8) *L. chagasi*; (9) LP20; (10) LP21; (11) LP22; (12) LP23; (13) LP24; (14) LP25; (15) LP26; (16) LP28; (17) LP29; (18) LP30; (19) LP31; (20) LP32; (21) LP33; (22) LP35; (23) LP36; (24) LP37; (25) LP38; (26) LP39; (27) LP40; (28) LP41; (29) LP42; (30) LP43; (31) LP44; (32) LP45; (33) LP46; (34) LP47; (35) LP48; (36) LP50; (37) LP51; (38) LP52; (39) LP53; (40) LP54; (41) LP55; (42) LP56 y (43) LP57. (M) Marcador de 1000-pb de peso molecular.

5.3.3 PCR.

En la figura 17 se presentan los resultados correspondientes a la amplificación del ADNk por PCR de los treinta y cinco nuevos aislados así como de las ocho cepas de referencia. En todos los aislados se amplificó una banda de aproximadamente 370 pb. En el caso de *L. colombiensis*, *L. panamensis*, *L. mexicana* y *L. amazonensis* también se observó una segunda banda de 270 pb, al igual que sucede con los aislados LP 37, LP 43 y LP 53 (Figura 17; líneas 24, 30 y 39). *L. chagasi* presenta 3 bandas amplificadas de aproximadamente 150, 360 y 450 pb (Figura 17; línea 8) al igual que la cepa LP 47 (Figura 17; línea 34).

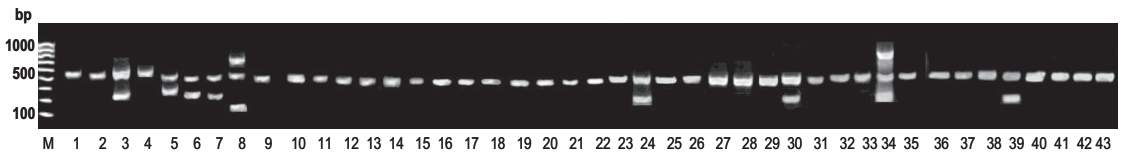


Figura 17: Amplificación de los productos obtenidos por PCR de las diferentes especies de *Leishmania* y aislados usando los primers Uni21 y Lmj4. En cada pocillo se añadieron 10µl de producto amplificado. Organismos: (1) *L. peruviana* (2); *L. guyanensis*; (3) *L. colombiensis*; (4) *L. braziliensis*; (5) *L. panamensis*; (6) *L. mexicana*; (7) *L. amazonensis*; (8) *L. chagasi*; (9) LP20; (10) LP21; (11) LP22; (12) LP23; (13) LP24; (14) LP25; (15) LP26; (16) LP28; (17) LP29; (18) LP30; (19) LP31; (20) LP32; (21) LP33; (22) LP35; (23) LP36; (24) LP37; (25) LP38; (26) LP39; (27) LP40; (28) LP41; (29) LP42; (30) LP43; (31) LP44; (32) LP45; (33) LP46; (34) LP47; (35) LP48; (36) LP50; (37) LP51; (38) LP52; (39) LP53; (40) LP54; (41) LP55; (42) LP56 y (43) LP57. (M) marcador de 1000-pb.

5.4 Aislados de Tripanosomas de México, Perú, Panamá, Perú y Chile.

Quince nuevos stocks de especies pertenecientes al género *Trypanosoma*, fueron aislados de humanos con y sin síntomas de la enfermedad de Chagas, de las heces y glándulas salivares de diferentes vectores, procedentes de cuatro países de Latinoamérica. Los parásitos fueron clonados y cultivados en medio Grace's suplementado con un 10 % de suero bovino fetal inactivado, alcanzándose densidades de crecimiento del orden de $1-2 \times 10^7$ células/ml.

5.4.1 Análisis isoenzimáticos.

Estos nuevos aislados junto con seis cepas de referencia: TCM, TCI, TY, TCL y dos tripanosomas caracterizados como *T. rangeli* (TRaPa y TRaPe), fueron analizados por electroforesis isoenzimática con seis enzimas (G6PDH, GPI, MDH, EM, SOD e IDH). La enzima G6PDH diferenció claramente a los dos aislados de *T. rangeli* del resto de los tripanosomas de referencia (Figura 18.A). La enzima MDH distinguió a TY y TCL de resto de las cepas de referencia y entre sí (Figura 18.C). Igual pasa con el enzima SOD que nos caracterizó a TCL del resto (Figura 18.E).

Cuando los quince nuevos aislados son sometidos al análisis isoenzimático, se pudo establecer relaciones filogenéticas entre estos aislados y las cepas de referencia. Con el enzima G6PDH los aislados TH7 y TCMP1 presentaron un patrón electroforético diferente al resto de los aislados y semejante al patrón que presentó TCM y TCL (Figura 18.A; líneas: 10 y 16), el aislado TCPa3 tiene un perfil completamente diferente a todos los demás aislados y cepas de referencia (Figura 18.A; línea 20). Con el enzima GPI, el perfil electroforético de los aislados TMF, TW3539, TH5, TH7, TP34, TCMP1 y TCPa1 mostraron una gran semejanza con la cepa de referencia TCI (Figura 18.B; líneas 7, 8, 9, 10, 14, 16 y 19). El enzima MDH registró diferencias significativas en el perfil de los aislados TH17, TH1 y TCPa3, que no se asemejaban a los perfiles de las cepas de referencia (Figura 18.C; líneas: 12, 17 y 20). El aislado TCMP2 tiene un perfil isoenzimático diferente al resto de las cepas con el enzima SOD

(Figura 18.E; línea 18), al igual que sucede con los aislados TCPa1, TCPa3 y TCPa4 que con el enzima IDH presentan un perfil diferente del resto (Figura 18.F; líneas: 19, 20 y 21).

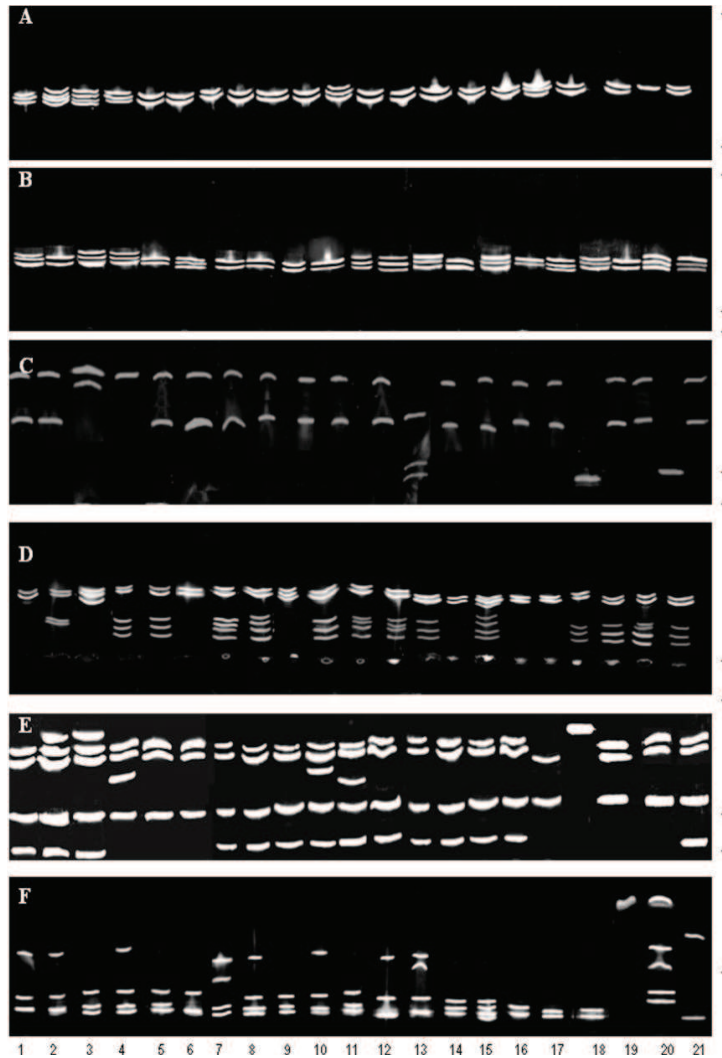


Figura 18: Perfil isoenzimático de los aislados pertenecientes al género *Trypanosoma*. Organismos: (1) TCM; (2) TCI; (3) TY; 1 (4) TCL; (5) TRaPa; (6) TRaPe; (7) TMF; (8): TW3539; (9) TH5; (10) TH7; (11) TH4; (12) TH17; (13) TP27; (14) TP34; (15) TP59; (16): TCMP1; (17) TH1; (18): TCMP2; (19): TCPa1; (20): TCPa3 y (21): TCPa4. Enzimas: (A) Glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH); (B) Glucosa fosfato isomerasa (GPI); (C) Malato deshidrogenasa (MDH); (D) Enzima málico (EM); (E) Superóxido dismutasa (SOD); (F) Isocitrato deshidrogenas (IDH).

5.4.2 Digestión del ADNk por enzimas de restricción.

El ADNk de los quince nuevos aislados y las seis cepas de referencia fue purificado y digeridos con siete endonucleasas de restricción (BamHI, EcoRI, HaeIII, HinfI, HindI, MspI y RsaI). Las endonucleasas ensayadas fueron capaces de digerir el ADNk estudiado en diferentes fragmentos (Figura 19). Es destacable la heterogeneidad de los perfiles de restricción en todas las cepas estudiadas.

Las cepas de referencia TCM y TCL tienen un perfil de restricción completamente diferente entre si y con el resto de los aislados (Figura 19. líneas: 1 y 4). TCI y TY tienen un patrón de restricción muy homogéneo con todas la endonucleasas ensayadas (Figura 19.A, B, C, D, E y F; línea: 2 y 3). También las dos cepas caracterizadas como *T. rangeli* (TRaPa y TRaPe) tenían patrones similares entre si pero diferentes al resto (Figura 19. líneas: 5 y 6). La endonucleasa BamH I dio cuatro patrones de restricción diferentes: (1) los aislados TMF, TH7, TH4, TH17, TP27, TP34, TP59, TCPa3 y TCPa4 presentan una gran homogeneidad entre sí y con las cepas de referencia TCI y TY (Figura 19.A; líneas: 7, 10 a la 15, 20, 21, 2 y 3), (2) el aislado TW3539 con un perfil semejante a los *T. rangeli* (TRaPa y TRaPe) (Figura 19.A; líneas: 8, 5 y 6), (3) los aislados TCMP1, TH1 y TCMP2 tuvieron un perfil semejante TCL (Figura 19.A; líneas: 4, 16, 17 y 18) y (4) los aislados TH5 y TCPa1 presentaron un perfil distinto al resto (Figura 19.A; líneas: 9 y 19).

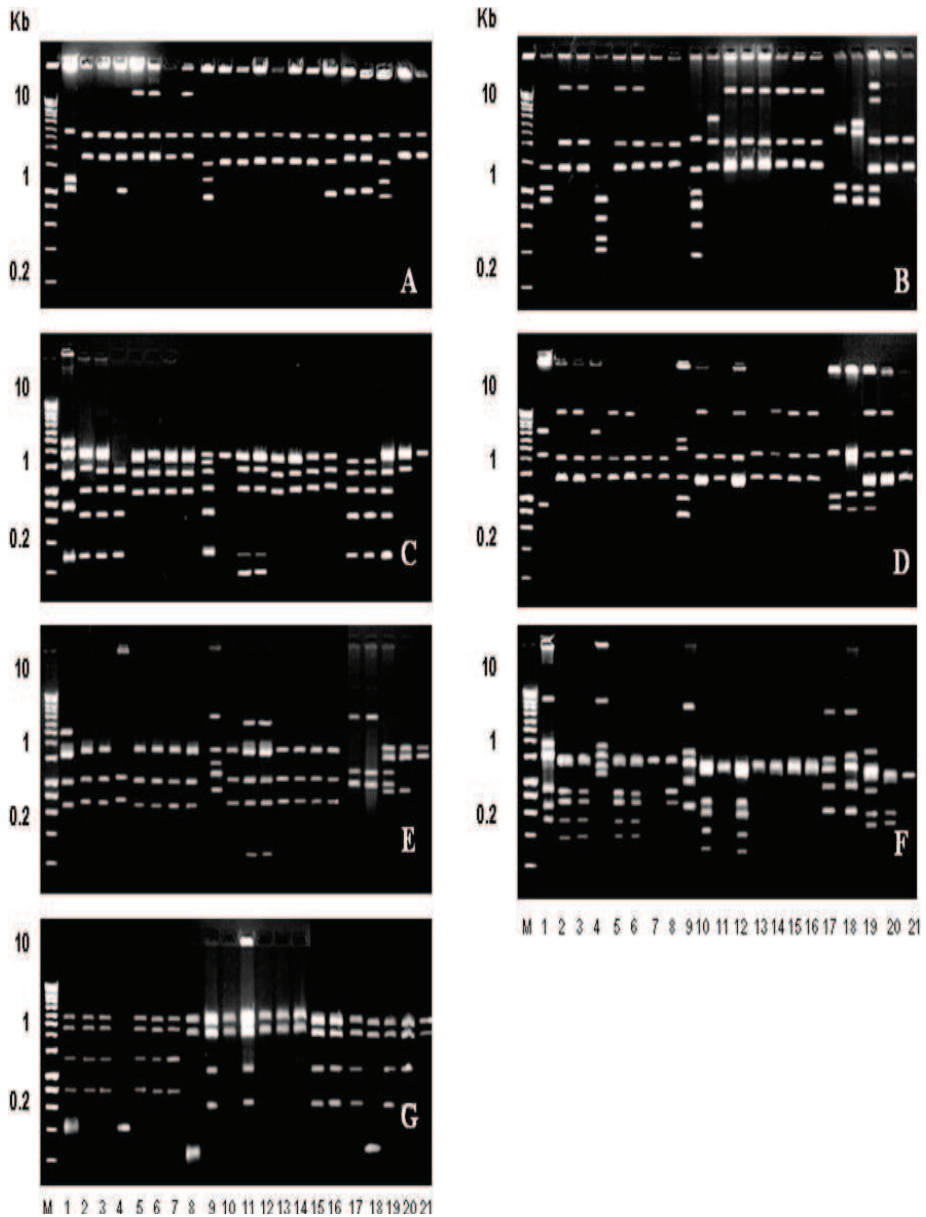


Figura 19: Análisis de restricción mediante endonucleasas del ADN_K de aislados de *Trypanosoma*. (A) ADN_K + BamHI; (B) ADN_K + EcoRI; (C) ADN_K + HaeIII; (D) ADN_K + HindI; (E) ADN_K + HinfI; (F) ADN_K + MspI y (G) ADN_K + RSal. Organismos: (1) TCM; (2) TCI; (3) TY; (4) TCL; (5) TRaPa; (6) TRaPe; (7) TMF; (8) TW3539; (9) TH5; (10) TH7; (11) TH4; (12) TH17; (13) TP27; lane(14) TP34; (15) TP59; (16) TCMP1; (17) isolate TH1; lane (18) TCMP2; lane (19) TCPa1; lane (20) TCPa3 y (21) TCPa4. (M) Marcador de 1000-pb de peso molecular.

5.4.3 PCR.

En la Figura 20 se muestran los resultados de los ensayos de PCR de los quince aislados y las seis cepas de referencia. Todos los aislados excepto las dos cepas caracterizadas como *T. rangeli* presentan una banda amplificada de 300-320 pb, el aislado TCL, presenta una banda de aproximadamente 270 pb.

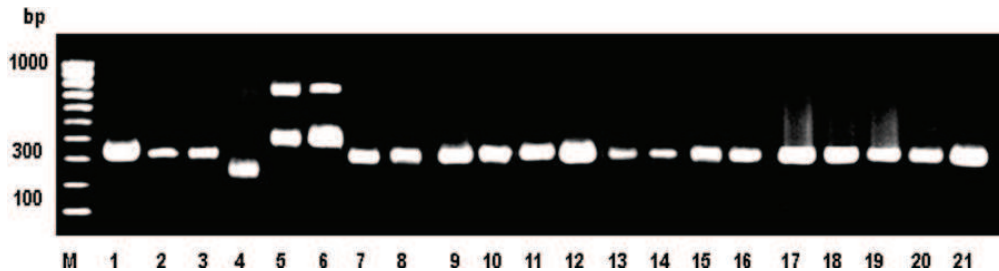


Figura 20: Amplificación de los productos obtenidos por PCR de las diferentes especies de *Trypanosoma* y aislados usando los primers S35 y S36. En cada pocillo se añadió 10 μ l de producto amplificado. Organismos: (1) TCM; (2) TCI; (3) TY; (4) TCL; (5) TRaPa; (6) TRaPe; (7) TMF; (8) TW3539; (9) TH5; (10) TH7; (11) TH4; (12) TH17; (13) TP27; (14) TP34; (15) TP59; (16) TCMP1; (17) TH1; (18) TCMP2; (19) TCPa1; (20) TCPa3 y (21) TCPa4. (M) Marcador de 1000-pb.

6. DISCUSIÓN

La capacidad para distinguir entre las diferentes especies o cepas del género *Leishmania* y *Trypanosoma* es de vital importancia cuando se prescriben tratamientos, así como, cuando se diseñan estrategias de control en los estudios epidemiológicos. Tradicionalmente la identificación de estas especies se hacía en base a su origen geográfico y las manifestaciones clínicas resultantes de las enfermedades. Sin embargo, el origen geográfico es un criterio inadecuado en áreas no endémicas, e igualmente en áreas endémicas donde múltiples especies pueden coexistir. La identificación de especies infectantes basada en síntomas clínicos también puede ser problemática, como ocurre en el caso de las especies pertenecientes al género *Leishmania*, donde varias especies pueden causar enfermedades tanto cutáneas como mucocutáneas, mientras otras pueden causar enfermedades viscerales y cutáneas simultáneamente (Schönian y col., 2003).

Los protozoos estudiados en esta Memoria son fuentes principales de morbilidad, mortalidad y perjuicio económico y son causantes de importantes afecciones en las que se pueden ver involucrados seres humanos y animales. Estos parásitos son los causantes de uno de los mayores problemas de salud en casi todos los países del mundo, por el elevado número de muertes que producen al año, por los altos costos que presenta a nivel económico, psicológico y socio-cultural. En los últimos años se ha observado un gran incremento en la incidencia de estas enfermedades, debido principalmente a una expansión geográfica de las mismas, cambios en los hábitos viajeros, migración de poblaciones, personas no-inmunes moviéndose en regiones endémicas o personas infectadas en regiones no endémicas (Desjeux, 2001).

Además, la confirmación parasitológica del diagnóstico es crítica porque el amplio espectro de síntomas puede ser causado por numerosos agentes etiológicos. Por otro lado, el tratamiento de estas enfermedades es caro, largo y está asociado con graves efectos tóxicos, y lo más importante, suelen ser tratamientos muy específicos que dependen de la especie a tratar.

Los perros están considerados como el reservorio clásico para *L. infantum*, perteneciente al zimodemo MON-1, el cuál es agente etiológico más común en los países mediterráneos (Gallego y col., 2001; Pratlong y col., 2004). El tratamiento

estadístico en base a los resultados de la caracterización fenotípica de los 8 nuevos aislados de perros de Madrid y las 3 cepas de referencia mostraron dos 2 Clusters:

Cluster 1: UCM 1, UCM 11, UCM 9 y UCM 17.

Cluster 2: UCM 6, UCM 12, UCM 14, UCM 20, UCM 21, UCM 45, UCM 75.

Cuando el dendograma fue construido en base a la caracterización genotípica (endonucleasas de restricción) los aislados se diferenciaron nuevamente en 2 Clusters:

Cluster 1: UCM 1, UCM 9, UCM 17, UCM 21 y UCM 75.

Cluster 2: UCM 6, UCM 11, UCM 12, UCM 14, UCM 20 y UCM 45.

De la misma el tratamiento estadístico de los resultados de la PCR y PCR-RFLP, separó a los aislados en 2 Clusters:

Cluster 1: UCM 6, UCM 20 y UCM 45.

Cluster 2: UCM 1, UCM 9, UCM 11, UCM 12, UCM 14, UCM 17, UCM 21 y UCM 75.

Aunque todos los análisis estadísticos realizados por separado con las diferentes técnicas nos proporcionan una división en 2 Clusters, no son concordantes en su distribución de stocks.

Por ello, el análisis estadístico de todos los resultados en conjunto proporciona una identificación y relación filogenética más apropiada (Figura 21). Este análisis jerárquico final o dendograma agrupa a los aislados en 2 grandes Clusters, que separa las cepas de referencia UCM 1, UCM 6 y UCM 11, de la siguiente forma: Cluster 1 formado por UCM 1, UCM 9, UCM 17, UCM 21 y UCM 75. El Cluster 2 compuesto de 3 subgrupos: El primero sería UCM 6, UCM 14 y UCM 45; en el segundo estaría UCM 11 y UCM 12 y en el tercer subgrupo solamente UCM 20.

Cluster 1: UCM 1, UCM 9, UCM 17, UCM 21 y UCM 75.

Cluster 2:

Subcluster 1: UCM 6, UCM 14 y UCM 45

Subcluster 2: UCM 11 y UCM 12.

Subcluster 3: UCM 20.

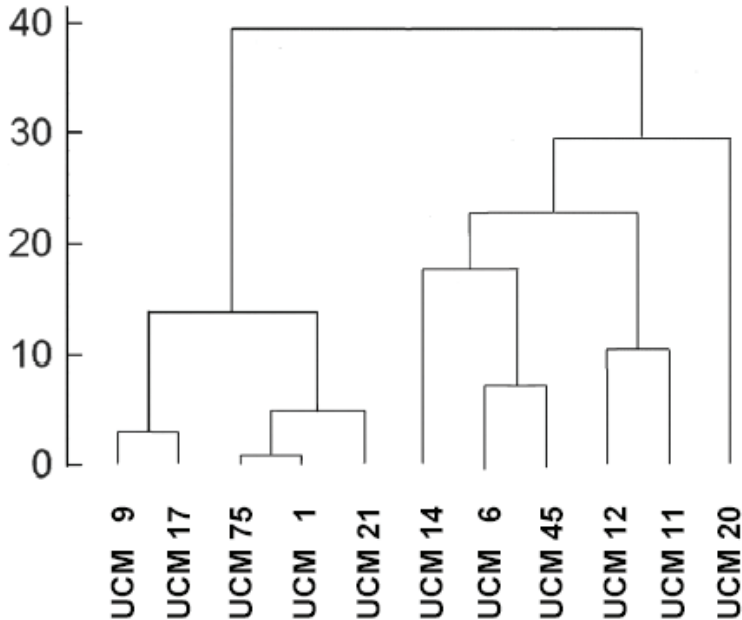


Figura 21: Dendrograma basado en el análisis individual de cluster de los nuevos stocks de *Leishmania* aisladas de perros en el laboratorio de Salud Animal de la Escuela de Veterinaria de Madrid (Program Stat-Graphics version 5.0)

De acuerdo a los datos de seroprevalencia en perros en España, Madrid ronda el 8 %, desafortunadamente la información sobre las cepas de *Leishmania* circulantes es escasa. Sin embargo, está demostrado que *L. infantum* es endémica en nuestro país y corresponde a 20 zimodemos diferentes (Martín-Sánchez y col. 2004). La carencia de referencias bibliográficas disponible junto con el pequeño tamaño de muestra estudiado, limita la discusión de los resultados.

A pesar de que el polimorfismo enzimático es la técnica “gold-estándar” para la identificación, el uso complementario de otras metodologías revela la complejidad de la población de *Leishmania* y confirma la presencia de *L. infantum* en España.

El género *Leishmania* comprende más de 30 especies, las cuales presentan distribución ecológica y geográfica diferente y pueden infectar gran variedad de reservorios y vectores (Bruijn De y Barrer, 1992). En Colombia, la leishmaniasis es una enfermedad endémica en casi todo el territorio, constituyendo un problema de salud pública nacional. Desde hace más de 20 años se han realizado esfuerzos para determinar la distribución geográfica de las especies de *Leishmania* en este país. Para el diseño de medidas de prevención y control de la enfermedad es importante hacer una correcta identificación de la especie del parásito que está causando la enfermedad en un área dada (Sierra y col., 2006).

Otra parte del trabajo recogido en esta Memoria, es la caracterización, tanto fenotípica (análisis isoenzimático) como genotípica (estudios de ADNk por medio de enzimas de restricción y PCR), de dieciséis nuevos agentes etiológicos aislados en Instituto Nacional de Dermatología de Bogotá de pacientes provenientes de toda Colombia, con diferentes formas clínicas de leishmaniasis.

La identificación exacta de un aislado mediante una sola técnica, como se ha mencionado anteriormente, es sumamente difícil, por eso analizamos en conjunto los resultados obtenidos por las tres técnicas empleadas (Figura 22). Este análisis agrupa los aislados en tres grandes Clusters. Cluster 1 formado a su vez por dos subcluster: Por un lado *L. chagasi* que según (Laison y Saw 1987) se incluye en el Complejo *Donovani* (subcluster 1-1) y por otro lado el subcluster 1-2 formado por *L. guyanensis*, *L. peruviana*, *L. braziliensis* junto con los aislados LL 104, LL 92 and LL 35, filogenéticamente están muy próximos a *L. braziliensis*, por lo que se pueden considerar *L. braziliensis*; de este análisis se deduce que *L. peruviana* y *L. braziliensis* están emparentadas, soportando la observación de otros autores, que relacionaban ambas especies por estudios de isoenzimas (Sierra y col., 2006). El Cluster 2 formado a su vez, por otros dos subcluster: subcluster 2-1, agruparía a *L. panamensis* y los aislados LL

113, LL 01, LL 106, LL 125; LL 04, LL 119 y LL 09 y el subcluster 2-2 formado por *L. colombiensis*.

El subcluter 1-2 y el Cluster 2 formarían el tradicional Complejo *Braziliensis*. El Cluster 3 estaría integrado por el subcluster 3-1 que englobaría a *L. amazonensis* y los aislados LL 03, LL 05, LL 109 y LL 110, que los consideraríamos como *L. amazonensis*; el subcluster 3-2 integrado por los aislados LL 08 y LL 12; y por último el subcluster 3-3 formado por *L. mexicana*. Este Cluster 3 formaría el Complejo *Mexicana*. Los aislados LL 08 y LL 12 están ligeramente relacionadas con *L. amazonensis* aunque no podemos considerarlos como tal especie, quizás sean una variación dentro de la especie o alguna otra especie de este mismo complejo y que no han sido incluidas en el estudio, y por lo tanto no tenemos los patrones para compararlos.

Los aislados LL 03, LL 04, LL 05, LL 08 y LL 09, habían sido clasificados a nivel de complejo mediante anticuerpos monoclonales, análisis isoenzimático y PCR, por Ovalle y col. (2006). Los resultados aquí aportados son parcialmente concordantes con el trabajo anteriormente mencionado; efectivamente los aislados LL 03, LL 05 y LL 08 pertenecen al Complejo *Mexicana* y caracterizándose como *L. amazonensis*; y los aislados LL 04 y LL 09 como *L. panamensis*.

La especie dominante en Colombia fue *L. panamensis* con un 44%, seguido por *L. amazonensis* con un 25% y *L. braziliensis* con un 19% y un 10% sin determinar, estos datos son concordantes con los obtenidos por otros autores (Corredor y col., 1990; Cupolillo y col., 1998; Ovalle y col., 2006). El pequeño número de stocks analizados no nos permite sacar conclusiones en cuanto a la distribución geográfica de estas especies, no obstante podemos sugerir que *L. panamensis* se encuentra distribuida muy uniformemente por todo el país, *L. braziliensis* se localizaría en el centro y este, mientras que, *L. amazonensis* en la costa pacífica y en el sur este del país. Hasta ahora, *L. amazonensis* ha sido aislada en un porcentaje muy bajo (Grimaldi y col., 1989) y con una distribución geográfica coincidente con nuestros resultados. A pesar de que diversos autores han reportado la presencia de *L. mexicana* en Colombia, nosotros no identificamos a alguno de los nuevos aislados como pertenecientes a *L. mexicana*. Esto no significa que no existan especies de *L. mexicana* en Colombia, pero no debemos

olvidar que los anticuerpos monoclonales e incluso la PCR tienen una limitada utilidad para diferenciar a *L. amazonensis* y *L. mexicana*, igualmente los perfiles isoenzimáticos tampoco son definitivos en esta caracterización. Sin embargo, la conjugación de los caracteres fenotípicos y genotípicos, si nos permiten diferenciar ambas especies. Quizás muchas de las cepas hasta ahora caracterizadas como *L. mexicana* sean en realidad *L. amazonensis*, lo cual es lógico ya que en los lugares donde se han identificado estas especies es la amazonía colombiana o en sus proximidades. Esto nos lleva a la conclusión, que es necesario el concurso de varias técnicas de identificación para llegar a nivel de especie, como el análisis isoenzimático junto con el estudio del ADNk por medio de las endonucleasas que permiten en la mayoría de los casos llegar al nivel de especie.

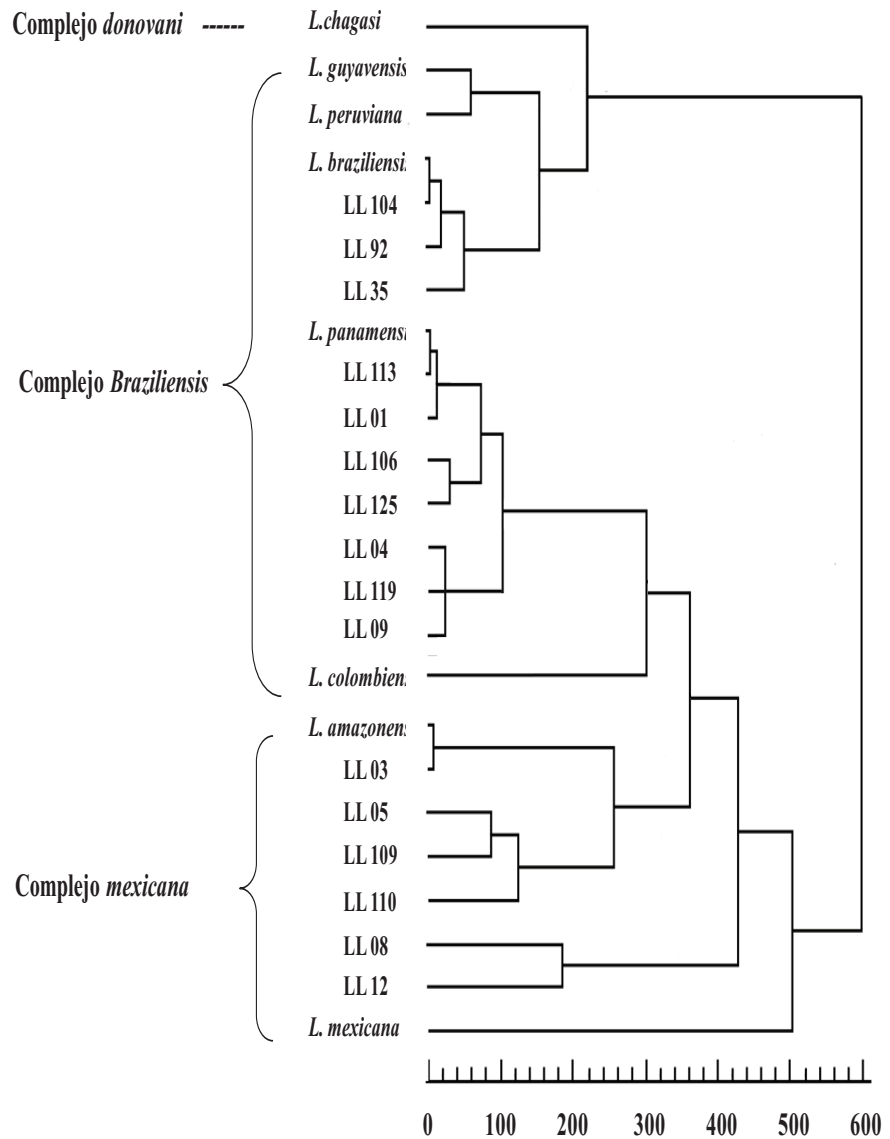


Figura 22: Dendrograma basado en el análisis individual de cluster de los nuevos stocks de *Leishmania* aisladas de pacientes del Instituto Nacional de Dermatología, Colombia (1995-2005). (Program Stat-Graphics version 5.0).

En el Perú la leishmaniasis constituye la segunda endemia de tipo tropical y la tercera causa de morbilidad por enfermedades transmisibles después de la malaria y tuberculosis (MSP, 1995). El considerable aumento de la notificación de casos de leishmaniasis en los últimos años refleja un incremento de la transmisión de esta

parasitosis, atribuible a diversos factores, entre otros, al aumento de las actividades humanas en ambientes silvestres en donde existe transmisión enzoótica; y a los cambios en los entornos de transmisión, que ahora incluyen el peridomicilio y el domicilio, y zonas periurbanas (INS, 2006). Hoy día se considera como zona endémica aproximadamente el 74% del área total del país (951820 km²), extendiéndose a través de los Andes y los valles interandinos para la leishmaniasis cutánea y a las zonas de selva alta y selva baja en la leishmaniasis mucocutánea (Lucas y col., 1998). Desde hace más de 20 años se han realizado esfuerzos para determinar la distribución geográfica de las especies de *Leishmania* en Perú. Pero conviene no olvidar que para el diseño de medidas de prevención y control de la enfermedad es importante hacer una correcta identificación de la especie del parásito que está causando la enfermedad en un área dada (Sierra y col., 2006).

El Instituto Nacional de Salud de Lima, atienden pacientes de todos los departamentos del país, con diferentes formas clínicas de leishmaniasis. Un total de 35 nuevos agentes etiológicos han sido aislados por ellos y caracterizados fenotípicamente y genotípicamente en nuestro laboratorio, de forma similar a como se hizo con los aislados de Colombia. La Figura 23 muestra los resultados del análisis estadístico de todos los datos obtenidos por las tres técnicas. Estos aislados se agrupan en 6 grandes Clusters: Cluster 1, dentro de él se incluye *L. peruviana* y los stocks LP 20; LP 23; LP 25 y LP 33, todos aislados en los valles interandinos de los departamentos de Junín y Huanuco junto con los stocks LP 47 y LP 56 aislados en la zona andina del departamento de Amazonas y de la zona costera del departamento de Ancash, respectivamente. El Cluster 2 está formado por 13 stocks, aislados todos ellos en diferentes departamentos de la zona andina y de la zona costera, su proximidad filogenético con el cluster 1 indica que podrían ser considerados como pertenecientes a *L. peruviana*. El Cluster 3 estaría formado por *L. braziliensis* y los stocks (LP 50; LP 51; LP 52 y LP 55) aislados de la zona amazónica peruana del departamento de Madre de Dios, y los stocks LP 24 y LP 57 aislados también en la región amazónica del departamento de San Martín. Este Cluster 3 incluiría un subcluster formado por *L. colombiense* y los stocks LP 28, LP 30 y LP 38, aislados del departamento de Piura, al norte del país, haciendo frontera con Ecuador, lo que explicaría la presencia de *L. colombiense* en Perú. Seguramente estos aislados han sido introducidos procedentes de

Colombia a través de Ecuador, como consecuencia de los movimientos migratorios (Desjeux, 2004 y Cabrera, 2007). El cuarto Cluster engloba a *L. guyanensis* y los stocks LP 37, LP 43, LP 48 y LP 53 aislados de la zona amazónica de los departamentos de San Martín, Huanuco y Madre de Dios. En el Cluster 5 se divide en dos subcluster: Subcluster 5.1 donde tenemos a *L. panamensis* y el stock LP 41 aislado de la zona amazónica del departamento de Cuzco y el subcluster 5.2 donde tenemos a *L. amazonensis* y filogenéticamente muy próximos los stocks LP 21 y LP 22 aislados en la frontera de los departamentos de Junín y Pasco con el departamento amazónico de Ucayali. Y finalmente, en el Cluster 6 parece *L. mexicana*, que no ha sido reportado ningún caso en Perú.

En conclusión se puede señalar que los protozoarios del género *Leishmania* presentan una alta variedad de especies las cuales poseen características bioquímicas y moleculares que permiten caracterizarlas desde el punto de vista fenotípico y genotípico. Hoy día se cuenta con múltiples técnicas y análisis que pueden ser empleadas para la identificación y clasificación taxonómica de *Leishmania* spp, así como su relación con las áreas geográficas y la presentación clínica de la enfermedad. Estas técnicas van siendo cada vez más específicas y sensibles gracias a la comprensión y estudio de la biología molecular del parásito y a la combinación de varias técnicas de análisis que permiten la optimización de su empleo, el análisis de estas técnicas es de gran utilidad en la interpretación de los cambios en el comportamiento del parásito, así como en un correcto diagnóstico, selección adecuada de tratamiento y medidas de control y prevención. Las características clínicas de la leishmaniasis en el Perú presentan diferencias de acuerdo con la región geográfica donde se presentan; siendo predominantemente cutánea en las regiones andinas y costeras y cutáneo-mucosa en la selva amazónica, aunque también en ambas regiones pueden presentarse las dos formas clínicas. (Zuño y Guillén, 2002). Las principales especies que se encuentra circulando actualmente en el Perú son *L. peruviana* que se localiza principalmente en los valles interandinos y en la zona de la costa del Pacífico (Figura 24), *L. braziliensis* que se localiza en la Amazonía peruana, junto con *L. guyanensis* y en menor número *L. amazonensis*. Es la primera vez que se detecta la presencia de *L. colombiensis* en los departamentos del norte del país.

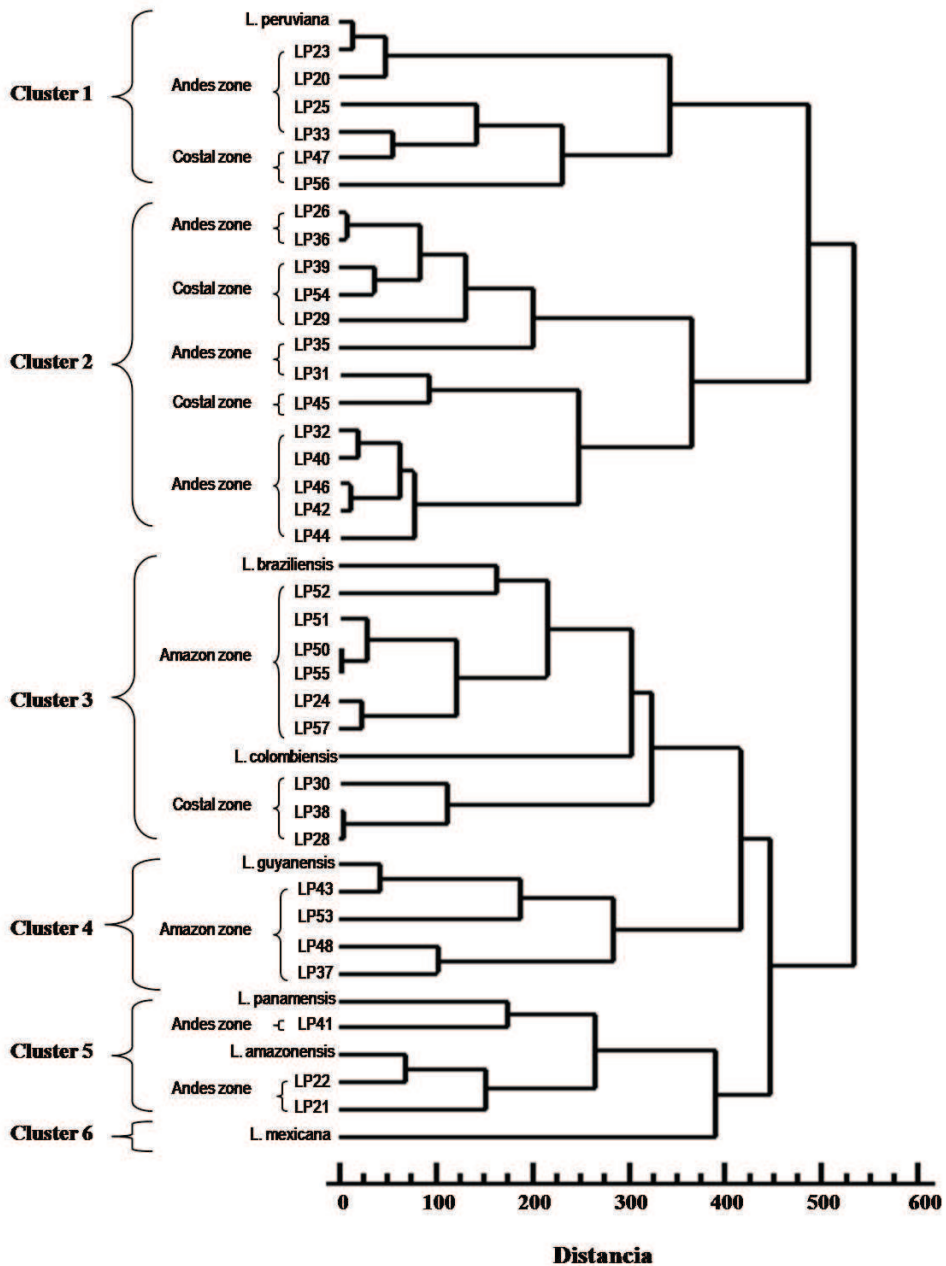


Figura 23: Dendrograma basado en el análisis individual de cluster de los nuevos stocks de *Leishmania* aisladas de pacientes del Instituto Nacional de Salud de Lima, Perú (2000-2005). (Program Stat-Graphics version 5.0).



Figura 24: Mapa de distribución de los aislamientos. (1) Dept. Piura; (2) Dept. Amazonas; Dept. San Martín; (4) Dept. Ancash; (5) Dept. Huanuco; (6) Dept. Pasco; (7) Dept. Junín; (8) Dept. Lima; (9) Dept. Ayacucho; (10) Dept. Cuzco; (11) Dept. Madre de Dios. [nº de aislados].

La estructura clonal de la población de *T. cruzi* ha sido intensamente investigada por varios grupos en los últimos años (Buscaglia y Noia, 2003; Macedo y col 2004 y Cerqueira y col 2008), poniéndose de manifiesto su gran heterogeneidad. Esta heterogeneidad, ha sido evaluada usando diversos marcadores bioquímicos y genéticos así como otros parámetros (patogenicidad, tropismo tisular y sensibilidad a las drogas). Como resultado de esta evaluación se han propuesto diversos tipos de clasificaciones (Milles y col 1978, Souto y col 1996, Brisse y col., 2000, Buscaglia y Noia, 2003 y Liarte y col., 2009), entre las cuales es sumamente complejo establecer relaciones. Por

esto, en esta Memoria estudiamos la caracterización de quince nuevos aislados de *T. cruzi* junto a seis cepas ya caracterizadas, de diferente origen geográfico, con el objetivo de establecer una clasificación basada en técnicas isoenzimáticas así como el estudio del ADNk del parásito.

El análisis estadístico de todos los resultados obtenidos (Figura 25) proporciona una aproximación filogenética, que agrupa a los aislados en cinco Clusters. El primer Cluster estaría formado por las cepas de referencia TCM, TCI y TY, junto con los aislados mexicanos TH17, TCMP2, TCMP1 y TH4. Este cluster se podría dividir en dos subcluster según su afinidad filogenética, en el primer subcluster (subcluster 1a) se englobaría a las tres cepas de referencia y en el segundo subcluster (subcluster 1b) estarían los aislados mexicanos, todos ellos procedentes de la Península del Yucatán. El segundo Cluster estaría formado por los dos aislados de Chile (TMF y TW3559) filogenéticamente tan próximos que podríamos considerarlos idénticos, los aislados de Perú (TP 34, TP 27 y TP 59) también filogenéticamente muy próximos y los aislados de Panamá (TCPa4, TCPa1 y TCPa3) filogenéticamente mas dispersos entre sí y un aislado de México (TH7). En el tercer Cluster nos encontraríamos a TCL, con una relación filogenética muy lejana con respecto a los aislados anteriores. El Cluster cuarto formado por los aislados de México (TH5 y TH1) y el quinto Cluster englobaría a las dos cepas de *T. rangeli*.

Una evolución clonal a largo plazo junto con los episodios de cambio genético condujo la individualización de seis subdivisiones genéticas discretas o linajes, designados como *T. cruzi* I, *T. cruzi* IIa, *T. cruzi* IIb, *T. cruzi* IIc, *T. cruzi* II d y *T. cruzi* IIe, que incluyen todas los tipos de cepas y stocks clonados hasta ahora aislados (Tibayrenc, 2003; Brise y col., 2003). La distribución de *T. cruzi* es diferente entre triatomíneos, la especie de hospedador y hábitats en diferentes áreas geográficas (Higo y col., 2004; Yeo y col., 2005). Aunque todas las poblaciones de *T. cruzi* causen la enfermedad en el humano, estudios epidemiológicos sugieren que algunos de estos linajes están más relacionado a ambientes antroponóticos, otros se relacionan con ambientes selváticos y *T. cruzi* tipo I a ambos, por esto sugerimos que los aislados incluidos en los dos primeros clusters pertenecerían al *T. cruzi* tipo I, los cuales a su vez se dividirían en subcluster, esto es debido a cambios genéticos que experimentan

esta población y que solo son posibles de detectar cuando se estudia el ADNk mediante enzimas de restricción o bien mediante el estudio fenotípico con el análisis isoenzimático. TCL pertenecería al *T. cruzi* tipo II. Los aislados de México y denominados por nosotros como TH5 y TH1 se encuentran en una difícil posición que requiere otro tipo de estudios para establecer su posición filogenético.

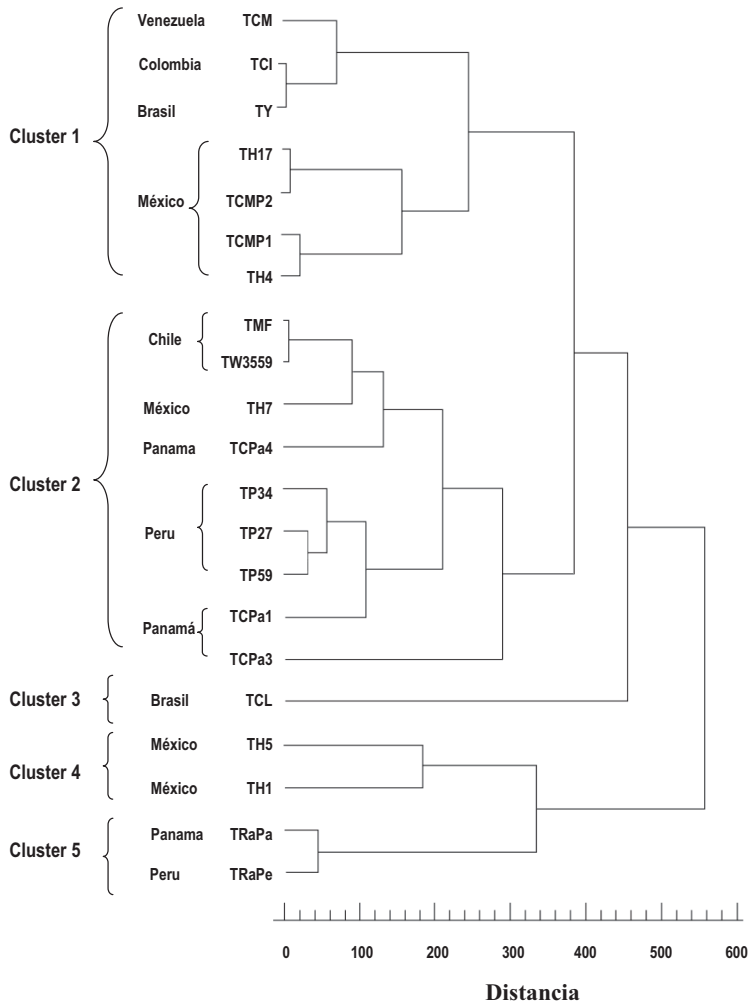


Figura 25: Dendrograma basado en el análisis individual de cluster de los nuevos stocks de *Trypanosoma* (Program Stat-Graphics version 5.0).

7.CONCLUSIONES

1.- Se han caracterizado 74 nuevos aislados de Tripanosomátidos: 59 pertenecientes al género *Leishmania* y 15 al género *Trypanosoma*, procedentes de diferentes países: México, Panamá, Colombia, Perú, Chile y España, por técnicas Bioquímicas y de Biología molecular.

2.- La caracterización fenotípica y genotípica de estos nuevos aislados por: Análisis isoenzimático, digestión del ADNk mediante enzimas de restricción, PCR y PCR-RFLP, ha contribuido al conocimiento de la epidemiología de la enfermedad de Chagas y de la Leishmaniasis.

3.- Esta Memoria confirma la necesidad del concurso de varias técnicas de identificación para llegar a nivel de especie, pertenecientes a los géneros *Leishmania* y *Trypanosoma*.

4.- Como se ha demostrado en el estudio de los aislados de España, gracias al uso complementario de las metodologías descritas: la población de especies pertenecientes al género *Leishmania* es muy compleja, aunque nuestros resultados nos confirman la circulación de *L. infantum* (MON-1) entre la población canina de Madrid.

5.- La conjugación de los caracteres fenotípicos y genotípicos de los nuevos aislados de *Leishmania* procedentes de Colombia, nos permite concluir que la especie dominante en este país es *L. panamensis* con un 44%, seguido por *L. amazonensis* con un 25% y *L. braziliensis* con un 19%.

6.- *L. panamensis* se encuentra distribuida muy uniformemente por todo el país, *L. braziliensis* se localizaría en el centro y este, mientras que *L. amazonensis* en la costa pacífica y en el sur este del país, no habiéndose identificado ningún aislado como perteneciente a *L. mexicana*.

7.- Las características clínicas de la leishmaniasis en el Perú presentan diferencias de acuerdo con la región geográfica donde se presentan; siendo predominantemente cutánea en las regiones andinas y costeras y cutáneo-mucosa en la

selva amazónica, aunque también en ambas regiones pueden presentarse las dos formas clínicas.

8.- Las principales especies que se encuentra circulando actualmente en el Perú son *L. peruviana*, localizada en los valles interandinos y en la zona de la costa del Pacífico, *L. braziliensis* localizada en la región amazónica, junto con *L. guyanensis* y en menor número *L. amazonensis*.

9.- Es la primera vez que se detecta la presencia de *L. colombiensis* en los departamentos del norte del Perú.

10.- El análisis estadístico de nuestros resultados nos permiten establecer relaciones filogenéticas entre los 15 nuevos aislados del género *Trypanosoma* procedente de cinco países latinoamericanos.

11.- Los aislados fueron agrupados en cinco grandes Clusters. El primero y segundo cluster muy relacionados filogenéticamente entre sí y con la cepa de referencia TCI, por lo que podemos concluir que todos estos aislados pertenecen al linaje 1. El cluster 3 aísla a la cepa de referencia TCL, como cabría esperar por pertenecer al linaje 2. Dos de los aislados de Mérida (Cluster 4), quedan en una posición intermedia entre *T. cruzi* y *T. rangeli* (Cluster 5).

12.- Se ha demostrado la correlación del origen geográfico y el agrupamiento de los aislados, por ser genotípicamente similares. Sin embargo no deberíamos obviar que algunos de los aislados no cumplen esta regla, ya que no hay barreras geográficas que impidan que estos aislados se establezcan en otra región.

8. BIBLIOGRAFÍA

-
- Acedo-Sánchez, C.; Morillas-Márquez, F.; Sanchís-Marín, M. C. y Martín-Sánchez, J. **1998**. Changes in antibody titres against *Leishmania infantum* in naturally infected dogs in southern Spain. *Vet. Parasitol.* **75**: 1-8.
 - Aisa, M.J.; Castillejo, S.; Gállego, M.; Fisa, R.; Riera, M. C.; De Colmenares, M.; Torras, S.; Roura, X.; Sentis, J. y Portús, M. **1998**. Diagnostic potential of Western blot analysis of sera from dogs with leishmaniasis in endemic areas and significance of the pattern. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **58**: 154-159.
 - Aljeboori, T.I. y Evans, D.A. **1980**. *Leishmania spp.* in Iraq. Electrophoretic isoenzyme patterns. II. Cutaneous leishmaniasis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **74**: 178-184.
 - Amela, C.; Méndez, I.; Torcal, J. M.; Medina, G.; Pachón, I.; Cañavate, C. y Alvar, J. **1995**. Epidemiology of canine leishmaniasis in the Madrid region, Spain. *Eur. J. Epidemiol.* **11**: 157-161.
 - Anders, G.; Eisenberger, C.L.; Jonas, F. y Greenblatt, C.L. **2002**. Distinguishing *Leishmania tropica* and *Leishmania major* in the Middle East using the polymerase chain reaction with kinetoplast DNA-specific primers. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **96**: 87-92.
 - Anez, N.; Carrasco, H.; Parada, H.; Crisante, G.; Rojas, A. y González, N. **1999**. Acute Chagas' disease in western Venezuela: a clinical, seroparasitologic, and epidemiologic study. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **60**: 215-222.
 - Angelici, M.C.; Gramiccia, M. y Gradoni, L. **1989**. Study on genetic polymorphism of *Leishmania infantum* through the analysis of restriction enzyme digestion patterns of kinetoplast DNA. *Parasitol.* **99**: 301-309.
 - Ashford, R.W. **2000**. The leishmaniases as emerging and reemerging zoonoses. *Int. J. Parasitol.* **30**: 1269-1281.
 - Bales, J.D. **1991**. In: Tropical Medicine and Emerging Infectious Diseases. G.T.Strickland, Ed 7th ed, pp 617-628, Saunders, Philadelphia.

-
- Barrouin-Melo, S.M.; Larangeira, D. F.; Trigo, J.; Aguiar, P. H.; Dos-Santos, W. L. y Pontes-de-Carvalho, L. **2004**. Comparison between splenic and lymph node aspirations as sampling methods for the parasitological detection of *Leishmania chagasi* infection in dogs. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **99**: 195-197.
 - Belhadj, S.; Pralong, F.; Hammami, M.; Kallel, K.; Dedet, J.P. y Chaker, E. **2003**. Human cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania infantum* in the Sidi Bourouis focus: epidemiological study and isoenzymatic characterization of the parasites. *Acta Trop.* **85**: 83–86.
 - Ben Abderrazak, S.; Guerrini, F.; Mathieu-Daude, F.; Truc, P.; Neubauer, K.; Lewiccka, K.; Barnabe, C. y Tibayrenc, M. **1993**. Isoenzyme electrophoresis for parasite characterization. *Methods. Mol. Biol.* **27**: 361-382.
 - Beyers, W.F. y Fridovich, I. **1987**. Assaying for superoxide dismutase activity: Some large consequences of minor changes in conditions. *Anal. Biochem.* **161**: 559-660.
 - Biogliolo, A.R.; Chiari, E. y Silva-Pereira, A.A. **1986**. A comparative study of enzyme polymorphism in South America. *Bra. J. Med. Biol. Res.* **19**: 673-683.
 - Bosio, I. **2001**. Principios básicos de criobiología. 1º Congreso ASEBIR. Vol. 18 nº 4.
 - Bradford, M.M. **1976**. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-254.
 - Brener, Z. y Chiari, E. **1965**. Aspects of early Brown of different *Trypanosoma cruzi* Straits in culture medium. *J. Parasitol.* **51**: 922-926.
 - Brener, Z. y Alvarenga, N. **1976**. Life Cycle of *Trypanosoma cruzi* in the vector. New Approaches in American Trypanosomiasis. *Research O.M.S. Pobl. Cient.* **318**: 83-90.

-
- Brener, Z. **1985**. General review on *Trypanosoma cruzi* classification and taxonomy. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* **18**: 1-8.
 - Brener, Z. y Gazzinelli, R.I. **1997**. Immunological control of *Trypanosoma cruzi* infection and patogénesis of Chagasi disease. *Int. Ar. Allegy. Immunol.* **114**: 103-110.
 - Brenière, S.F.; Telleria, J.; Bosseno, M.F.; Buitrago, R.; Bastrenta, B.; Cuny, G.; Banuls, A.L.; Brewster, S. y Barker, D.C. **1999**. Polymerase chain reaction-based identification of New World *Leishmania* species complexes by specific kDNA probes. *Acta Trop.* **73**: 283-293.
 - Brisse, S.; Barnabé, C. y Tibayrenc, M. **2000**. Identification of six *Trypanosoma cruzi* phylogenetic lineaje by random amplified polymorphic DNA and multilocus enzyme electrophoresis. *Int. J. Parasitol.* **30**: 35-44.
 - Brisse, S.; Henriksson, J.; Barnabe, C.; Douzery, E.J.P.; Berkvens, D.; Serrano, M.; de Carvalho, M.R. y Tibayrenc, M. **2003**. Evidence of genetic exchange and hybridization in *Trypanosoma cruzi* based on nucleotide sequences and molecular karyotype. *Infect. Gen. Evol.* **2**: 173-183.
 - Bruijn De, M.H.L. y Barrer; D.C. **1992**. Diagnosis of the New World leishmaniasis: specific detection of species of the *Leishmania braziliensis* complex by amplification of kinetoplast DNA. *Acta. Trop.* **52**: 145-158.
 - Bulle, B.; Millon, L.; Bart, J.M.; Gállego, M.; Gambarelli, F.; Portús, M.; Schnur, L.; Jaffe, C.L.; Fernandez-Barredo, S.; Alunda, J.M. y Piarroux, R. **2002**. Practical Approach for Typing Strains of *Leishmania infantum* by Microsatellite Analysis. *J. Clin. Microbiol.* **40**: 3391-3397.
 - Buscaglia, C.A. y Di Noia, J.M. **2003**. *Trypanosoma cruzi* diversity and epidemiology of Chagas' disease. *Microbes Infect.* **5**: 419-427.
 - Cabrera, R. **2007**. Leishmaniasis. *Bol. Epidemiol.* **16**: 720-722.

- Calvopina, M.; Uezato, H.; Gomez, E.A.; Korenaga, M. Nonaka, S. y Hashiguchi, Y. **2004**. Leishmaniasis recidiva cutis due to *Leishmania (Viannia) panamensis* in subtropical Ecuador: isoenzymatic characterization. *Int. J. Dermatol.* **45**: 116-120.
- Carneiro, M.; Romanha, A.J. y Chiari, E. **1991**. Biological characterization of *Trypanosoma cruzi* strains from different zymodemes and schizodemes. *Mem. Inst. Oswaldo. Cruz.* **86**: 387-397.
- Carrera, L.; Fermín, M. L.; Tesouro, M.; García, P.; Rollán, E.; González, J. L.; Méndez, S.; Cuquerella, M. y Alunda, J. M. **1996**. Antibody response in dogs experimentally infected with *Leishmania infantum*: infection course antigen markers. *Exp. Parasitol.* **82**: 139-146.
- Castro, A.M.; Luquetti, A.O.; Rassi, A.; Rassi, G.G.; Chiari, E. y Galvao, L.M. **2002**. Blood culture and polymerase chain reaction for the diagnosis of the chronic phase of human infection with *Trypanosoma cruzi*. *Parasitol. Res.* **88**: 894- 900.
- Cavalier-Smith, T. **2003**. Protist phylogeny and the high-level classification of Protozoa. *Eur. J. Protistol.* **39**: 338-348.
- Cerqueira, G.C.; Bartholomeu, D.C.; Da Rocha, W.D.; Hou, L.; Freitas-Silva, D.M.; Machado, C.R.; El-Sayed, N.M. y Teixeira, S.M. **2008**. Sequence diversity and evolution of multigene families in *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **157**: 65-72.
- Chance, M.L. y Walton, B.C. **1982**. In: Biochemical characterization of *Leishmania*. Chance, M.L., Walton, B. C., (eds). Geneva:UNDP/World Bank/WHO. p.1-275.
- Chang, K.P. y Dwyer, D.M. **1978**. *Leishmania donovani*. Hamster macrophage interactions in vitro: cell entry, intracellular survival, and multiplication of amastigotes. *J. Exp. Med.* **147**: 515-530.

-
- Chiurillo, M.A.; Crisante, G.; Rojas, A.; Peralta, A.; Dias, M. y Guevara, P. **2003**. Detection of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* infection by dúplex PCR assay based on telomeric sequences. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **10**: 775-779.
 - Corliss, J.O. **1994**. An Interim Utilitarian ('User-Friendly') Hierarchical Classification and Characterization of the Protist. *Acta Protozool.* **33**: 1- 51.
 - Corredor, A.; Kreutzer, R.D.; Tesh, R.B.; Boshell, J.; Palau, M.T. y Cáceres, E. **1990**. Distribution and etiology of leishmaniasis in Colombia. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **42**: 206-214.
 - Craig, C.F. y Faust, E.C. **1951**. *Clinical Parasitology*. Ed. Lea & Febiger. Philadelphia.
 - Crowther, S.; Fulton, J.D. y Joyner, L.P. **1954**. The metabolism of *Leishmania donovani* in culture. *Biochem. J.* **56**: 182-185.
 - Cruz, I.; Nieto, J.; Moreno, J.; Cañavate, C.; Desjeux, P. y Alvar, J. **2006**. *Leishmania*/HIV co-infections in the second decade. *Indian J. Med. Research.* **123**: 357-388.
 - Cupolillo, E.; Momen, H. y Grimaldi, G. **1998**. Genetic diversity in natural populations of New World *Leishmania*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **93**: 663-668.
 - D'Alessandro, A. y Saravia, N.G. **1992**. *Trypanosoma rangeli*. *Parasitic. J. Med. Entomol.* **9**: 187-195.
 - D'Alessandro, A.; Saravia, N.G. **1998**. *Trypanosoma rangeli*. In *Handbook of Protozoal Infection*. Vol. 2, Academic Press, San Diego.
 - De Santa-Izabel, A.; Vermelho, A.B. y Branquinha, M.H. **2004**. Proteolytic activities in *Trypanosoma rangeli* and stercorarian trypanosomes: taxonomic implications. *Parasitol Res.* **94**: 342-348.

- Dereure J. **1999**. Réservoirs des leishmanies. In Les leishmanioses. Collection Médecine tropicale de l'AUPELF-UREF; Marketing/Ellipses, Paris, 109-127.
- Desjeux, P. **2001**. The increase in risk factor for leishmaniasis worldwide. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **95**: 239-243.
- Desjeux, P. **2004**. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* **27**: 305-318.
- Desquesnes, M y Dávila, A.M.R. **2002**. Applications of PCR-based tools for detection and identification of animal trypanosomes: a review and perspectives. *Vet. Parasitol.* **109**: 213–231.
- Develoux, M.; Lescure, F.X.; Le Loup, G. y Pialoux, G. **2009**. Chagas disease. *Rev Med Interne*. Feb 5. Epub ahead of print.
- Dias Pinto, J.C. y Schofield, C.J. **1999**. The evolution of Chagas Disease (American Trypanosomiasis) Control after 90 years since Carlos Chagas. *Discovery.* **94**: 103-121.
- Dietrich, P.; Dussan, M.P.; Floeter-Winter; L.M.; Trebilcock, M.H.; Plessman, E. y Soares, M.B. **1990**. Restriction fragment length polymorphisms in the ribosomal gene spacers of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma cororhini*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **42**: 13-20.
- Diez, M.; Favaloro, L.; Bertolotti, A.; Burgos, J.M.; Vigliano, C. y Lastra, M.P. **2007**. Usefulness of PCR strategies for early diagnosis of Chagas' disease reactivation and treatment follow-up in heart transplantation. *Am. J. Transplant.* **7**: 1633–1640.
- Evans, T.; Naidu, T.G.; De Alencar, J.E. y Pearson, R.D. **1984**. The relationship of American visceral leishmaniasis to ABO blood group type. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **33**: 805-807.

-
- Fernández-Pérez, F.J.; Gómez-Muñoz, M.T.; Méndez, S. y Alunda, J.M. **2003**. *Leishmania*-specific lymphoproliferative responses and IgG1/IgG2 immunodetection patterns by Western blot in asymptomatic, symptomatic and treated dogs. *Acta Trop.* **86**: 83-91.
 - Ferreira, A.; Chen, S; Simaan, M.A.; Boston, J.R. y Antaki, J.F. **2006**. A discriminant-analysis-based suction detection system for rotary blood pumps. *Conf. Proc. IEEE Eng. Med. Biol. Soc.* **1**: 5382-5385.
 - Fisa, R.; Riera, C.; Gállego, M.; Manubens, J. y Portús, M. **2001**. Nested PCR for diagnosis of canine leishmaniosis in peripheral blood, lymph node and bone marrow aspirates. *Vet. Parasitol.* **99**: 105- 111.
 - Frasc, A.C.; Goijman, S.G.; Cazzulo, J.J y Stoppani, A.O. **1981**. Constant and variable regions in DNA mini-circles from *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli*: application to species and stock differentiation. *Mol Biochem Parasitol.***4**: 163-170.
 - Gallego, M.; Pratlong, F.; Fisa, R.; Riera, C.; Rioux, J.A.; Dedet, J.P. y Portus, M. **2001**. The Life-Cycle of *Leishmania Infantum* MON-77 in the Priorat (Catalonia, Spain) Involves Humans, Dogs and Sandflies; also Literature Review of Distribution and Hosts of *L. Infantum* Zymodemes in the Old World. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **95**: 269-271.
 - García, A.L.; Kindt, A.; Quispe, W.Q.; Bermúdez, H.; Llanos, A. y Arévalo, J. **2005**. American tegumentary leishmaniasis antigen gene polymorphism, taxonomy and clinical pleomorphism. *Infect. Genet. Evol.* **5**: 109-116.
 - Giuziani, I.; Dellagi, K. e Ismail, R.B. **2002**. Random amplified polymorphic DNA technique for identification and differentiation of Old World *Leishmania* species. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **66**: 152-156.
 - Goç Alves, A.M.; Neheme, N.S. y Morel, C.M. **1984**. Trypanosomatid characteritacion by schizodeme analysis. Genes and Antigens of parasites (A Laboratory Manual) Morel, C.M., Ed, 2nd ed. Fundaçao Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

-
- Golfrey, D.G. y Kilgour, V. **1976**. Enzyme electrophoresis in characterizing the causative agent of Gambian Tripanosomiasis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **71**: 217-225.
 - González C.; Cabrera O.; Munsteman L. y Ferro, C. **2006**. Distribución de *leishmania infantum* (Kinetoplastidia: Trypanosomatidae) en Colombia. *Biomed.* **26**: 64-72.
 - Gramiccia, M.; Smith, D.F.; Angelici, M.C.; Raedy, P.D. y Gradoni, L. **1992**. A kinetoplast DNA probe diagnostic for *Leishmania infantum*. *Parasitol.* **105**: 29-34.
 - Granner, D.K. **1992**. Tecnología de recombinación del DNA. En: Murray R.K., Granner D.K., Mayes P.A., Rodwell V.W. Bioquímica de Harper. (pp. 429-445). México: El Manual Moderno.
 - Grimaldi, G.J.; Tesh, R.B. y McMahon-Pratt, D. **1989**. A review of the geographic distribution and epidemiology of leishmaniasis in the New World. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **41**: 687-725.
 - Grisard, E.C.; Steindel, M.; Shaw, J.J.; Ishikawa, E.A.; Carvalho-Pinto, C.J.; Eger-Mangrich, I.; Toma, H.K.; Lima, J.H.; Romanha, A.J. y Campbell, D.A. **2000**. Characterization of *Leishmania* sp. strains isolated from autochthonous cases of human cutaneous leishmaniasis in Santa Catarina State, southern Brazil. *Acta Trop.* **74**: 89-93.
 - Grisard, E.C. **2002**. Salivaria or Stercoraria? The *trypanosoma rangeli* dilemma. *Kinetoplastid. Biol. Dis.* **1**: 1-2.
 - Guhl, F. y Vallejo, G.A. **2003**. *Trypanosoma Herpetosoma rangeli* Tejera, 1920 – An Updated Review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **98**: 435-442.
 - Guillén, J.L.; López, M.L.; Martín, E. y De Vivar, R. **2002**. Differential serological testing by simultaneous indirect immunofluorescent antibody test in canine leishmaniosis and ehrlichiosis. *Vet. Parasitol.* **109**: 185-190.

-
- Guzmán-Marín, E.S.; Zavala-Castro, J.E.; Acosta-Viana, K.Y. y Rosado-Barrera, M.E. **1999**. The importance of the characterization of *Trypanosoma cruzi* strains. *Rev. Biomed.* **10**: 234-245.
 - Harris, E.; Kropp, G.; Belli, A.; Rodriguez, B. y Agabian, N. **1998**. Single-step multiplex PCR assay for characterization of New World *Leishmania* complexes. *J Clin Microbiol.* **36**: 1989-1995.
 - Henriksson, J.; Dujardin, J.; Barnabe, C.; Brisse, S.; Timperman, G.; Venegas, J.; Pettersson, U.; Tibayrenc, M. y Solari, A. **2002**. Chromosomal size variation in *Trypanosoma cruzi* is mainly progressive and is evolutionarily informative, *Parasitol.* **124**: 277-286.
 - Herrero, A. **1951**. Estudios sobre leishmaniasis tegumentaria en el Perú: VI. Relación entre leishmaniasis tegumentaria y *Phlebotomus*. *Rev. Perú. Med. Exp. Salud Pública.* **8**: 119-137.
 - Higo, H.; Miura, S.; Horio, M.; Mimori, T.; Hamano, S.; Agatsuma, T.; Yanagi, T.; Cruz-Reyes, A.; Uyema, N.; Rojas de Arias, A.; Matta, V.; Akahane, H.; Hirayama, K.; Takeuchi, T.; Tada, I. y Himeno, K. **2004**. Genotypic variation among lineages of *Trypanosoma cruzi* and its geographic aspects. *Parasitol. Int.* **53**: 337-344.
 - Hoare, C. y Wallace, F. **1966**. Developmental Stages of Trypanosomatid Flagellates: a New Terminology. *Nature.* **212**: 1385-1386.
 - Hoare, C.A. y Wallace F.G. **1972**. Developmental stages of trypanosomatid flagellates. A new terminology. *Nature.* **212**: 1385-1386.
 - Hoare, R.J. **1972**. Practical mastitis control. *Aust. Vet. J.* **48**: 692.
 - Hosseini, S.M.H.; Hatam, G.R. y Ardehali S. **2005**. Characterization of *Leishmania* isolated from unhealed lesions caused by leishmanization. *East. Mediterr. Health. J.* **11**: 240-243.

- <http://www.losmicrobios.com.ar/microbios/>
- <http://www.sin-mosquitos.com>.
- <http://www.who.int/>
- <http://www.who.int/ith/en/>
- http://www.who.int/leishmaniasis/leishmaniasis_maps/en/index.html.
- <http://www.who.int/tdr>, Julio 2007.
- Ibrahim, M.E.; Evans, D.A.; Theander, T.G.; Hassan, A.M. y Kharazmi, A. **1995**. Diversity among *Leishmania* isolates from the Sudan: isoenzyme homogeneity of *Leishmania donovani* versus heterogeneity of *Leishmania mayor*. *Trans. R. Soc. Trop. Hyg.* **89**: 336-339.
- Ikonomopoulos, J.; Kokotas, S.; Gazouli, M.; Zavras, A.; Stoitsiou, M. y Gorgoulis, V. G. **2003**. Molecular diagnosis of leishmaniosis in dogs. Comparative application of traditional diagnostic methods and the proposed assay on clinical samples. *Vet. Parasitol.* **113**: 99-113.
- Iniesta, L.; Fernández-Barredo, S.; Bulle, B.; Gómez, M.T.; Piarroux, R.; Gállego, M., Alunda, J.M. y Portús, M. **2002**. Diagnostic techniques to detect cryptic leishmaniasis in dogs. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **9**: 1137-1141.
- INS, Leishmaniasis. *Bioméd.* **26** (1) 2006.
- Kamhawi, S. **2006**. Phlebotomine sand flies and *Leishmania* parasites: friends or foes. *Trends. Parasitol.* **22**: 439-445.

-
- Kawashita, S.; Sanson, G.; Fernandes, O.; Zingales, B. y Briones, M. **2001**. Maximum-likelihood divergence date estimates based on rARN-gene sequences suggest two scenarios of *Trypanosoma cruzi* intraspecific evolution. *Mol Biol Evol.* **18**: 2250-2259.
 - Khatri, M.L.; Haider, N.; Di Muccio, T. y Gramiccia M. **2006**. Cutaneous leishmaniasis in Yemen: clinicoepidemiologic features and a preliminary report on species identification. *Int. J. Dermatol.* **45**: 40-45.
 - Killick-Kendrick, R.; Lainson, R.; Rioux, J.A. y Safjanova, W.M. **1986**. The taxonomy of Leishmania-like parasites of Reptiles. In: Colloque International. *Leishmania*. Taxonomie et phylogénèse; Applications éco-épidémiologiques. Montpellier, IMEEE. 143-148.
 - Knio, K.N.; Baydoun, E.; Tawk, R. y Nuwayri-Salti, N. **2000**. Isoenzyme characterization of *Leishmania* isolates from Lebanon and Syria. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **63**: 43-47.
 - Lainson, R. y Shaw, J.J. **1987**. Evolution, classification and geographical distribution. The leishmaniasis in biology and medicine In: Peters, W., Kendrick, R., (eds). London, Academic Press: 1-120.
 - Lainson, R. y Shaw J.J. **1998**. New World leishmaniasis - The Neotropical Leishmania species. Cox FEG, Kreier, JP, Wakelin D, editors. *Topley & Wilson's microbiology and microbial infections* (volume **5**), *Parasitology*. 9th ed. New York: Oxford University Press; p. 241-82.
 - Lasri, S.; Sahibi, H.; Natami, A. y Rhalem, A. **2003**. Western blot analysis of *Leishmania infantum* antigens using sera from pentamidine-treated dogs. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **91**: 13-18.
 - Levine, N.D.; Corliss, J.O.; Cox, F.E.G.; Deroux, G.; Grain, J.; Honigberg, B.M.; Leedale, G.F.; Loeblich, A.R.; Lom, J.; Lynn, D.; Merinfeld, E.G.; Page, F.C.;

Poljansky, G.; Sprague, V.; Vavra, J. y Wallace, F.G. **1980**. A Newly Revised Classification of the Protozoa. *J. Protozol.* **27**: 37- 58.

• Lewis, D.J. **1974**. The biology of Phlebotomidae in relation to leishmaniasis. *Ann. Rev. Entomol.* **19**: 363-384.

• Liarte, D.B.; Murta, S.M.F.; Steindel, M. y Romanha, A.J. **2008**. *Trypanosoma cruzi*: Multiplex PCR to detect and classify strains according to groups I and II. *Exp Parasitol.* Dec 16.

• Lofgren, R. **1950**. The structure of *Leishmania tropica* as revealed by phase and electron microscopy. *J. Bacteriol.* **60**: 617-25.

• Lucas, C.; Franke, A.; Cachay, M.; Tejada, A.; Cruz, M.; Kreutzer, R.; Barker, D.; McCann, S.; y Watts, D. **1998**. Geographic distribution and clinical description of leishmaniasis cases in Peru. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **59**: 312 – 317.

• Lucas, C.M.; Franke, E.D.; Cachay, M.I.; Tejada, A.; Carrizales, D. y Kreutzer, R.D. **1994**. *Leishmania (Viannia) lainsoni*: first isolation in Peru. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **51**: 533-537.

• Macedo, A.M.; Machado, C.R.; Oliveira, R.P. y Pena, S.D. **2004**. *Trypanosoma cruzi*: genetic structure of populations and relevance of genetic variability to the pathogenesis of chagas disease. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **99**: 1-12.

• Machado, C. y Ayala, F. **2000**. Nucleotide sequences provide evidence of genetic exchange among distantly related lineages of *Trypanosoma cruzi*. *Proc. Natlt. Acad. Sci. USA* **98**: 7396-7401.

• Machado, E.M.; Alvarenga, N.J.; Romanha, A.J. y Grisard, E.C. **2000**. A simplified method for sample collection and DNA isolation for polymerase chain reaction detection of *Trypanosoma rangeli* and *Trypanosoma cruzi* in triatomine vectors. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **95**: 863-866.

-
- Machado, J.D.; Alonso, C.; Morales, A.; Gómez J.F. y Borges, R. **2002**. Nongenomic Regulation of the Kinetics of Exocytosis by Estrogens. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **301**: 631-637.
 - Magalhaes, J.B.; Andrade, S.G. y Sherlock, Y. **1996**. *Trypanosoma cruzi* strains: behavior after passage into autochthonous or foreign species of triatomine (biological and biochemical patterns). *Rev. Inst. Med. Trop.* **38**: 23-28.
 - Marfurt, J.; Nasereddin, A.; Niederwieser, I.; Jaffe, C.L.; Beck, H.P. y Felger, I. **2003a**. Identification and differentiation of *Leishmania* species in clinical samples by PCR amplification of the minixon sequence and subsequent restriction fragment length polymorphism analysis. *J. Clin. Microbiol.* **41**: 3147-3153.
 - Marfurt, J.; Niederwieser, I.; Makia, N.D.; Beck, H.P. y Felger, I. **2003b**. Diagnostic genotyping of Old and New World *Leishmania* species by PCR-RFLP. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **46**: 115-124.
 - Martín-Sánchez, J.; Gramiccia, M.; Di Muccio, T; Ludovisi, A. y Morillas-Márquez, F. **2004**. Isoenzymatic polymorphism of *Leishmania infantum* in southern Spain. *Trans. R. Soc. Trop.* **98**: 228-232.
 - Mayer, M. y Rocha-Lima, H. **1914**. Zum Verhalten von *Schizotrypanum cruzi* in warhblütem und arthropoden. *Arch. Schiffs. M. Tropenhyg.* **18**: 257-260.
 - Mendoza-León, A.; Luis, L. y Martínez, C. **2002**. The β - Tubulin Gene Region as a Molecular Marker to Distinguish *Leishmania* parasites. *Methods. Mol. Biol.* **179**: 61-83.
 - Miles, M.A.; Lanham, S.M.; Souza, A.A. y Póvoa, M. **1980**. Further enzymic carácter of *Trypanosoma cruzi* and their evaluation for strain identification. *Tran. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **74**: 221-237.
 - Miles, M.A.; Cedillos, R.A.; Povoá, M.M.; Souza, A.A.; de Prata, A. y Macedo, V. **1981**. Do radically dissimilar *Trypanosoma cruzi* strains (zymodemes) cause Venezuelan and Brazilian form Chagas' disease. *Lancet.* **1**: 1338-1340.

-
- Miles, M.A.; Toye, P.J.; Oswald, S.C. y Godfrey, D.G. **1977**. The identification by isoenzyme patterns of two distinct strain groups of *Trypanosoma cruzi*, circulating independently in rural area of Brazil. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **71**: 217-225.
 - Ministerio de Salud del Perú. Dirección General de Salud de las Personas. Dirección del Programa de Control de Enfermedades Transmisibles – Control de Malaria y OEM. Doctrina, Normas y Procedimientos para el control de las Leishmaniasis en el Perú. Perú. **1995**.
 - Minodier, P.; Piarroux, R.; Gambarrelli, F.; Joblet, C. y Dumon, H. **1997**. Rapid Identification of Causative Species in Patients with Old World Leishmaniasis. *J. Clin. Microbiol.* **10**: 2551–2555.
 - Miralles, D.M.; Marín, C.; Magán, R.; Fernández-Ramos, C.; Entrala, E.; Córdova, O.; Vargas, F. y Sánchez-Moreno, M. **2002**. In Vitro culture and biochemical characterization of six *Trypanosome* isolates from Peru and Brazil. *Exp. Parasitol.* **102**: 23-29.
 - Mohebali, M.; Javadian, E.; Yaghoobi-Ershadi, M.R.; Akhavan, A.A; Hajjaran, H. y Abaei, M.R. **2004**. Characterization of *Leishmania* infection in rodents from endemic areas of the Islam Republico of Irán. *East. Mediterr. Health. J.* **10**: 591-599.
 - Moncayo, A. **1999**. Progress towards interruption of transmission of Chagas disease. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **94**: 401-404.
 - Montalvo, A.M.; Fraga, J.; Romero, A.J.; Lianet, M.; Montano, I. y Dujardin, C. **2006**. PCR-RFLP/Hsp70 para identificar y tipificar *Leishmania* de la región neotropical. *Rev. Cubana. Med. Trop.* **58**.
 - Moreira, D.; López-García, P. y Vickerman, K. **2004**. An updated view of kinetoplastid phylogeny using environmental sequences and a closer out group: proposal for a new classification of the class Kinetoplastea. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **54**: 1861-1875.

-
- Moreira, M.A.; Luvizotto, M.C.; García, J.F.; Corbett, C.E. y Laurenti, M.D. **2007**. Comparison of parasitological, immunological and molecular methods for the diagnosis of leishmaniasis in dogs with different clinical signs. *Vet. Parasitol. Epub.* **145**: 245-252.
 - Morel, C.; Chiari, E.; Camargo, E.P.; Mattei, D.M.; Romanha A.J. y Simpsons L. **1980**. Strains and clones of *Trypanosoma cruzi* can be characterized by patterns of restriccions endonuclease products of kinetoplast DNA minicircles. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* **77**: 6810-6814.
 - Morillas, F.; Sánchez, F.; Ocaña, J.; Martín-Sánchez, J.; Ocaña-Wihelmi, J.; Acedo, C. y Sanchez-Marín, M. C. **1996**. Leishmaniosis in the focus of the Axarquía region, Málaga province, southern Spain: a survey of the human, dog, and vector. *Parasitol. Res.* **82**: 569-570.
 - Norieau, F.; Cassab, J.A.; Norieau, F. y Guillén, G. **1999**. La enfermedad de chagas y sus particularidades epidemiológicas en Bolivia. En Chagas, la enfermedad en Bolivia. Conocimientos científicos actuales al inicio del programa de control. La Paz, Bolivia, Ministerio de Salud y Previsión Social. 17-47.
 - Nunes, L.R.; de Carvalho, M.R.C. y Buck, G.A. **1997**. *Trypanosoma cruzi* strains partition into two groups based on the structure and function of the spliced leader RNA and RNA_r gene promoters. *Mol. Biochem. Parasitol.* **86**: 211-224.
 - Oliva, G.; Scalone, A.; Foglia Manzillo, V.; Gramiccia, M.; Pagano, A.; Di Muccio, T. y Gradoni, L. **2006**. Incidence and time course of *Leishmania infantum* infections examined by parasitological, serologic, and nested-PCR techniques in a cohort of naive dogs exposed to three consecutive transmission seasons. *J. Clin. Microbiol.* **44**: 1318-1322.
 - Oliveira, R.P.; Broude, N.E.; Macedo, A.M.; Cantor, C.R.; Smith, C.L. y Pena, S.D.J. **1998**. Probing the genetic population structure of *Trypanosoma cruzi* whit polymorphic microsatellites. *Proc. Natlt. Acad. Sci. USA.* **95**: 3776-3780.

-
- Ovalle, C.E.; Porras, L.; Rey, M.; Ríos, M. y Camargo, Y.C. **2006**. Distribución geográfica de especies de *Leishmania* aisladas de pacientes consultantes al Instituto Nacional de Dermatología Federico Lleras Acosta, E.S.E., 1995-2005. *Bioméd.* **26**: 145-151.
 - Pacheco, R.S.; Martínez J.E.; Valderrama, L.; Momen, H. y Saravia, N.G. **1995**. Genotypic polymorphisms in experimental metastatic dermal leishmaniasis. *Mol. Biochem. Parasitol.* **69**: 197-209.
 - Penin, P.; Sánchez-Moreno, M. y de Diego, J.A. **1998**. Proton Nuclear Magnetic Resonance Análisis of metabolismo end products of the Bolivia strain of *Trypanosoma cruzi* and three of its clones. *Comp. Biochem. Physiol. A. Physiol.* **120**: 571-574.
 - Piarroux, R.; Azaiez, R.; Lossi, A.M.; Reynier, P.; Muscatelli, F.; Gambarelli, F.; Fontes, M.; Dumon, H. y Quilici, M. **1993**. Isolation and characterization of a repetitive DNA sequence from *Leishmania infantum*: development of a visceral leishmaniasis polymerase chain reaction. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **49**: 364-369.
 - Piarroux, R.; Gambarelli, F.; Dumon, H.; Fontes, M.; Dunan, S.; Mary, C.; Toga, B. y Quilici, M. **1994**. Comparison of PCR with direct examination of bone marrow aspiration, myeloculture, and serology for diagnosis of visceral leishmaniasis in immunocompromised patients. *J. Clin. Microbiol.* **32**: 746- 749.
 - Pimenta, P.F.; Pinto da Silva, P.; Rangarajan D.; Smith, D.F. y Sacks, D.L. **1994** *Leishmania major*: association of the differentially expressed gene B protein and the surface lipophosphoglycan as revealed by membrane capping. *Exp Parasitol.* **79**: 468-479.
 - Pratlong, F.; Rioux, J.A.; Marty, P.; Faraut-Gambarelli, F.; Dereure, J.; Lanotte, G. y Dedet, J.P. **2004**. Isoenzymatic Analysis of 712 Strains of *Leishmania Infantum* in the South of France and Relationship of Enzymatic Polymorphism to Clinical and Epidemiological Features. *J. Clin. Microbiol.* **42**: 4077-4082.

-
- Quispe Tintaya, K.W.; Ying, X.; Dedet, J.P.; Rijal, S.; De Bolle, X. y Dujardin, J.C. **2004**. Antigen genes for molecular epidemiology of leishmaniasis: polymorphism of Cysteine Proteinase b and surface metalloprotease Glycoprotein 63 in the *Leishmania donovani*. *Complex. J. Infect. Dis.* **189**: 1035-1043.
 - Rassam, M.B.; Al-Mudhaffar, S.A. y Chance, M.L. **1979**. Isoenzyme carateritition of *Leishmania* species from Iraq. *Ann. Trop. Parasitol.* **73**: 527-534.
 - Reale, S.; Maxia, L.; Vitale, F.; Glorioso, N.S.; Caracappa, S. y Vesco, G. **1999**. Detection of *Leishmania infantum* in dogs by PCR with lymph node aspirates and blood. *J. Clin. Microbiol.* **37**: 2931-2935.
 - Reithinger, R. y Dujardin, J.C. **2006**. Molecular Diagnosis of Leishmaniasis: Current Status and Future Applications. *J. Clin. Microbiol.* **45**: 21-25.
 - Riou, G. y Yot, P. **1977**. Heterogenety of the Kinetoplast DNA molecules of *Trypanosoma cruzi*. *Biochem.* **16**: 2390-2396.
 - Robello, C.; Gamarro, F.; Castanys, S. y Alvarez-Valin, F. **2000**. Evolutionary relationships in *Trypanosoma cruzi*: molecular phylogenetics supports the existence of a new major lineage of strains. *Gene.* **246**: 331-338.
 - Robert, L.L.; Santos-Ciminera, P.D.; Andre, R.G.; Schultz, G.W.; Lawyer, P.G.; Nigro, J.; Masuoka, P.; Wirtz, R.A.; Neely, J.; Gaines, D.; Cannon, C.E.; Pettit, D.; Garvey, C.W.; Goodfriend, D. y Roberts, D.R. **2005**. *Plasmodium*-infected Anopheles mosquitoes collected in Virginia and Maryland following local transmission of *Plasmodium vivax* malaria in Loudoun County, Virginia. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* **21**: 187-193.
 - Rodríguez, P.; Montilla, M.; Nicholls, S.; Zarante, I. y Puerta, C. **1998**. Isoenzymatic Characterization of Colombian strains of *Trypanosoma cruzi*. *Mem. Inst. Oswaldo. Cruz.* **93**: 739-740.

- Rodríguez, P.; Escalante, M.; Díez, H.; Cuervo, C.; Montilla, M.; Nicholls, R.S.; Zarante, I. y Puerta, C. **2002**. Estudio de la variabilidad de seis cepas colombianas de *Trypanosoma cruzi* mediante polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP) y amplificación aleatoria de ADN polimórfico (RAPD). *Bioméd.* **22**: 263-271.
- Rodríguez-González, I.; Marín, C.; Vargas, F.; Córdova, O.; Barrera, M.; Gutiérrez-Sánchez, R.; Alunda, J.M. y Sánchez-Moreno, M. **2006**. Identification and biochemical characterization of *Leishmania* strains isolated in Peru, Mexico, and Spain. *Exp. Parasitol.* **112**: 44-51.
- Rodríguez-González, I.; Marín, C.; Longoni, S.S.; Mateo, H.; Alunda, J.M.; Minaya, G.; Gutiérrez-Sánchez, R.; Vargas, F. y Sánchez-Moreno, M. **2007**. Identification of New World *Leishmania* species from Peru by biochemical techniques and multiplex PCR assay. *FEMS Microbiol. Lett.* **267**: 9-16.
- Rogers, M.E.; Chance, M.L. y Bates, P.A. **2002**. The role of promastigote secretory gel in the origin and transmission of the infective stage of *Leishmania mexicana* by the sandfly *Lutzomyia longipalpis*. *Parasitol.* **124**: 495-507.
- Ross, R. **1903**. Note on the bodies recently described by Leishman and Donovan. *Brit Med. J.* **2**:1261-1262.
- Roura, X.; Sánchez, A. y Ferrer, L. **1999**. Diagnosis of canine leishmaniasis by a polymerase chain reaction technique. *Vet. Rec.* **144**: 262-264.
- Ruiz-Pérez, L.M.; Osuna, A.; Castanys, S. Gamarro, F.; Craciunescu, D.G. y Dadrio, A. **1986**. Evaluation of the toxicity of Rh(III) and Pt(III) complexes against *Trypanosoma cruzi* culture forms. *Drug. Res.* **36**: 13-16.
- Russomando, G.; De Tomassone, M.M.C.; De Guillen, I.; Acosta, N.; Vera, N. y Almiron, M. **1998**. Treatment of congenital Chagas' disease diagnosed and followed up by the polymerase chain reaction. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **59**: 487- 491.

-
- Sacks, D. y Kamhawi, S. **2001**. Molecular aspects of parasite-vector and vector-host interactions in leishmaniasis. *Annu Rev Microbiol.* **55**: 453-483.
 - Saldana, A.; Samudio, F.; Miranda, A.; Herrera, L.M.; Saavedra, S.P. y Cáceres, L. **2005**. Predominance of *Trypanosoma rangeli* infection in children from a Chagas disease endemic area in the west-shore of the Panama canal. *Mem. Inst. Oswaldo. Cruz.* **100**: 729-731.
 - Sánchez-Moreno, M.; Lasztity, D.; Coppens, I. y Opperdoes, F.R. **1992**. Characterisation of Carbohydrate metabolism and demonstration of Glycosomes in a *Phytomonas* sp. Isolated from *Euphorbia characias*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **54**: 185-200.
 - Santos, S.S.; Cupolillo, E.; Junqueira, A.; Coura, J.R.; Jansen, A. y Sturm, N.R. **2002**. The genetic diversity of Brazilian *Trypanosoma cruzi* isolates and the phylogenetic positioning of zymodeme 3, based on the internal transcribed spacer of the ribosomal gene. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* **96**: 755-764.
 - Saravia, N.G.; Holguín, A.F.; Cibulskis, R.E. y D'Alessandro, A. **1987**. Divergent isoenzyme profiles of sylvatic and domiciliary *Trypanosoma cruzi* in the eastern plains, piedmont, and highlands of Colombia. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **36**: 59-69.
 - Saridomichelakis, M.N.; Mylonakis, M.E.; Leontides, L.S.; Billinis, C.; Koutinas, A.F.; Galatos, A.D.; Gouletsou, P.; Diakou, A. y Kontos, V.I. **2005**. Periodic administration of allopurinol is not effective for the prevention of canine leishmaniasis (*Leishmania infantum*) in the endemic areas. *Vet. Parasitol.* **130**: 199-205.
 - Schmidt, G.D. y Roberts, L.S. **1985**. Foundations of Parasitology. Ed. Mosby College. St. Luis.
 - Schönian, G.; Nasereddin, A.; Dinse, N.; Schweynoch, C.; Schallig, H.; Presber, W. y Jafe, C.L. **2003**. PCR diagnosis and characterization of *Leishmania* in local and imported clinical samples. *Diag. Microbiol. Infect. Dis.* **47**: 349-358.

-
- Shamsuzzaman, S.M.; Furuya, M.; Shamsuzzaman, A.K.; Korenaga, M. y Hashiguchi, Y. **2000**. Characterisation of Bangladeshi *Leishmania* isolated from kala-azar patients by isoenzyme electrophoresis. *Parasitol. Int.* **49**: 139-145.
 - Sierra, D.; Ochoa, M.; Calle, J.I.; García, G.; Colorado, D. y Vélez, I.D. **2006**. *Leishmania (Leishmania) mexicana* en el corregimiento de San Matías, municipio de Gómez Plata, Antioquia, Colombia. *Bioméd.* **26**: 232-235.
 - Souto, R.P.; Fernandes, O.; Macedo, A.M.; Campbell, D.A. y Zingales, B. **1996**. DNA markers define two major phylogenetic lineage of *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **83**: 141-152.
 - Steindel, M.; Dias, E.; Carvalho, C.J.; Grisard, E.; Menezes, C.; Murta S.M.F.; Simpson, A.J.G. y Romanha, A.J. **1994**. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) and isoenzyme analysis of *Trypanosoma rangeli* strains. *Mol. J. Euk. Microbiol.* **41**: 261-267.
 - Steindel, M.; Toma, H.K.; Ishida, N.M.; Murta, S.M.; Pinto, C.J.; Grisard, E.C.; Schlemper, B.R.; Ribeiro-Rodriguez, R. y Romana, A.J. **1995**. Biological and isoenzymatic characterization of *Trypanosoma cruzi* Strains isolated from sylvatic reservoirs and vectors from the estate of Santa Catalina, Southern Brazil. *Acta Trop.* **60**: 167-177.
 - Stevens, J.R.; Noyes, H.A.; Dover, G.A. y Gibson, W.C. **1999a**. The Ancient and Divergent Origins of the Human Pathogenic Trypanosomes *Trypanosoma brucei* and *Trypanosoma cruzi*. *Parasitol.* **118**: 107-116.
 - Stevens, J.R.; Noyes, H.A.; Schofield, C.J. y Gibson, W. **2001**. The Molecular Evolution of *Trypanosomatidae*. *Adv. Parasitol.* **48**: 1- 56.

-
- Sturm, N.R.; Degraeve, W. y Morel, C. Simpson, L. **1989**. Sensitive detection and schizodeme classification of *Trypanosoma cruzi* cells by amplification of kinetoplast minicircle DNA sequences: use in diagnosis of Chagas' disease. *Mol. Biochem. Parasitol.* **33**: 205-214.
 - Tibayrenc, M.; Ward, P.; Moya, A. y Ayala, F. **1986**. Natural populations of *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas' disease, have a complex multiclonal structure. Proceedings of the National. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* **83**: 115-119.
 - Tybairenc, M.; Neubauer, K.; Barnabe, C.; Guerrini, F.; Skareckey, D. y Ayala, F.J. **1993**. Genetic characterization of six parasitic protozoa parity between random primer DNA typing and multilocus enzyme electrophoresis. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* **90**: 1335-1339.
 - Tibayrenc, M. **1998**. Genetic epidemiology of parasitic protozoa and other infectious agents: the need for an integrated approach. *Int. J. Parasitol.* **28**: 85-104.
 - Tibayrenc, M. **2003**. Genetic subdivisions within *Trypanosoma cruzi* (Discrete Typing Units) and their relevance for molecular epi- demiology and experimental evolution. *Kinetoplastid. Biol. Dis.* **2**: 12.
 - Tojal da Silva, A.C.; Cupolillo, E.; Volpini, C.A.; Almeida, R. y Romero, G.A.S. **2006**. Species diversity causing human cutaneous leishmaniasis in Rio Branco, state of Arce, Brazil. *Trop. Med. Int. Health.* **2**: 1388-1398.
 - Trager, W. **1953**. The development of *Leishmania donovani* in vitro at 37° C; effects of the kind of serum. *J. Exp. Med.* **97**: 177-88.
 - Travi, B.L.; Jaramillo, C.; Montoya, J.; Segura, I.; Zea, A.; Gonçalves, A. y Velez, I.D. **1994**. *Didelphis marsupiales*, an important reservoir of *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* and *Leishmania (Leishmania) chagasi* in Colombia. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **50**: 557-565.

-
- Umezawa, E.S.; Luquetti, A.; Levitus, G.; Ponce, C.; Ponce, E. y Henriquez, D. **2004**. Serodiagnosis of chronic and acute Chagas' disease with *Trypanosoma cruzi* recombinant proteins: results of a collaborative study in six Latin American countries. *J. Clin. Microbiol.* **42**: 449–452.
 - Urdaneta, S. y Morales, M. **1983**. Pleomorfismo in Trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi* in mice. *Parasit. Immunol.* **6**: 561-570.
 - Urdaneta-Morales, S. y Tejero, F. **1992**. *Trypanosoma rangeli* (Tejera, 1920): observations upon pleomorphism. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **87**: 511-516.
 - Van Eys, E.; Schoone, N.; Kroon, C.M. y Ebeling, SB. **1992**. Sequence analysis of small subunit ribosomal RNA genes and its use for detection and identification of *Leishmania* parasites. *Mol. Biochem. Parasitol.* **51**: 133-142.
 - Vargas, F. **2005**. Epidemiología Molecular de la Tripanosomiasis Americana (*Trypanosoma cruzi* y *Trypanosoma rangeli*) en la Región Norte y Nororiental del Perú. Tesis Doctoral. Director: M. Sánchez-Moreno. Universidad de Granada.
 - Vercammen, F.; Fernández-Pérez, F.J.; Del Amo, C. y Alunda, J.M. **2002**. Follow-up of *Leishmania infantum* naturally infected dogs treated with allopurinol: immunofluorescence antibody test, ELISA and Western blot. *Acta Trop.* **84**: 175-181.
 - Victoir, K.; Bañuls, J.; De Doncker, S.; Cabrera, L.; Alvarez, E. y Arévalo, J. **2003**. Direct Identification of *Leishmania* species in biopsies from patients with american tegumentary leishmaniasis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **97**: 80-87.
 - Volpini, A.C.; Valéria, M.A.; Passos, G.; Oliveira, C. y Romanha, A.J. **2004**. PCR-RFLP to identify *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *L. (Leishmania) amazonensis* causing American cutaneous leishmaniasis. *Acta Trop.* **90**: 31–37.
 - Wang, C.C. **1995**. Molecular mechanisms and therapeutic approaches to the treatment of African trypanosomiasis. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **35**: 93-127.

- Widner, G.; Marinkelle, C.J.; Gulh, F.; Miles, M.A. **1985**. Isozime profiles of *Trypanosoma cruzi* stocks from Colombia and Ecuador. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* **59**: 253-257.
- World Health Organization on behalf of the Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases, **2007**.
- Yeo, M.; Acosta, N.; Llewellyn, M.; Sánchez, H.; Adamson, S.; Miles, G.A.; López, E.; González, N.; Patterson, J.S.; Gaunt, M.W.; de Arias, A.R. y Miles, M.A. **2005**. Origins of Chagas disease: Didelphis species are natural hosts of *Trypanosoma cruzi* I and armadillos hosts of *Trypanosoma cruzi* II, including hybrids. *Int. J. Parasitol.* **35**: 225-233.
- Zambrano, P. **2006**. Informe de leishmaniasis, Colombia semanas 1 a 52 de 2005. *Inf. Quinc. Epidemiol. Nac.* **11**: 40-43.
- Zuño, A. y Guillén, A. **2002**. Leishmaniasis cutánea y mucocutánea en el Perú. *Rev Peru Med Exp Salud Pública.* **19**: 215-219.
- Zavala-Castro, J.E.; Velazco-Castrejón, O. y Hernández, R. **1992**. Molecular characterization of mexican stocks of *Trypanosoma cruzi* using total DNA. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **47**: 201-209.

9. PUBLICACIONES GENERADAS EN ESTA TESIS

Editorial Manager(tm) for Veterinary Research Communications
Manuscript Draft

Manuscript Number: VERC1462

Title: Canine Leishmaniasis: New isolates in Madrid (Spain)

Article Type: Manuscript

Keywords: *Leishmania infantum*, isoenzyme characterization, kDNA, endonucleases restriction, PCR, PCR-RFLP.

Corresponding Author: Dr. Clotilde Marín, Ph.D.

Corresponding Author's Institution:

First Author: Jesús Urbano

Order of Authors: Jesús Urbano; Manuel Sánchez-Moreno; Lara Ordoñez; Silvia S Longoni; María J Rosales; Jose M Alunda; Ramón Guitiérrez-Sánchez; Clotilde Marín, Ph.D.

Abstract: This study reports the characterization of eight new *Leishmania* strains isolated from dogs in the area of Madrid (Spain): UCM 9, UCM 12, UCM 14, UCM 17, UCM 20, UCM 21, UCM 45 and UCM 75. The isolates were characterized by isoenzyme analysis using six different enzymes, by analysis of kinetoplast DNA (kDNA) restriction fragment-length polymorphism using five different restriction endonucleases, and by PCR analysis targeting a part of the *ssu rRNA* gene; also, PCR amplicons were submitted to RFLP. These isolates were compared with three reference strains typified as *L. infantum* zymodeme MON-1. According to the results and statistical analysis, the isolates were grouped into two clusters which separated the reference strains UCM 1 from UCM 6 and UCM11, in the following way. Cluster I formed by UCM 1, UCM9, UCM 17, UCM 21 and UCM 75. Cluster II was composed of 3 subgroups: the first would be UCM6, UCM14, and UCM 45; the second would be UCM 11 and UCM 12; and the third subgroup would be UCM 20 alone. Thus is, the complexity in the *Leishmania* population is shown by complementing the gold-standard technique of characterization (enzyme polymorphism) with other methodologies.

Canine Leishmaniasis: New isolates in Madrid (Spain)

Jesús Urbano¹, Manuel Sánchez-Moreno¹, Lara Ordoñez², Silvia S. Longoni¹, María J. Rosales¹, Jose M. Alunda², Ramón Guitiérrez-Sánchez³ and Clotilde Marín^{1*}

¹Department of Parasitology. University of Granada, Severo Ochoa s/n, E-18071 Granada (Spain).

² Department of Animal Health, Veterinary School. Av. Puerta de Hierro s/n 18040 Madrid (Spain)

³Department of Statistics, University of Granada, Severo Ochoa s/n, E-18071 Granada (Spain).

* Corresponding author at: C. Marín: Departamento de Parasitología. Facultad de Ciencias. Severo Ochoa s/n. 18071-Granada (Spain). Tel:+34 958 242369; fax: +34 958 243174.

E-mail address: cmaris@ugr.es

ABSTRACT

This study reports the characterization of eight new *Leishmania* strains isolated from dogs in the area of Madrid (Spain): UCM 9, UCM 12, UCM 14, UCM 17, UCM 20, UCM 21, UCM 45 and UCM 75. The isolates were characterized by isoenzyme analysis using six different enzymes, by analysis of kinetoplast DNA (kDNA) restriction fragment-length polymorphism using five different restriction endonucleases, and by PCR analysis targeting a part of the ssu rRNA gene; also, PCR amplicons were submitted to RFLP. These isolates were compared with three reference strains typified as *L. infantum* zymodeme MON-1. According to the results and statistical analysis, the isolates were grouped into two clusters which separated the reference strains UCM 1 from UCM 6 and UCM11, in the following way. Cluster I formed by UCM 1, UCM9, UCM 17, UCM 21 and UCM 75. Cluster II was composed of 3 subgroups: the first would be UCM6, UCM14, and UCM 45; the second would be UCM 11 and UCM 12; and the third subgroup would be UCM 20 alone. Thus is, the complexity in the *Leishmania* population is shown by complementing the gold-standard technique of characterization (enzyme polymorphism) with other methodologies.

Keywords: *Leishmania infantum*, isoenzyme characterization, kDNA, endonucleases restriction, PCR, PCR-RFLP.

INTRODUCTION

Leishmania infantum is the aetiological agent of Canine Visceral Leishmaniasis (CanVL), which is a widespread zoonosis in which dogs are the main reservoir hosts, being part of the domestic (pet dogs) and peridomestic (stray dogs and wild canids) transmission cycles. This infection constitutes a veterinary and public-health problem in most countries bordering the Mediterranean, in China, and in South America. In Spain, the first Leishmaniasis report is dated to 1913 (Fernandez Martínez and Camacho Alexandre 1913), and since then certain regions have been considered to be endemic with a prevalence higher than 40% (Acedo Sanchez et al. 1996; Morillas et al. 1996; Solano-Gallego et al. 2001). CanVL in the Mediterranean region is responsible for visceral, cutaneous and exceptionally cutaneo-mucosal or mucosal leishmaniasis (Miro et al. 2008). It has been estimated that at least 2.5 million dogs are infected in southwestern Europe alone (Moreno and Alvar 2002), and the disease is spreading north into the foothills of the Alps and the Pyrenees (Ferroglio et al. 2006; Gallego 2004; Campino et al. 2006). The infection in endemic areas is widespread, but not all infected dogs develop the disease. Nevertheless, infection spreads quickly and extensively among the dog population when environmental conditions for transmission are optimal, such as high vector sand-fly and canine-host densities, (Oliva et al. 2006; Quinnell et al. 1997; Quinnell et al. 2003). CanVL is often diagnosed in nonendemic countries, and the need for detection and treatment of this disease is also imperative in Northern Europe and other areas where no natural transmission occurs (Teske et al. 2002; Shaw et al. 2003). This is due mostly to the increased travel of dogs in and out of endemic areas.

The major problem in molecular epidemiology of leishmaniasis is to typify the aetiological agent. To solve this problem, different methods have been used for the identification and classification of *Leishmania* parasites, such as lectin agglutination,

isoenzyme analysis or Multilocus Enzyme Electrophoresis (MLEE, isoenzyme analysis), analysis of kDNA restriction fragment by different restriction endonuclease, etc.. MLEE is the considered the gold-standard method for *Leishmania* identification at the species and intra-species level. *L. infantum* is characterized by a broad enzymatic polymorphism which includes 31 zymodemes (Pratlong et al. 2001). Some of them were related to VL only (e.g. MON-27, 28, 72, 77, 187), others only to cutaneous leishmaniasis (CL) (e.g. MON-11, 29, 33, 78, 111), and a few were isolated from both VL and CL cases (e.g. MON-1, 24, 34, 80). Both, for epidemiological studies on VL caused by *L. infantum*, require the use of techniques that are able to differentiate MON-1 strains, and for classification of the pathogen below the species level, standard MLEE is of limited usefulness. For example, *L. infantum* is confused with *L. donovani* in Sudan (Pratlong et al. 2001; Lukes et al. 2007), and *L. killicki* with *L. tropica* in Tunisia as well as Libya (Bouratbine et al. 2005). DNA-based techniques, such as the analysis of kDNA restriction fragment, PCR or PCR-restriction fragment length polymorphism (RFLP) have high discriminatory power that enables further characterization of the parasite diversity but its use is limited for studies above the species level. Thus, *Leishmania* identification requires the use of the methods described above.

The correct identification *Leishmania* of strains circulating in dogs is important not only to correlate with the form of disease that they produce and to establish an effective treatment, but also at epidemiological level to ascertain which strains are asymptomatic and which strains are more infective for humans. Thus, the aim of the present work was characterize eight new dog *Leishmania* isolates from Madrid (Spain) in comparison with three strains (MON-1, Bulle et al. 2002), using isoenzyme electrophoretic analysis of their isoenzyme profiles, analysis of kDNA restriction fragment, PCR multiplex assay, and PCR-RFLP with HaeIII.

MATERIALS AND METHODS

Parasite isolation and *in vitro* culture

Eight new *Leishmania* strains were isolated from dogs in the area of Madrid by the Animal-Health Laboratory, Veterinary School (Madrid, Spain). For comparison, we also included three strains of *L. (L.) infantum*, all belonging to zymodeme MON-1: MCAN/ES/00/UCM1, MCAN/ES/00/UCM6 and MCAN/ES/00/UCM11 (Bulle et al. 2002). The strains were isolated and grown as promastigotes on Novy-MacNeal-Nicolle (NNN) biphasic culture medium with a liquid phase of MTL (Medium for Trypanosome Liquid; Ruiz-Pérez et al. 1986) plus 10% inactivated foetal bovine serum kept in an air atmosphere at 28°C. Parasites were cultured on a large scale in MTL with 10% foetal bovine serum.

Isoenzyme characterization

Crude homogenates were obtained from 250 ml of culture medium containing 2×10^7 cells/ml. Cells were harvested by centrifugation at 1500 g x 10 min, washed twice in a phosphate-buffered saline (pH 7.4), and resuspended in a hypotonic enzyme stabilizer solution containing 2 mM dithiothreitol, 2 mM *E*-aminocaproic acid, and 2 mM EDTA (Fernández-Ramos et al. 1999). The samples were frozen at -80°C for 15 min and thawed at 25°C. After several freezing-thawing cycles, cell lysates were centrifuged at 8000 g x 20 min at 4°C, and the supernatants were stored in liquid nitrogen until used. The protein concentration was determined using the Bradford method and stored at a final concentration of 1 mg/ml of protein.

The enzymes were separated by isoelectric focusing in a PhastSystem apparatus, using Phast-gel IEF 3-9 (Pharmacia, Freiburg, Germany). The following enzymes were

tested: malic enzyme (ME, E.C. 1.1.1.40), malate dehydrogenase (MDH, E.C.1.1.1.37), isocitrate dehydrogenase (IDH, E.C.1.1.1.42), glucose phosphate isomerase (GPI, E.C. 5.3.19), glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD, E.C. 1.1.1.49) and superoxide dismutase (SOD, E.C. 1.5.1.1). The staining procedures are described in Fernández-Ramos et al. (1999).

Kinetoplast-DNA isolation

Promastigotes were harvested in the exponential phase by centrifugation at 1500 g x10 min of 300 ml of culture medium. When their concentrations had reached about 2×10^7 cells/ml. They were washed twice in 50 ml of 0.15 M NaCl, 0.015 M sodium citrate and once with SE buffer (0.15 M NaCl, 0.1 M EDTA, pH 8.0). Kinetoplast DNA was obtained according to the procedure described by Gonçalves et al. (1984).

Digestion with kDNA restriction enzymes followed by electrophoresis analysis

The kDNA extracts (3 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) were digested to completion with restriction endonucleases (BamHI, EcoRI, HaeIII, HinfI and MspI) according to the manufacturer's prescribed buffer conditions (Boehringer-Ingelheim, Barcelona, Spain). The digestion products were electrophoresed in 1.3% agarose slab gels as described by Riou and Yot (1977) and the fragment sizes were estimated by comparing their mobilities with those of a 1 Kb DNA ladder (Gibco-BRL, Gaithersburg, USA). The gels were stained with ethidium bromide (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ for 10 min) and photographed under UV light with an Olympus Camedia digital camera, C-4000 Zoom.

PCR amplification

The kDNA extracted was subjected to PCR analysis, targeting part of the ssu rRNA gene (van Eys et al. 1992) of *Leishmania*. The *Leishmania*-specific oligonucleotide primers R174 (5-GGTTTCCTTTCCTGATTACG-3) and R798 (5-GCCGGTAAAGGCCGAATAG-3) were used to amplify an approximately 600-bp fragment. Amplification reactions were performed in volumes of 50 µl final reaction mixture comprising 5 µl of isolated kDNA, PCR buffer, 4 mmol/L MgCl₂, 250 µmol/L dNTP, 250 µmol/L dUTP, 1 µmol/L of each primer and 1 U Gold star polymerase. The reactions were cycled in a MyCycler™ Thermal Cycler (BioRad®) with a thermal-cycling profile of 95°C for 5 min, 35 cycles at 60°C for 30 sec, 72°C for 30 sec, 95° for 30 sec, 60°C for 30 sec, and finally 72°C for 10 min (da Silva et al., 2006). A negative control without template DNA was included. Amplification products were analysed on a 1.3% agarose gel containing 0.5 µg/ml ethidium bromide.

PCR-RFLP

PCR-RFLP kDNA was carried out according to (Volpini et al., 2004). Briefly, 5µl of PCR products were digested with 1U HaeIII (Boehringer-Ingelheim, Barcelona, Spain) by incubation for 3 h at 37°C in the manufacturer's buffer. Restriction fragments were separated in 1.3% agarose gel containing 0.5 µg/ml ethidium bromide.

Statistical study

The statistical methods were based on individual hierarchical cluster analysis, selecting the Euclidean distance to the square as the basis for measuring the associations between individuals. The Euclidean distance was calculated by the following grouping procedures: simple linkage ($R k 0.7355$), average linkage among groups ($R k 0.7518$),

average linkage ($R k$ 0.7726), centroid method ($R k$ 0.7586), median method ($R k$ 0.7204), and the Ward method ($R k$ 0.7570). The cophenetic coefficient ($R k$) measures the degree of distortion between relationships, means in terms of original distances between individuals, and those existing at the end of the analysis. The one with the highest cophenetic correlation was chosen as the optimal method.

In the selection procedures the average linkage between groups was considered, using the coefficient $R k$ of R and, which is an index of the similarity between classifications. This analysis was made with the StatGraphics program, version 5.0.

RESULTS

Leishmania isolates from dogs grew up to 2×10^7 cell/ml in MTL medium plus 10% inactivated foetal bovine serum. The isoenzymatic profiles are shown in the Figure 1, in which the six enzyme systems (ME, G6PD, GPI, IDH, MDH and SOD) revealed few variations in the number of bands and their isoelectric point. In general, we can identify 2 groups in the entire isoenzymatic pattern except in three enzymes: ME, IDH and MDH (Fig. 2A, D, and F). The reference strains had similar numbers and mobility of the bands only for the enzymes IDH and SOD (Fig. 2 D and G, lines 5, 9 and 11); UCM 6 and UCM 1 shared the same pattern in the ME and MDH enzymes (Fig. 2A and F, lines 5 and 11); and UCM 1 and UCM 11 had the same pattern for G6PD and GPI enzymes (Fig. 2B and C, lines 11 and 9). The new isolate UCM 45 differed from all the other isolates in the enzymes ME and MDH (Fig. 2A and F, line 6). Similarly, the isolate UCM 17 differed for the ME enzyme (Fig. 2A, line 2) and the isolate UCM 21 in the IDH profile (Fig. 2D, line 7).

The kDNA of the eight isolates and the three reference strains were purified and then digested with five restrictions enzymes (BamHI, EcoRI, HaeIII, HinfI, and MspI).

The kDNA restriction products were electrophoresed in 1.3% agarose gel (Fig. 3). All the DNA endonucleases essayed were capable of digesting the different kDNAs in different-sized fragments. The heterogeneous restriction profiles were remarkable in all the kDNAs studied. The reference-strain pattern coincided only for UCM 1 and UCM 6 with HaeIII (Fig. 2C, lines 5 and 11). Figure 2A shows four different profiles by digestion with BamHI: one group with 5 fragments (UCM 12 and UCM11), a second group with 4 fragments (UCM 9, UCM 17, UCM 75, UCM 21 and UCM 1), and the third group with two fragments (UCM 12 and UCM 11). The EcoRI (Fig. 2B) digested the kDNAs in two fragments, but with three different-sized groups, except for UCM 14, for which the kDNA was restricted in three fragments (Fig. 2B, line 4). Figure 2D presents the homogeneous digestion profile by HinfI with four kDNA fragments in UCM 9, UCM 17, UCM 75, and UCM 1 (Fig. 2D, lines 1-3 and 11). In the same way, the digestion by MspI produced a homogeneous profile with two kDNA fragments in UCM 9, UCM 17, UCM 75, UCM 21 and UCM 1 (Fig. 2E, lines 1-3, 7 and 11).

The PCR amplified a part of the *ssu rRNA* gene with size product of approximately 400-bp in all the reference strains and UCM 9, UCM 17, UCM 75, UCM 14, UCM 12 and UCM 20 (Figure 3, lines 1, 2, 3, 4, 5, 8, 9, 10 and 11), different results has been obtained for UCM 45 and UCM 21 with an approximately 700-bp fragment. The digestion of the PCR products by HaeIII highlights 2 different RFLP patterns according to the groups obtained by PCR: four fragments ranging between 150-bp to 400-bp in the reference strains group, 3 fragments for the 150-bp and 700-bp groups.

DISCUSSION

Dogs are considered the classical reservoir of *L. infantum*, infected mainly by the zymodeme MON-1, which is the common aetiological agent of leishmaniasis in

Mediterranean countries (Gallego et al. 2001; Pratlong et al. 2004). The separate statistical analysis of the results found in the present study showed two clusters. The statistical study made on the basis of the results from the isoenzyme-pattern comparisons showed two clusters: cluster I with *UCM 1*, *UCM 11*, UCM 9, and UCM 17; and cluster II with *UCM 6*, UCM 12, UCM 14, UCM 20, UCM 21, UCM 45, and UCM 75 (data not shown). When the dendrogram was constructed on the basis of the restriction cleavage patterns, the isolates were differentiated in two groups: cluster I contained *UCM 1*, UCM 9, UCM17, UCM 21, and UCM 75, and cluster II with *UCM 6*, *UCM 11*, UCM 12, UCM 14, UCM 20, and UCM 45 (data not shown). In the same way, the statistical treatment of the PCR and PCR-RFPL results clearly showed two clusters: one grouped the isolates *UCM 6*, UCM 20 and UCM 45, and the rest of the isolates formed the second cluster (data not shown).

The statistical analysis of all the results together provides a most appropriate identification and phylogenetic relationship (Fig. 4). This hierarchical cluster analysis (or dendrogram) grouped the isolates into two clusters which separated the reference strains UCM 1 from UCM 6 and 11, in the following way, cluster I formed by UCM 1, UCM9, UCM 17, UCM 21, and UCM 75; and cluster II was composed of 3 subgroups: the first would be UCM6, UCM14, and UCM 45; the second would be UCM 11 and UCM 12; and the third subgroup would be UCM 20 alone.

According to up-to-date seroprevalence information for dogs in Spain, Madrid is around 8% (<http://www.sin-mosquitos.com/pages/sp/sp.asp>). Unfortunately, information about the *Leishmania* strains circulating is scarce. However, it has been established that *L. infantum* is endemic in Spain and corresponds to 20 different zymodemes (Martín Sánchez et al. 2004). The lack of literature available together with the small sample of isolates studied, limits the discussion of our results.

Conclusion. Despite that the enzyme polymorphism is the gold-standard technique for identification, the complementary use of other methodologies reveals the complexity in the *Leishmania* population and confirms the presence of *L. infantum* in Spain.

Acknowledgements

This investigation received financial supports from MEC (Spain) - CGL2006-27889-E/BOS.

References

Acedo Sanchez C, Martin Sanchez J, Velez Bernal ID, Sanchis Marin MC, Louassini M, Maldonado JA, Morillas Marquez F (1996) Leishmaniasis eco-epidemiology in the Alpujarra Region (Granada Province, Southern Spain). *Int J Parasitol* 26: 303-310.

Bouratbine A, Aoun K, Ghrab J, Harrat Z, Ezzedini MS, Etljani S (2005) Spread of *Leishmania killicki* to central and south-west Tunisia. *Parasite* 12: 59-63.

Bulle B, Millon L, Bart JM, Gallego M, Gambarelli F, Portus M, Schnur L, Jaffe CL, Fernandez-Barredo S, Alunda JM, Piarroux R (2002) Practical approach for typing strains of *Leishmania infantum* by microsatellite analysis. *J Clin Microbiol* 40: 3391-3397.

Campino L, Pratlong F, Abranches P, Rioux JA, Santos-Gomes G, Alves-Pires C, Cortes S, Ramada J, Cristovao JM, Afonso MO, Dedet JP (2006) Leishmaniasis in Portugal: Enzyme polymorphism of *Leishmania infantum* based on the identification of 213 strains. *Trop Med Int Health* 11: 1708-1714.

da Silva ES, van der Meide WF, Schoone GJ, Gontijo CMF, Schallig HDFH, Brazil RP (2006) Diagnosis of Canine Leishmaniasis in the endemic area of Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil by parasite, antibody and DNA detection assays. *Vet Res Commun* 30: 637-643.

Fernández Martínez F, Camacho Alexandre F (1913) Kala-azar infantil en las costas granadinas. *Actual Med* 3: 82-93

Fernández-Ramos C, Luque F, Fernández-Becerra C, Osuna A, Jankevicius SI, Jankevicius JV, Rosales MJ, Sánchez-Moreno M (1999) Biochemical characterisation of flagellates isolated from fruits and seeds from Brazil. *FEMS Microbiol Lett* 170: 343-348.

Ferroglio E, Romano A, Trisciuglio A, Poggi M, Ghiggi E, Sacchi P, Biglino A (2006) Characterization of *Leishmania infantum* strains in blood samples from infected dogs and Humans by PCR-RFLP. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 100: 636-641.

Gallego M (2004) Emerging Parasitic Zoonoses: Leishmaniosis. *Rev Sci Tech* 23, 661-676.

Gallego M, Pratlong F, Fisa R, Riera C, Rioux JA, Dedet JP, Portus M (2001) The life-cycle of *Leishmania infantum* MON-77 in the Priorat (Catalonia, Spain) involves humans, dogs and sandflies; also literature review of distribution and hosts of *L. infantum* Zymodemes in the Old World. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 95: 269-271.

Gonçalves AM, Nehme NS, Morel CM (1984) Trypanosomatid characterization by schizodeme analysis. In: Morel, C.M. (ed) *Genes and Antigens of Parasites (A Laboratory Manual)*, second ed. Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

Gothe R, Nolte I, Kraft W (1997) Leishmaniasis in Dogs in Germany: Epidemiological Case Analysis and Alternatives to Conventional Causal Therapy. *Tierarztl Prax* 25: 68-73.

Herwaldt BL (1999) Leishmaniasis. *Lancet* 354: 1191-1199.

Lukes J, Mauricio IL, Schonian G, Dujardin JC, Soteriadou K, Dedet JP, Kuhls K, Tintaya KW, Jirk, M, Chocholova E, Haralambous C, Pratlong F, Obornik M, Horak A, Ayala FJ, Miles MA (2007) Evolutionary and geographical history of the *Leishmania donovani* Complex with a revision of current taxonomy. *Proc Natl Acad Sci USA* 104: 9375-9380.

Martín-Sánchez J, Gramiccia M, Di Muccio T, Ludovisi A, Morillas-Márquez F (2004) Isoenzymatic polymorphism of *Leishmania infantum* in southern Spain. *Trans R Soc Trop* 98: 228-232.

Miro G, Cardoso L, Pennisi MG, Oliva G, Baneth G (2008) Canine Leishmaniosis-new concepts and insights on an expanding zoonosis: Part Two. *Trends Parasitol* 24: 371-377.

Moreno J, Alvar J (2002) Canine Leishmaniasis: epidemiological risk and the experimental model. *Trends Parasitol* 18: 399-405.

Morillas F, Sanchez Rabasco F, Ocana J, Martin-Sanchez J, Ocana-Wihelmi J, Acedo C, Sanchiz-Marin MC (1996) Leishmaniosis in the focus of the Axarquía Region, Málaga Province, southern Spain: A survey of the human, dog, and vector. *Parasitol Res* 82: 569-570.

Oliva G, Scalone A, Foglia Manzillo V, Gramiccia M, Pagano A, Di Muccio T, Gradoni L (2006) Incidence and time course of *Leishmania infantum* infections examined by parasitological, serologic, and Nested-PCR techniques in a cohort of naive dogs exposed to three consecutive transmission seasons. J Clin Microbiol 44: 1318-1322.

Pratlong F, Dereure J, Bucheton B, El-Saf S, Dessein A, Lanotte G, Dedet JP (2001) Sudan: The possible original focus of visceral Leishmaniasis. Parasitol 122: 599-605.

Pratlong F, Rioux JA, Marty P, Faraut-Gambarelli F, Dereure J, Lanotte G, Dedet JP (2004) Isoenzymatic analysis of 712 strains of *Leishmania infantum* in the South of France and relationship of enzymatic polymorphism to clinical and epidemiological features. J Clin Microbiol 42: 4077-4082.

Quinnell RJ, Courtenay O, Garcez L, Dye C (1997) The epidemiology of Canine Leishmaniasis: Transmission rates estimated from a cohort study in Amazonian Brazil. Parasitol 115: 143-156.

Quinnell RJ, Courtenay O, Garcez LM, Kaye PM, Shaw MA, Dye C, Day MJ (2003) IgG subclass responses in a longitudinal study of Canine Visceral Leishmaniasis. Vet Immunol Immunopathol 91: 161-168.

Riou GF, Yot P (1977) Heterogeneity of the kinetoplast DNA molecules of *Trypanosoma cruzi*. Biochem 31: 2390-2396.

Shaw, S.E., Lerga, A.I., Williams, S., Beugnet, F., Birtles, R.J., Day, M.J., Kenny, M.J., 2003. Review of exotic infectious diseases in small animals entering the United Kingdom from abroad diagnosed by PCR. Vet Rec 152: 176-177.

Solano-Gallego L, Morell P, Arboix M, Alberola J, Ferrer L (2001) Prevalence of *Leishmania infantum* infection in dogs living in an area of Canine Leishmaniasis endemicity using PCR on several tissues and serology. J Clin Microbiol 39: 560-563.

Teske E, van Knapen F, Beijer EG, Slappendel RJ (2002) Risk of infection with *Leishmania* Spp. in the canine population in the Netherlands. Acta Vet Scand 43: 195-201.

van Eys GJ, Schoone GJ, Kroon NC, Ebeling SB (1992) Sequence analysis of small subunit ribosomal RNA genes and its use for detection and identification of *Leishmania* parasites. Mol Biochem Parasitol 51: 133-142.

Volpini AC, Passos VM, Oliveira GC, Romanha AJ (2004) PCR-RFLP to identify *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *L. (Leishmania) amazonensis* causing American Cutaneous Leishmaniasis. Acta Trop 90: 31-37.

Figure Legends

Fig. 1. Isoenzyme profiles of *Leishmania* isolates. Organisms: (1) UCM 09; (2) UCM 17; (3) UCM 75; (4) UCM 14; (5) UCM 06; (6) UCM 45; (7) UCM 21; (8) UCM 12; (9) UCM 11; (10) UCM 20; (11) UCM 1. Enzymes: (A) malic enzyme (ME); (B) glucose 6-phosphate dehydrogenase (G6PDH); (C) glucose phosphate isomerase (GPI); (D) isocitrate dehydrogenase (IDH); (E) malate dehydrogenase (MDH); (F) superoxide dismutase (SOD).

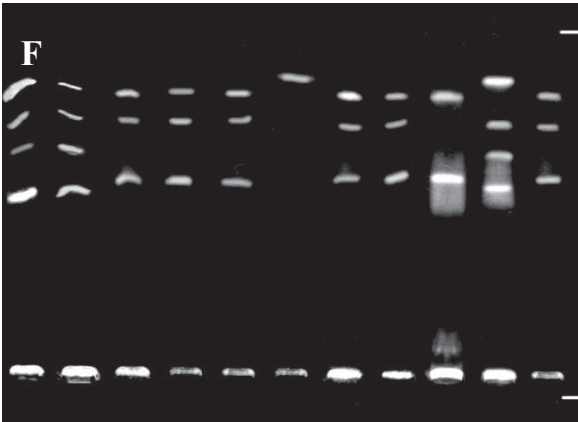
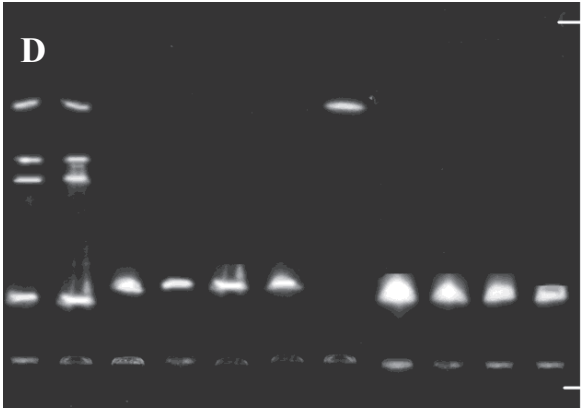
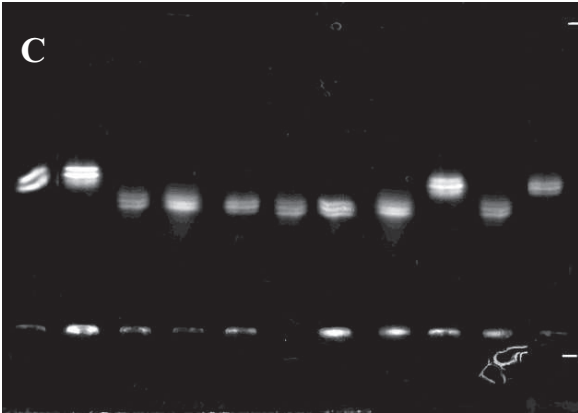
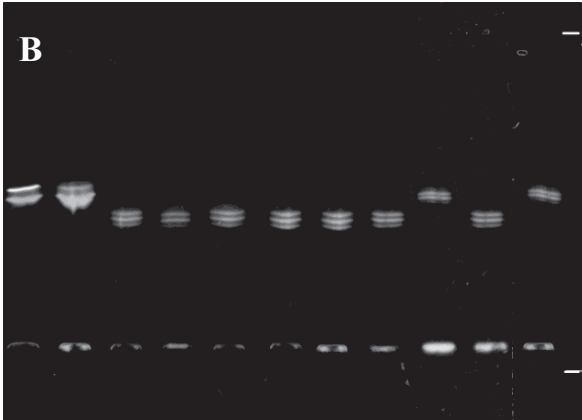
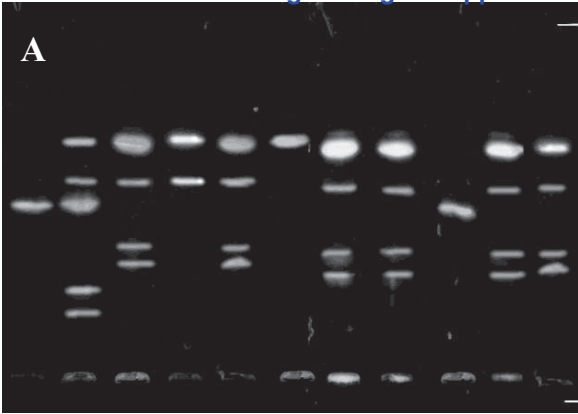
Fig. 2. Restriction endonuclease analysis of kDNA of *Leishmania* isolates. (A) kDNAs + BamHI; (B) kDNAs + EcoRI; (C) kDNAs + HaeIII; (D) kDNAs + HinfI; and (E) kDNAs + MspI. Lane : (1) UCM 09; (2) UCM 17; (3) UCM 75; (4) UCM 14; (5) UCM 06; (6) UCM 45; (7) UCM 21; (8) UCM 12; (9) UCM 11; (10) UCM 20; (11) UCM 1. (M) Size marker: 10000-bp DNA ladder fragments.

Fig. 3. PCR amplified products from different *Leishmania* species and isolates using the primers R174 and R758, before and after HaeIII digestion. In each lane 10 μ L of sample was placed. Lane : (1) UCM 09; (2) UCM 17; (3) UCM 75; (4) UCM 14; (5) UCM 06; (6) UCM 45; (7) UCM 21; (8) UCM 12; (9) UCM 11; (10) UCM 20; (11) UCM 1. (M) 100-bp molecular weight DNA ladder.

Fig. 4. Dendrogram based on individual hierarchical cluster analysis (Program Stat-Graphics version 5.0)

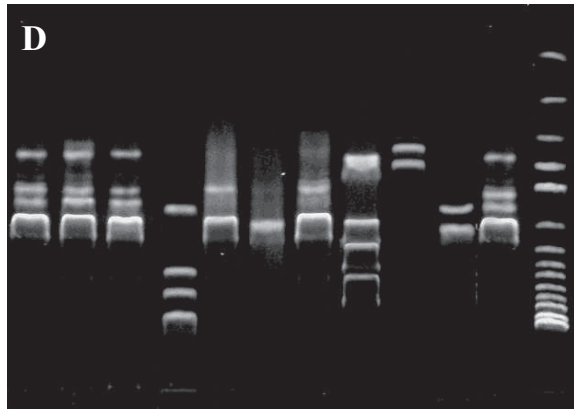
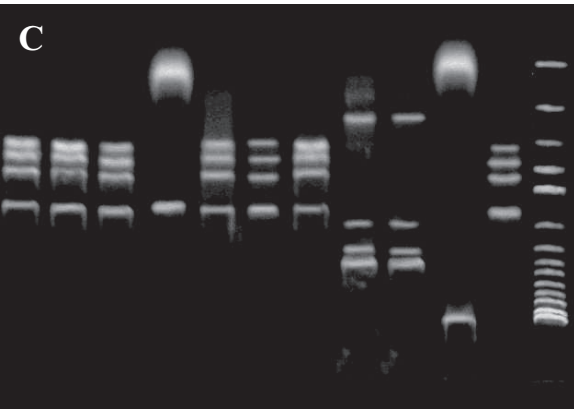
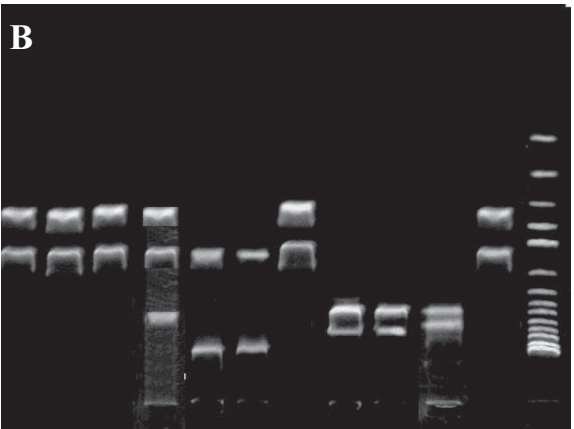
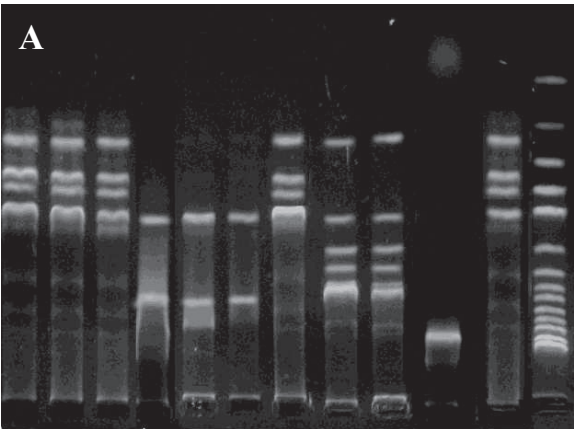
line figure

[Click here to download line figure: Figure 1.ppt](#)

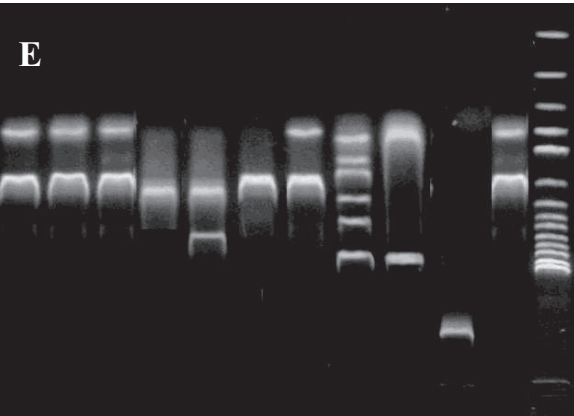


line figure

[Click here to download line figure: Figure 2.ppt](#)



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 M



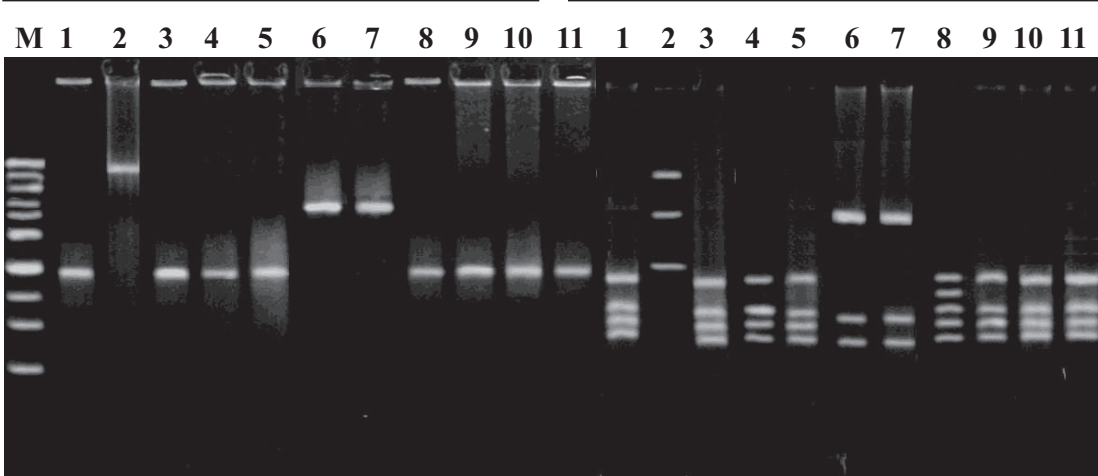
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 M

line figure

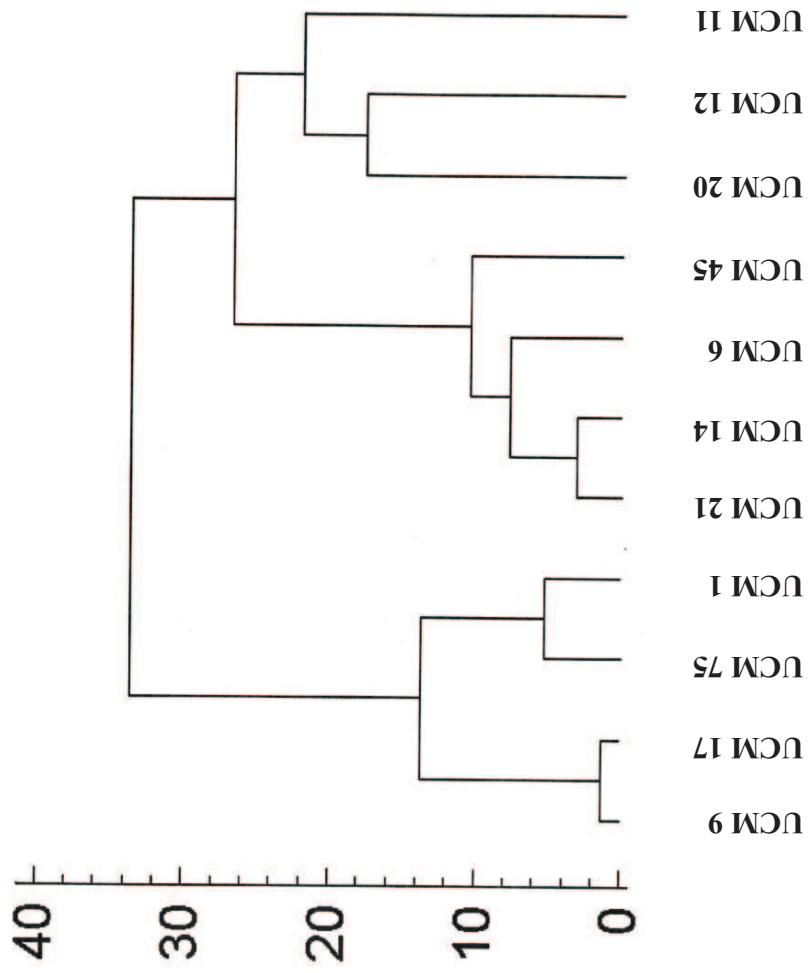
[Click here to download line figure: Figure 3.ppt](#)

PCR

RFLP_HaeIII



line figure
[Click here to download line figure: Figure 4.ppt](#)



Elsevier Editorial System(tm) for Acta Tropica
Manuscript Draft

Manuscript Number: ACTROP-D-09-00255

Title: Molecular characterization of Leishmaniasis aetiological agents in Colombia

Article Type: Regular Articles

Keywords: Leishmaniasis; Colombia; isoenzymatic characterization, kDNA analysis by restriction enzymes, PCR.

Corresponding Author: Dr. Clotilde Marín,

Corresponding Author's Institution:

First Author: Jesús Urbano

Order of Authors: Jesús Urbano; Manuel Sánchez-Moreno; Clemencia E Ovalle; María J Rosales; Yenny C Camargo; Gregorio Perez-Cordón; Ramon Guitierrez-Sánchez; Clotilde Marín

Abstract: Sixteen stocks or species of *Leishmania* isolated from patients of the National Dermatology Institute of Bogotá (Colombia) have been characterized by means of isoenzymatic characterization, kDNA analysis by restriction enzymes, and PCR assay. These isolates were compared with 8 reference stocks and typified as: *L. braziliensis*, *L. guyanensis*, *L. panamensis*, *L. mexicana*, *L. amazonensis*, *L. colombiensis*, *L. peruviana*, and *L. chagasi*. Our results and the statistical study gave 3 clusters. The isolates LL 104, LL 92, and LL 35 were phylogenetically closer to *L. braziliensis* (Cluster 1), with Cluster 2 formed by the other two subclusters. On the one hand, there was *L. panamensis* and the isolates LL 113, LL 01, LL 106, LL 125; LL 04, LL 119, and LL 09 plus Subcluster 2-2 formed by *L. colombiensis*. Cluster 3 included Subcluster 3-1, which contained *L. amazonensis* and the isolates LL 03, LL 05, LL 109, and LL 110, with Subcluster 3-2 comprised of the isolates LL 08 and LL 012 and by the last subcluster, 3-3, made up of *L. mexicana*. The dominant species was *L. panamensis*, with 44% and with a quite uniform distribution throughout the country, followed by *L. amazonensis* with 25%, distributed preferentially along the Pacific coast and

to the south of the country, while *L. braziliensis*, with 19%, was distributed mainly in the centre and east of the country, while 10% remained undetermined. None of the isolates were identified as belonging to *L. mexicana*. Identifications at the species level require the joint use of several techniques: isoenzymatic analysis together with a kDNA study by means of endonucleases.

Molecular characterization of Leishmaniasis aetiological agents in Colombia

Jesus Urbano¹, Manuel Sánchez-Moreno¹, Clemencia E. Ovalle², María J. Rosales¹, Yenny C. Camargo², Gregorio Perez-Cordón, Ramon Guitierrez-Sánchez³ and Clotilde Marín^{1*}

¹Department of Parasitology. University of Granada, Severo Ochoa s/n, E-18071 Granada (Spain).

²Centro Dermatológico Federico Lleras Acosta, E.S.E., Bogotá, D. C., Colombia.

³Department of Statistics, University of Granada, Severo Ochoa s/n, E-18071 Granada (Spain).

* for correspondence: Clotilde Marín Sánchez, Department of Parasitology. University of Granada, Severo Ochoa s/n, E-18071 Granada (Spain). Tel.: +34 958 242369; fax: +34 958 243174. *E-mail address:* cmaris@ugr.es.

ABSTRACT

Sixteen stocks or species of *Leishmania* isolated from patients of the National Dermatology Institute of Bogotá (Colombia) have been characterized by means of isoenzymatic characterization, kDNA analysis by restriction enzymes, and PCR assay. These isolates were compared with 8 reference stocks and typified as: *L. braziliensis*, *L. guyanensis*, *L. panamensis*, *L. mexicana*, *L. amazonensis*, *L. colombiensis*, *L. peruviana*, and *L. chagasi*. Our results and the statistical study gave 3 clusters. The isolates LL 104, LL 92, and LL 35 were phylogenetically closer to *L. braziliensis* (Cluster 1), with Cluster 2 formed by the other two subclusters. On the one hand, there was *L. panamensis* and the isolates LL 113, LL 01, LL 106, LL 125; LL 04, LL 119, and LL 09 plus Subcluster 2-2 formed by *L. colombiensis*. Cluster 3 included Subcluster 3-1, which contained *L. amazonensis* and the isolates LL 03, LL 05, LL 109, and LL 110, with Subcluster 3-2 comprised of the isolates LL 08 and LL 012 and by the last subcluster, 3-3, made up of *L. mexicana*. The dominant species was *L. panamensis*, with 44% and with a quite uniform distribution throughout the country, followed by *L. amazonensis* with 25%, distributed preferentially along the Pacific coast and to the south of the country, while *L. braziliensis*, with 19%, was distributed mainly in the centre and east of the country, while 10% remained undetermined. None of the isolates were identified as belonging to *L. mexicana*. Identifications at the species level require the joint use of several techniques: isoenzymatic analysis together with a kDNA study by means of endonucleases.

Keywords: Leishmaniasis; Colombia; isoenzymatic characterization, kDNA analysis by restriction enzymes, PCR.

1. INTRODUCTION

The diverse clinical forms of leishmaniasis constitute a serious public health problem worldwide. According to the WHO, 350 million people are at risk of contracting the disease, with nearly 12 million people already infected, and some 2 million new cases yearly showing different clinical forms of leishmaniasis, classified in category I as an emerging disease without control (WHO, 2004).

In Latin America, primarily in Andean countries and those sharing the Amazon basin, the disease is present in three main clinical forms: cutaneous, mucocutaneous, and visceral (Herwaldt, 1999). In Colombia, leishmaniasis is considered an endemic disease throughout the country, except for some zones and the capital, Bogotá D.C. (Ovalle et al., 2006). In this country, in 2005, with respect to the previous year, the number of leishmaniasis cases rose by 3,794 (21.9%), i.e. 18,097 reported cases. Of these, 17,983 cases (99.4%), were cutaneous, 60 cases (0.3%) mucocutaneous, and 54 (0.3%) visceral (Zambrano, 2006).

In the Americas, two taxonomic groups of *Leishmania* exist, the subgenera *Leishmania Leishmania* and *Leishmania Viannia*, which are also known as the Brazilensis Complex. This complex includes the species *Leishmania braziliensis*, *Leishmania peruviana*, *Leishmania panamensis*, and *Leishmania guyanensis*. The subgenus *Leishmania* may be further divided into species complexes: the Mexicana Complex (*Leishmania mexicana*, *Leishmania amazonensis*, *Leishmania garnhami*, *Leishmania aristidesi*, and *Leishmania pifanoi*), and the Donovan Complex (*L. chagasi*) (Lainson and Saw, 1987). More than 20 years ago, efforts were made to determine the geographic distribution of the *Leishmania* species in Colombia. To date, numerous species of *Leishmania* have been identified: *L. braziliensis*, *L. guyanensis*, *L. panamensis*, *L. mexicana*, *L. amazonensis*, *L. chagasi*, and others *Leishmania* spp. remaining uncharacterized (Corredor et al., 1990; Saravia et al., 1998; Ovalle et al., 2006).

The marked phenotypic diversity of *Leishmania* has given rise to a complex taxonomy of more than 20 species described, most in Latin America (Lainson and Shaw, 1987). Given the epidemiological complexity of some of the region, with a strongly heterogeneous distribution of parasites, the transmission cycles of the different species can overlap and several species can be found at the same focal point of the disease (Lucas et al., 1998). Intense human migration, as well as tourism, can spread

Leishmania beyond its traditional ecological distribution (Victoir et al., 2003), this justifying the need to typify the species in circulation. That is, the ability to distinguish between *Leishmania* species is crucial when prescribing treatment as well as when determining possible control measures in epidemiological studies. Frequently, *Leishmania* species are identified based on their geographical distribution and on clinical manifestations of the resulting disease. However, geographical origin is an inadequate criterion in non-endemic areas, as well as endemic regions where multiple species of *Leishmania* may coexist. Identification of the infectious species based on clinical symptoms can be problematic, because several species cause both cutaneous and mucocutaneous disease while others cause visceral and cutaneous disease (Schönian et al., 2003).

Diverse characterization methods have been applied to the study of this genus, such as electrophoresis and isoenzymes (Chance and Walton, 1982; Shamsuzzaman et al., 2000; Belhadj et al., 2003; Rodríguez-Gonzalez et al. 2006 and 2007), DNA analysis of the kinetoplast (kDNA) (Gramiccia et al., 1992; Rodríguez-Gonzalez et al. 2006 and 2007), the technique of randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) (Tybairenc et al., 1993; Giuziani et al., 2002) and molecular karyotyping (Marfurt et al., 2003). In recent years, chain-reaction polymerase, followed by the restriction of the amplified product (PCR-RFLP) has become a major tool, not only for identifying, but also for characterizing, species of this genus, in different geographic areas (Quispe Tintaya et al., 2004; García et al., 2005).

The National Dermatology Institute of Bogotá D. C. (Colombia) attends patients from the entire country with different clinical forms of leishmaniasis, from which the etiological agent is isolated. The present study attempts to characterize 16 species of *Leishmania* in Colombia isolates from patients of the National Institute of Dermatology during the period 1995-2005. The characterization was made in comparison with reference stocks: *L. braziliensis*, *L. guyanensis*, *L. panamensis*, *L. mexicana*, *L. amazonensis*, *L. colombiensis*, *L. peruviana*, and *L. chagasi*, by isoenzyme analysis, restriction kDNA analysis using different restriction endonucleases, and PCR assay.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 Parasite isolation and in vitro culture

The 16 stocks were isolated from patients treated by dermatologists in the special leishmaniasis clinic of the National Dermatology Institute of Bogotá D.C. (Colombia). All the patients had a confirmed diagnosis of cutaneous leishmaniasis, and their clinical histories were reviewed to gather information related to the clinical form: probable site of infection, plus the patient's age, sex, and origin (Table 1).

The sample was taken by aspiration of the edge of the cutaneous lesions characterized by multiple ulcerated plaques with violet edges of different sizes and with at various locations of the patient's anatomy. The sample was placed in Seneckjie medium, incubated at 27°C, and monitored for 5 weeks. The parasites isolated were cultivated in Schneider *Drosophila* medium (Sigma Chemical Co.) supplemented to 10% with inactivated foetal bovine serum. Once in the logarithmic growth phase, these isolates were sent from the National Dermatology Institute of Bogotá D.C. to our laboratory (Granada, Spain) and were cultured *in vitro* in MTL medium plus 10% inactivated foetal bovine serum kept in an air atmosphere at 27°C (Fernández-Ramos et al., 1999). For reference stocks, we used *L. peruviana* (MHOM/PE/1984/LC26), *L. guyanensis* (MHO/BR/75/M4147), *L. colombiensis* (IHAR/CO/85/CL500), *L. brazilensis* (MHOM/BR/1975/M2903), *L. panamensis* (MHOM/PA/71/LS94), *L. mexicana* (MHOM/BZ/82/BEL21), *L. amazonensis* (MHOM/BR/73/PH8), and *L. chagasi* (MHOM/BR/74/PP75). The reference stocks were maintained in our laboratory by successive passes in cultures of NNN medium modified with a liquid phase of minimal essential medium (MEM) plus 10% inactivated foetal bovine serum kept in an air atmosphere at 27°C.

2.2. Isoenzyme characterization

Crude homogenates were obtained from 300mL of culture medium containing 2×10^7 cells.mL⁻¹. Cells were harvested by centrifugation at 600 x g 10 min, washed twice in a phosphate-buffered saline (pH 7.4), and resuspended in a hypotonic enzyme stabilizer solution containing 2mM dithiothreitol, 2mME-aminocaproic acid, and 2mM EDTA (Fernández-Ramos et al., 1999). The samples were frozen at -80°C for 15 min and thawed at 25°C. After several freezing–thawing cycles, cell lysates were centrifuged at 8000 x g for 20 min at 4°C, and the supernatants were stored in liquid nitrogen until used. The protein concentration was determined using the Bradford method and stored at a final concentration of 1mg.mL⁻¹ of protein.

The enzymes were separated by isoelectric focusing in a PhastSystem apparatus, using Phast-gel IEF 3-9 (Pharmacia, Freiburg, Germany).

The following enzymes were tested: malic enzyme (EM), glucose 6-phosphate dehydrogenase (G6PDH), isocitrate dehydrogenase (IDH), malate dehydrogenase (MDH), glucose phosphate isomerase (GPI), and superoxide dismutase (SOD). The staining procedures are described in (Fernández-Ramos et al., 1999).

2.3. *kDNA* isolation

Promastigotes were collected by centrifugation of 300mL of culture medium, when their concentrations had reached about 2×10^7 cells.mL⁻¹, after about 5 days. They were washed twice in 50mL of 0.15M NaCl, 0.015M sodium citrate, and once with SE buffer (0.15M NaCl, 0.1M EDTA, pH 8.0). Meanwhile, kDNA was obtained according to the procedure described by Gonçalves (Gonçalves et al., 1984).

2.4. *Restriction-enzyme digestion and electrophoresis analysis*

The kDNA extracts (3 mg.mL⁻¹) were completely digested with restriction endonucleases (Hae III, BamH I, Hinf I, Hind III, EcoR I and Msp I) according to the manufacturer's prescribed buffer conditions (Boehringer-Ingelheim, Barcelona, Spain). The digestion products were electrophoresed in 1.3% agarose slab gels as described elsewhere (Riou and Yot, 1977) and the fragment sizes were estimated by comparing their mobilities with those of a 100-bp DNA ladder (Gibco- BRL, Gaithersburg, USA). The gels were stained with ethidium bromide (10 mgmL⁻¹ for 10 min) and photographed under UV light with a Polaroid camera (665 film).

2.5. *PCR procedure*

The PCR was performed on lysed cultures in a 25 µL reaction mixture consisting of 2.5 µL 10X buffer (Promega), 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM of each nucleotide, 1 µL of each primer, 1.25 units of Taq polymerase (Promega), and 1 µL of lysed culture.

The primer used was based on the sequence from the *L. major* kDNA minicircle: Primer Uni21 was designed on a sequence within the conserved region (5' GGG GTT

GGT GTA AAA TAG GCC 3') and Lmj4 primer design was based on the variable region (5' CTA GTT TCC CGC CTC CGA G 3') (Anders et al., 2002).

Cycling was performed in a thermocycler (Minicycle®, BioRad). After a preheating step of 5 min at 94°C, 36 cycles of denaturation (1 min at 94°C), annealing (1 min at 54°C) and elongation (15 min at 72°C) followed, finally, by an extension step of 10 min at 72°C. Then, the PCR products were loaded on a 1.3% agarose gel containing ethidium bromide and visualized with ultraviolet light. DNA samples (20 ng) from the WHO reference strains were used as positive controls.

2.6. Statistical study

The statistical methods were based on individual hierarchical cluster analysis, selecting the Euclidean distance to the square as the basis for measuring the associations between individuals. The Euclidean distance was calculated by the following grouping procedures of simple linkage (Rk 0.7355), average linkage among groups (Rk 0.7518), average linkage (Rk 0.7726), centroid method (Rk 0.7586), median method (Rk 0.7204), and the Ward method (Rk 0.7570). The cophenetic coefficient (Rk) measures the degree of distortion between relationships, means in terms of original distances between individuals and those existing at the end of the analysis. The one with the highest cophenetic correlation was chosen as the optimal method. In the selection procedures, the average linkage between groups was considered using the coefficient Rk of Rand, which is an index of the similarity between classifications. This analysis was made with the STATGRAPHICS program, version 5.0.

2.7. Ethical considerations

All the patients attended in the clinic of the National Dermatology Institute of Bogotá were informed on the inclusion of the isolates in an institutional biological bank for subsequent research. The protocol of the present study was submitted to the ethical committee that catalogued it as risk-free research, according to the Helsinki declaration.

3. RESULTS

A total of 16 new stocks of *Leishmania* species from patients in the National Dermatology Institute of Bogotá D.C. (Colombia) were isolated, cloned, and cultivated in MTL medium plus 10% IFBS, whereupon cell densities reached on the order of 2×10^7 cell.ml⁻¹. These 16 stocks, together with 8 reference stocks (*L. peruviana*, *L. guyanensis*, *L. colombiensis*, *L. braziliensis*, *L. panamensis*, *L. mexicana*, *L. amazonensis*, and *L. chagasi*) were analysed by isoenzymatic profiles using 6 enzyme systems (EM, G6PDH, IDH, MDH, GPI, and SOD). Some of the enzymatic systems revealed significant differences between the reference stocks in their number of bands and their isoelectric points (Fig. 1). Five enzymatic systems (EM, MDH, IDH, GPI, and SOD) enabled us to differentiate the species *L. peruviana* from the rest of the reference stocks (Fig. 1 A, C, D, E, and F, lane 1). Meanwhile, EM, IDH and MDH differentiated *L. panamensis* from the rest (Fig. 1 A, C, and D, lane 5), and *L. braziliensis* could be differentiated by EM and MDH (Fig. 1 A and D, lane 4). *L. colombiensis* was distinguished by the enzymes G6PDH and MDH (Fig. 1 B and D, lane 3, respectively). However, *L. amazonensis* was not identified by any of the six systems used, while *L. guyanensis* was distinguished by MDH (Fig. 1 D, lane 2) and *L. chagasi* by EM, IDH, and SOD (Fig. 1 A, C, and F, lane 8). When the 16 new *Leishmania* stocks were submitted to isoenzymatic analysis with the six systems, we were able to establish phylogenetic relationships between these isolates and the reference stocks. The isolates LL 01, LL 04, LL 106, LL 113, LL 119, and LL 125 presented isoenzyme profiles resembling *L. panamensis* with less than 5 of the enzymatic systems (Fig. 1 lanes 9, 11, 19, 22, 23, and 24), as occurred with the isolates LL 09, LL 035, LL 92, LL 104 and LL 110), but in this case the profiles were similar to the profile of *L. braziliensis* (Fig. 1, lanes 14, 16, 17, 18, and 21). The isolates LL 03 and LL 012 had a profile resembling that of *L. amazonensis* for 4 or more systems (Fig. 1 lanes 10 and 15). Finally, the isolates LL 05, LL 08, and LL 109 presented a profile which was not clearly similar to that of any of the reference stocks (Fig. 1, lanes 12, 13 and 20).

The kDNA of the 16 isolates and the 8 reference stocks were purified and then digested with 6 restriction endonucleases (BamH I, Hinf I, Hae III, EcoR I, Hind III, and Msp I). The kDNA restriction products were electrophoresed in 1.3 % agarose gels (Fig. 2). All the DNA endonucleases assayed were capable of digesting the various

kDNA in different-sized fragments. The heterogeneous restriction profiles were remarkable in all the DNAs studied. *L. mexicana* presented a restriction pattern that completely differed from the other reference stocks used in this study with 4 of the 6 endonucleases used (Fig. 2 A; C; D and F, lane 6). The restriction pattern of *L. peruviana* with the endonucleases Hae III and EcoR I were differentiated from the rest of the reference stocks (Fig. 2 C and D, lanes 1). *L. colombiensis* was identified with the endonucleases Hinf I and EcoR I (Fig. 2 B and D, lane 3), and *L. chagasi* with EcoR I and Hind III (Fig. 2 D and F, lane 8). The stocks belonging to *L. braziliensis* and *L. guyanensis* were identified with the endonuclease Hind III (Fig. 2 F, lanes 2 and 4), and finally the stocks of *L. amazonensis* y *L. panamensis* were unidentifiable with any of the 6 endonucleases. The 16 new isolates presented two restriction patterns when their kDNA was submitted to the endonuclease BamH I: the isolates LL 01, LL 03, LL 04, LL 05, LL 08, LL 012 LL 106, LL 109; LL 110, LL 113, LL 119, and LL 125 had profiles similar to those of the stocks *L. panamensis* and *L. amazonensis* (Fig. 2 A; lanes: 9-13, 15, and 19-24), while the rest of the isolates presented a profile similar to that of *L. braziliensis* and *L. guyanensis* (Fig. 2. A). When the kDNA of the new isolates was submitted to the action of the endonuclease Hinf I, it gave 5 different restriction patterns: the isolate LL 04 presented 2 fragments similar to that of *L. colombiensis*, the isolates LL 08, LL 35, LL 119, and LL 125 a single fragment. There was no correspondence with the reference stocks (Fig. 2B, lanes 13, 16, 23, and 24), as happened with the isolates LL 012 and LL 110, which presented 6 and 4 kDNA fragments, respectively, without correspondence with the reference stocks (Fig. 2 B, lanes 15 and 21). The rest of the isolates had a profile similar to those of *L. peruviana*, *L. braziliensis*, *L. panamensis*, *L. amazonensis*, and *L. guyanensis* (Fig. 2 B). With the enzyme Hae III, 2 profiles related some of the isolates with some of the reference stocks, e.g. isolates LL 03, LL 04, LL 09, LL 106, LL 119, and LL 125 with stocks *L. braziliensis*, *L. panamensis* and *L. chagasi* (Fig. 2 C lanes 10-11, 14, 18-20, 23, and 24; lanes 4-5 and 8, respectively). The other profile, which includes the group of the isolates LL 05, LL 08, LL 012, LL 35, LL 92, LL 104, and LL 113 (Fig. 2C, lanes 12,13, 15-17, and 22), resembled the profiles of the stocks *L. colombiensis* and *L. amazonensis* (Fig. 2C, lanes 3 and 7); the isolates LL 01 and LL 110 presented a profile that was similar to none of the reference stocks (Fig. 2C, lanes 9 and 21). With the enzyme EcoR I, the isolate LL 08 presented a profile that did not resemble any of the reference stocks (Fig. 2D, lane 13), as occurred with the enzyme MspI, which gave a different restriction

pattern to the reference stocks for the isolates LL 05 and LL 109 (Fig. 2E, lane 12 and 20). When the kDNA of the isolates LL 09 and LL 012 was subjected to the action of the enzyme Hind III, the profiles differed from those of the reference stocks (Fig. 2F, lanes 14 and 15).

Figure 3 presents the result corresponding to the amplification of the kDNA by PCR assay of the 16 new isolates and the 8 references stocks, characterized previously by isoenzyme analysis and by restriction enzymes. An amplification band of approximately 370 bp was visible in all the stains (Fig. 3). In the case of *L. colombiensis*, *L. panamensis*, *L. mexicana* and *L. amazonensis*, a second band of 270 bp was visible, as happened with isolates LL 01, LL 03, LL 04, LL 05, LL 08, LL 012, LL 106, LL 113, LL 119, and LL 125 (Fig. 3, lanes 9 to 13, 15, 19, and 22 to 24). *L. chagasi* presented 3 amplified bands of approximately 150, 360, and 450 bp (Fig. 3, lane 8).

4. DISCUSSION

The genus *Leishmania* contains more than 30 species, which present different ecological and geographic distributions and can infect a great variety of reservoirs and vectors (De Bruijn and Barrer, 1992). In Colombia, leishmaniasis is an endemic disease throughout most of the country, constituting a national public-health problem. For more than 20 years, efforts have been made to determine the geographic distribution of the species of *Leishmania* in the country. The design of prevention and control programmes requires the correct identification of the species of the parasite that is causing the disease in a given area (Sierra et al., 2006).

The National Dermatology Institute of Bogotá attends patients from all over the country, with different clinical forms of leishmaniasis. In the present work, 16 new etiologic agents have been isolated and characterized, both phenotypically (isoenzymatic analysis) as well as genotypically (kDNA studies by restriction enzymes and PCR). It is known that one technique alone makes the exact identification of an isolate difficult, and therefore we analysed the results by the three techniques used (Fig. 4), grouping the isolates into three large clusters. **Cluster 1** in turn contained two **subclusters**: on the one hand, *L. chagasi*, which, according to Laison and Saw (1987) would form the *Donovani* Complex (**subcluster 1-1**), while **Subcluster 1-2** was comprised of *L. guyavensis*, *L. peruviana*, and *L. braziliensis*, together with the isolates LL 104, LL 92, and LL 35. Phylogenetically, these are very close to *L. braziliensis*, and

thus can be considered *L. braziliensis*. From this analysis, we deduce that *L. peruviana* and *L. braziliensis* are related, supporting the observation of previous authors who related the two species by isoenzyme studies (Sierra et al., 2006). **Cluster 2** is formed by another two **subclusters**: **Subcluster 2-1** would include *L. panamensis* and the isolates LL 113, LL 01, LL 106, LL 125; LL 04, LL 119, and LL 09; and **Subcluster 2-2** formed by *L. colombiensis*. **Subcluster 1-2** and **Cluster 2** would form the traditional *Braziliensis* Complex. **Cluster 3** would be composed of **Subcluster 3-1**, which includes *L. amazonensis* and the isolates LL 03, LL 05, LL 109, and LL 110, which we consider to be *L. amazonensis*; **Subcluster 3-2**, composed of the isolates LL 08 and LL 012; and finally Subcluster 3-3, formed by *L. mexicana*. This Cluster 3 would form the *Mexicana* Complex. Isolates LL 08 and LL 012 are loosely related to *L. amazonensis*, although they cannot be considered as this species and perhaps would be a variation within the species or some other species of this same complex not included in this study and therefore we do not have the patterns for comparisons.

Isolates LL 03, LL 04, LL 05, LL 08, and LL 09, were classified at the level of a complex by monoclonal antibodies, isoenzymatic analysis, and PCR, by (Ovalle et al., 2006). The results provided in the present study partially agree with those of the previous work in that the isolates LL 03, LL 05, and LL 08 belong to the *Mexicana* Complex and we can identify them as *L. amazonensis*; and we identify isolates LL 04 and LL 09 as *L. panamensis*.

The dominant species in Colombia was *L. panamensis* (44%), followed by *L. amazonensis* (25%), and *L. braziliensis* (19%), with a portion yet to be determined (10%). These data are consistent with those reported by other authors (Corredor et al., 1990; Cupolillo et al., 1998; Ovalle et al., 2006). The small number of stocks analysed lead us to draw conclusions concerning the geographic distribution of this species. Nevertheless, we can suggest that *L. panamensis* was distributed uniformly throughout the country, *L. braziliensis* was located in the centre and east, while *L. amazonensis* was found along the Pacific coast and in the south of the country. Until now, *L. amazonensis* has been isolated at a very low percentage (Grimaldi et al., 1989) and with a geographic distribution coinciding with our results. Despite that different authors have reported the presence of *L. mexicana* throughout Colombia, we have not identified any new isolates as belonging to *L. mexicana*. This does not mean that the species *L. mexicana* does not exist Colombia, but rather it reminds us that the monoclonal antibodies and even the PCR have limited use for differentiating *L. amazonensis* and *L. mexicana*, and the

isoenzymatic profiles are not definitive, either, in this characterization. However, the combined use of phenotypic and genotypic characters can differentiate the two species. Perhaps many of the stocks characterized to date, such as *L. mexicana*, are in fact *L. amazonensis*; this is logical, since in the places where these species have been identified are located in the Amazon and proximities. This leads us to conclude that it is necessary to use several techniques to identify the species level, such as isoenzymatic analysis together with a kDNA study by means of endonucleases that identify in most cases the species level.

Acknowledgments

We wish to thank Encarnación Guerrero for technical help in culture media preparation. This work was supported by grants from the Project CGL-2006-27889-E of the Ministerio de Ciencia y Tecnología (Spain).

References

- Anders, G., Eisenberger, C. L., Jonas, F. and Greenblatt, C. L.; 2002. Distinguishing *Leishmania tropica* and *Leishmania major* in the Middle East using the polymerase chain reaction with kinetoplast DNA-specific primers. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 96, 87-92.
- Belhadj, S., Pratlong, F., Hammami, M., Kallel, K., Dedet, J.P. and Chaker, E.; 2003. Human cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania infantum* in the Sidi Bourouis focus: epidemiological study and isoenzymatic characterization of the parasites. *Acta Trop.* 85, 83-86.
- Bruijn De, M.H.L. and Barrer, D.C.; 1992. Diagnosis of the New World leishmaniasis: specific detection of species of the *Leishmania braziliensis* complex by amplification of kinetoplast DNA. *Acta Trop.* 52, 145-58.
- Chance, M.L. and Walton, B.C.; 1982. In: Biochemical characterization of *Leishmania*. Chance, M.L., Walton, B. C., (eds). Geneva:UNDP/World Bank/WHO. pp.1-275.
- Corredor, A., Kreutzer, R.D., Tesh, R.B., Boshell, J., Palau, M.T. and Cáceres, E.; 1990. Distribution and etiology of leishmaniasis in Colombia. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 42, 206-214.
- Cupolillo, E., Momen, H. and Grimaldi, G. Jr.; 1998. Genetic diversity in natural populations of New World *Leishmania*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 93, 663-668
- Fernandez-Ramos, C., Luque, F., Fernandez-Becerra, C., Osuna, A., Jankevicius, S.I., Jankevicius, V., Rosales, M.J. and, Sánchez-Moreno, M.; 1999. Biochemical characterisation of flagellates isolated from fruits and seeds from Brazil. *FEMS Microbiol. Lett.* 170, 343-348.
- García, A.L., Kindt, A., Quispe Tintaya, W.Q., Bermúdez, H., Llanos, A. and Arévalo, J.; 2005. American tegumentary leishmaniasis antigen gene polymorphism, taxonomy and clinical pleomorphism. *Infect. Genet. Evol.* 5, 109-16.
- Gonçalves, A.M., Nehme, N.S. and Morel, C.M.; 1984. Trypanosomatid characterization by schizodeme analysis. In: Morel, C.M. (ed). *Genes and antigens of parasites (A laboratory manual)* 2nd. Edn. Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil.
- Gramiccia, M., Smith, D.F., Angelici, M.C., Raedy, P.D. and Gradoni, L.; 1992. A kinetoplast DNA probe diagnostic for *L. infantum*. *Parasitol.* 105, 29-34.
- Grimaldi, G.Jr., Tesh, R.B. and McMahon-Pratt, D.; 1989. A review of the geographic distribution and epidemiology of leishmaniasis in the New World. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 41, 687-725.
- Herwaldt, B.L.; 1999. Leishmaniasis. *Lancet*, 354, 1191-1199.

Ikram, G., Dellaqi, K. and Ismail, R.B.; 2002. Random amplified polymorphic DNA technique for identification and differentiation of Old World *Leishmania* species. Am. J. Trop. Med. Hyg. 66, 152-156.

Lainson, R. and Shaw, J.J.; 1987. Evolution, classification and geographical distribution. In: Peters, W., Kendrick, R., (eds). The Leishmaniasis in Biology and Medicine. London: Academic Press. pp.1-120.

Lucas, C.M., Franke, E.D., Cachay, M.I., Tejada, A., Cruz, M.E. and Kreuzer, R.D.; 1998. Geographic distribution and clinical description of leishmaniasis cases in Peru. Am. J. Trop. Med. Hyg. 59, 312-317.

Marfurt, J., Nasereddin, A., Niederwieser, I., Jaffe, C.L., Beck, H.P. and Felger, I.; 2003. Identification and differentiation of *Leishmania* species in clinical samples by PCR amplification of the miniexon sequence and subsequent restriction fragment length polymorphism analysis. J. Clin Microbiol. 41, 3147-3153.

Ovalle, C.E., Porras, L., Rey, M., Rios, M. and Camargo, Y.C.; 2006. Distribución geográfica de especies de *Leishmania* aisladas de pacientes consultantes al Instituto Nacional de Dermatología Federico Lleras Acosta, E.S.E., 1995-2005. Biomédica. 26, 145-151.

Quispe Tintaya, K.W., Ying, X., Dedet, J.P., Rijal, S., De Bolle, X. and Dujardin, J.C.; 2004. Antigen genes for molecular epidemiology of leishmaniasis: polymorphism of Cysteine Proteinase b and surface metalloprotease Glycoprotein 63 in the *Leishmania donovani* Complex. J. Infect. Dis. 189, 1035-1045.

Riou, G. and Yot, P.; 1977. Heterogeneity of the kinetoplast DNA molecules of *Trypanosoma cruzi*. Biochem. 16, 2390-2396.

Rodríguez-González, I., Marín, C., Vargas, F., Córdova, O., Barrera, M., Gutiérrez-Sánchez, R., Alunda, J.M. and Sánchez-Moreno, M.; 2006. Identification and biochemical characterization of *Leishmania* strains isolated in Peru, Mexico and Spain. Exp. Parasitol. 112, 44-51.

Rodríguez-González, I., Marín, C., Longoni, S. S., Mateo, H., Alunda, J.M., Minaya, G., Gutiérrez-Sánchez, R., Vargas, F. and Sánchez-Moreno, M.; 2007. Identification of New World *Leishmania* species from Peru by biochemical techniques and multiplex PCR assay. FEMS Microbiol Lett 267, 9-16.

Saravia, N.G., Segura, I., Holguín, A.F., Santrich, C., Valderrama, L. and Ocampo, C.; 1998. Epidemiologic, genetic and clinical associations among phenotypically distinct populations of *Leishmania (Viannia)* in Colombia. Am. J. Trop. Med. Hyg. 59, 86-94.

Shamsuzzaman, S.M., Furuya, M., Shamsuzzaman, C., Korenaga, M. and Hashiguchi, Y.; 2000. Characterisation of Bangladeshi Leishmania isolated from kala-azar patients by isoenzyme electrophoresis. Parasitol. Int. 49, 139-145.

Sierra, D., Ochoa, M., Calle, J.I., García, Colorado, D. and Vélez, I.D.; 2006. *Leishmania (Leishmania) mexicana* en el corregimiento de 2006. San Matías, municipio de Gómez Plata, Antioquia, Colombia. *Biomédica*. 26 (Supl.1):232-235.

Schönian, G., Nasereddin, A., Dinse, N., Schweynoch, C., Schallig, H., Presber, W. and Jaffe, C.L.; 2003. PCR diagnosis and characterization of *Leishmania* in local and imported clinical samples. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 47, 349–358.

Tybarenc, M., Neubauer, K., Barnabe, C., Guerrini, F., Skareckey, D. and Ayala, F.J.; 1993. Genetic characterization of six parasitic protozoa parity between random primer DNA typing and multilocus enzyme electrophoresis. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 90, 1335-1339.

World Health Organization (WHO) 2004. Control of the leishmaniases. Report of the scientific working group on leishmaniasis. Geneva, WHO/TDR/SWG, 2004.

Victoir, K., Bañuls, J., De Doncker, S., Cabrera, L., Alvarez, E. and Arévalo, J.; 2003. Direct Identification of *Leishmania* species in biopsies from patients with american tegumentary leishmaniasis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 97, 80-87.

Zambrano, P.; 2006. Informe de leishmaniasis, Colombia semanas 1 a 52 de 2005. *Inf. Quinc. Epidemiol. Nac.* 11,40-43.

Legends

Fig. 1. Isoenzyme profiles of *Leishmania* isolates. Organisms: (1) *L. peruviana* (2); *L. guyanensis*; (3) *L. colombiensis*; (4) *L. braziliensis*; (5) *L. panamensis*; (6) *L. mexicana*; (7) *L. amazonensis*; (8) *L. chagasi*; (9) isolate LL 01; (10) isolate LL 03; (11) isolate LL 04; (12) isolate LL 05; (13) isolate LL 08; (14) isolate LL 09; (15) isolate LL 012; (16) isolate LL 035; (17) isolate LL 092; (18) isolate LL 104; (19) isolate LL 106; (20) isolate LL 109; (21) isolate LL 110; (22) isolate LL 113; (23) isolate LL 119 and (24) isolate LL 125. Enzymes: (A) malic enzyme (ME); (B) glucose 6-phosphate dehydrogenase (G6PDH); (C) isocitrate dehydrogenase (IDH); (D) malate dehydrogenase (MDH); (E) glucose phosphate isomerase (GPI); (F) superoxide dismutase (SOD).

Fig. 2. Restriction endonuclease analysis of kDNA of *Leishmania* isolates. (A) kDNAs+ BamHI; (B) kDNAs+ HinfI; (C) kDNAs+HaeIII; (D) kDNAs+EcoRI; and (E) kDNAs + MspI. (F) kDNAs + HindIII. Lane: (1) *L. peruviana* (2); *L. guyanensis*; (3) *L. colombiensis*; (4) *L. braziliensis*; (5) *L. panamensis*; (6) *L. mexicana*; (7) *L. amazonensis*; (8) *L. chagasi*; (9) isolate LL 01; (10) isolate LL 03; (11) isolate LL 04; (12) isolate LL 05; (13) isolate LL 08; (14) isolate LL 09; (15) isolate LL 012; (16) isolate LL 035; (17) isolate LL 092; (18) isolate LL 104; (19) isolate LL 106; (20) isolate LL 109; (21) isolate LL 110; (22) isolate LL 113; (23) isolate LL 119 and (24) isolate LL 125. Size markers are 1 Kb DNA ladder fragments (Lane 25).

Fig. 3. Amplification products of the PCR multiplex assay from different *Leishmania* species and isolates using the primers Uni21 and Lmj4. In each lane 10 µL of sample was placed. Lane : (1) *L. peruviana* (2); *L. guyanensis*; (3) *L. colombiensis*; (4) *L. braziliensis*; (5) *L. panamensis*; (6) *L. mexicana*; (7) *L. amazonensis*; (8) *L. chagasi*; (9) isolate LL 01; (10) isolate LL 03; (11) isolate LL 04; (12) isolate LL 05; (13) isolate LL 08; (14) isolate LL 09; (15) isolate LL 012; (16) isolate LL 035; (17) isolate LL 092; (18) isolate LL 104; (19) isolate LL 106; (20) isolate LL 109; (21) isolate LL 110; (22) isolate LL 113; (23) isolate LL 119 and (24) isolate LL 125; and (25) Control. Lane M, 100-bp DNA ladder; the lower band shown is 100 bp.

Fig. 4. Dendrogram based on individual hierarchical cluster analysis (Program Stat-Graphics version 5.0).

Table1. Details of 16 *Leishmania* strain isolated from patients of the National Institute of Dermatology (Bogotá D.C., Colombia) during the period 1995-2005.

Code	Clinical manifestation	Patient' details		
		Sex ^a	Years	Place of origin
LL 01	Cutaneous	F	31	Guaviare
LL 03	Cutaneous	M	25	Cauca
LL 04	Cutaneous	M	20	Casanare
LL 05	Cutaneous	M	34	Valle del Cauca
LL 08	Cutaneous	M	20	Santander
LL 09	Cutaneous	F	36	Cundinamarca
LL 012	Cutaneous	M	39	Cundinamarca
LL 035	Cutaneous	F	48	Cundinamarca
LL 092	Cutaneous	M	24	Casanare
LL 104	Cutaneous	M	50	Vichada
LL 106	Cutaneous	M	38	Guaviare
LL 109	Cutaneous	F	13	Cundinamarca
LL 110	Cutaneous	M	20	Vichada
LL 113	Cutaneous	M	33	Santander
LL 119	Cutaneous	M	31	Boyaca
LL 125	Cutaneous	M	55	Boyaca

^aF = female, M = male.

5. Figure(s)
[Click here to download 5. Figure\(s\): Figure 1.ppt](#)

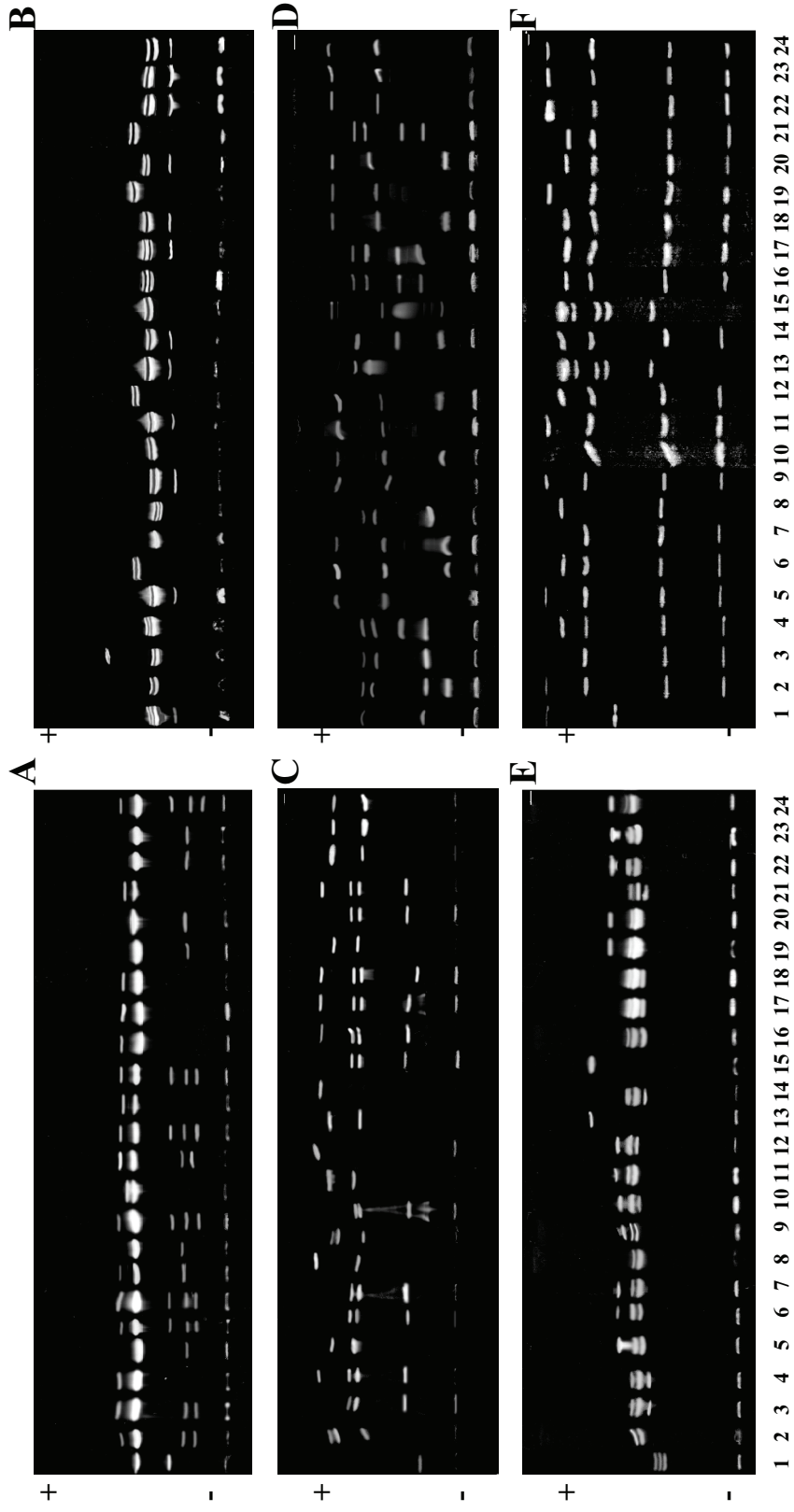


Figure 1. Urbano et al.

5. Figure(s)
Click here to download 5. Figure(s): Figure 2.ppt

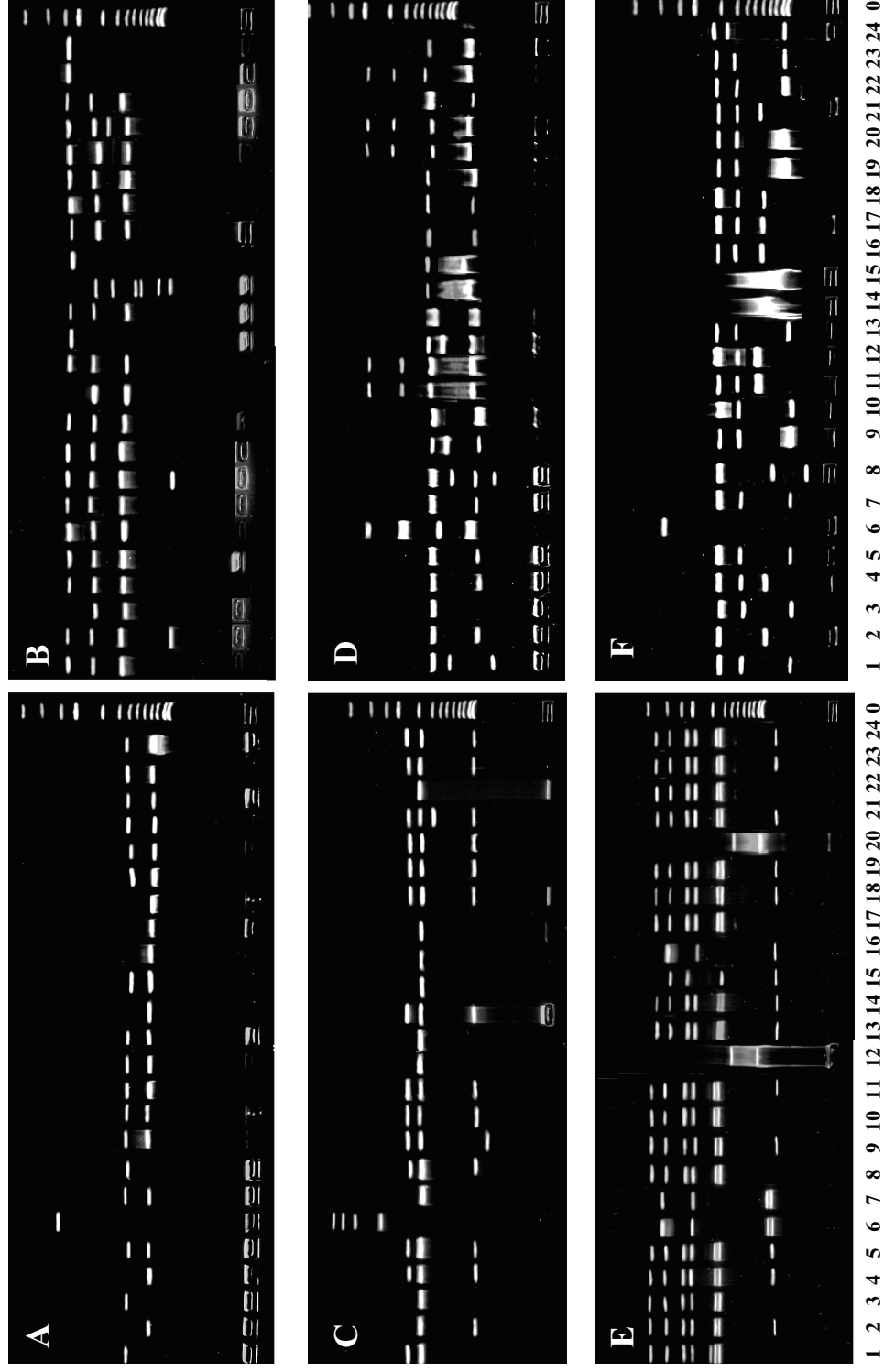


Figure 2. Urbano et al.

5. Figure(s)
[Click here to download 5. Figure\(s\): Figure 3.ppt](#)

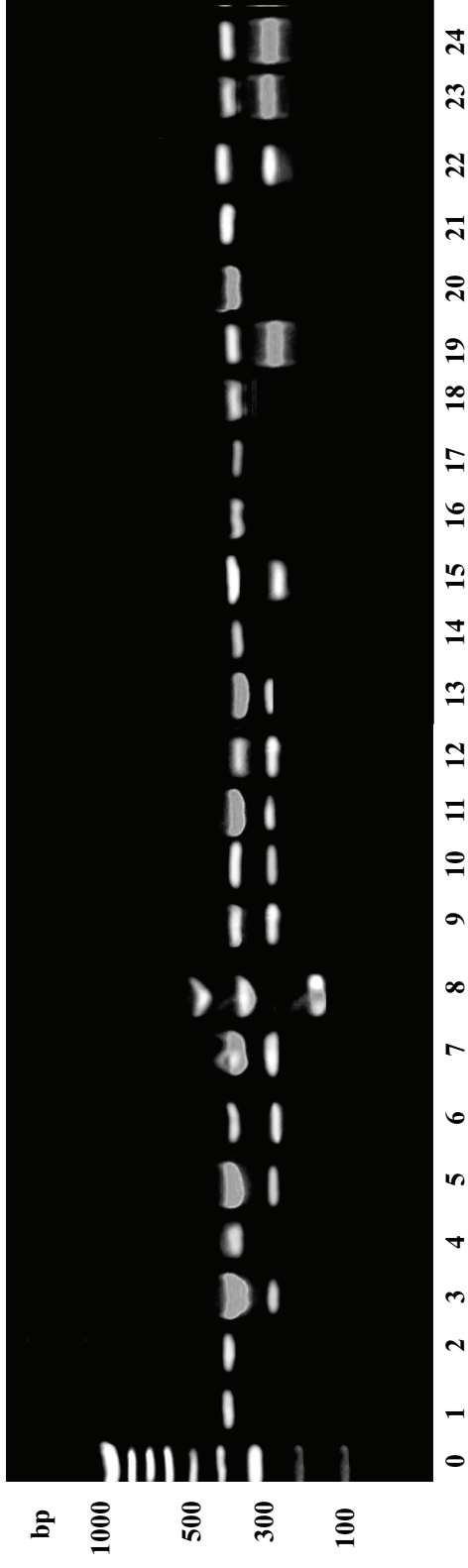


Figure 3. Urbano et al.

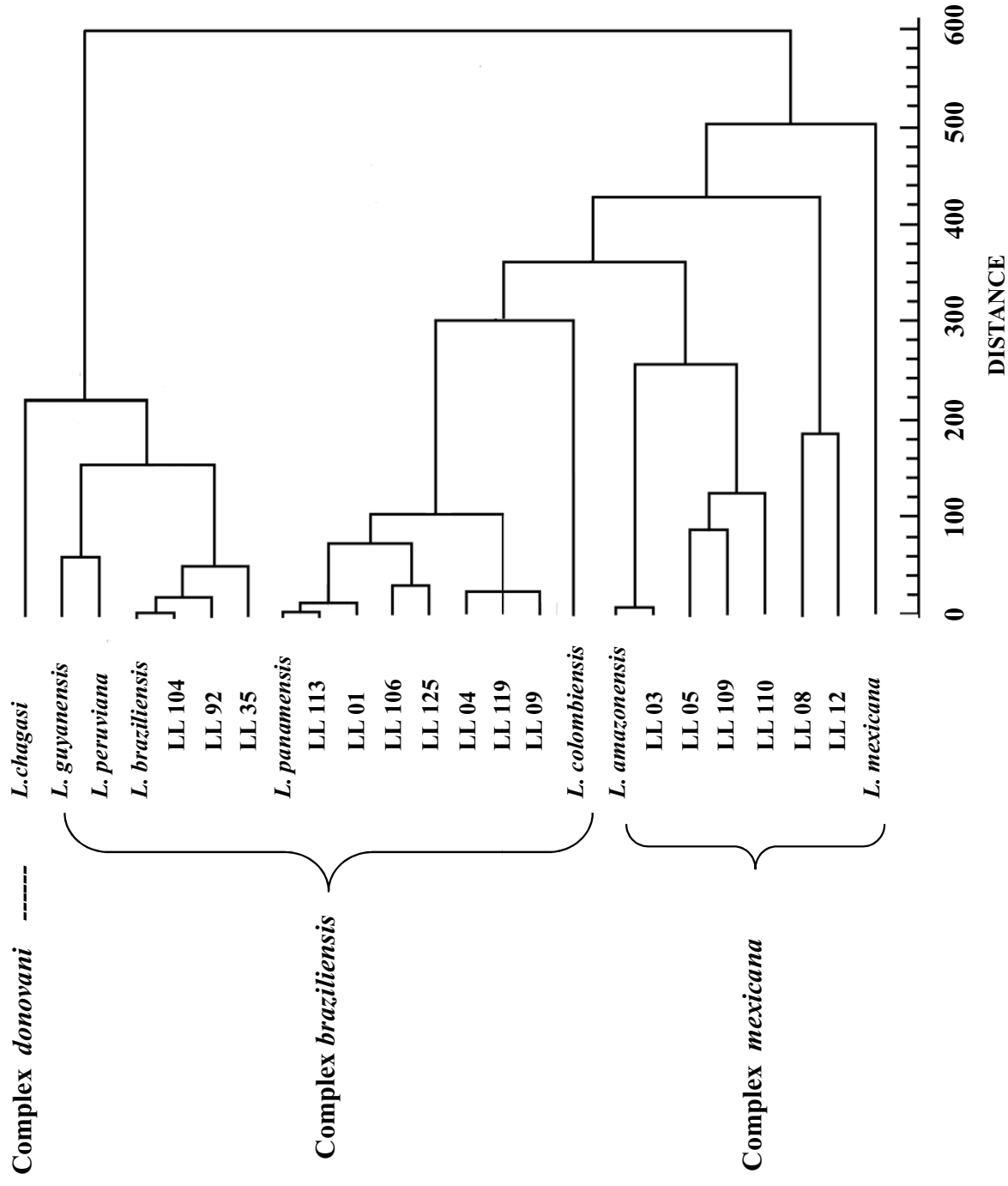


Figure 4. Urbano et al.

Elsevier Editorial System(tm) for Parasitology International
Manuscript Draft

Manuscript Number: PARINT-D-09-00173

Title: Characterization of Leishmaniasis aetiological agents in Peru

Article Type: Research Paper

Keywords: Leishmaniasis, Peru; isoenzymatic characterization, kDNA analysis by restriction enzymes, PCR.

Corresponding Author: Dr. Clotilde Marín, Ph.D.

Corresponding Author's Institution:

First Author: Jesus Urbano

Order of Authors: Jesus Urbano; Gloria Minaya; Manuel Sánchez-Moreno; Ramon Guitierrez-Sánchez; Clotilde Marín, Ph.D.

Abstract: The National Health Institute of Lima, ever since its foundation, attends patients from all the departments of the country, with different clinical forms of leishmaniasis. The clinical characteristics of Leishmaniasis in Peru present differences according to the geographical region where the disease appears, being predominantly cutaneous in the Andes and coastal regions, and cutaneous-mucosa in the Amazon jungle, although also in both regions the two clinical forms can appear. A total of 35 new aetiological agents have been isolated, which in this work have been characterized both phenotypically (isoenzymatic analysis) as well as genotypically (kDNA studies by means of restriction enzymes and PCR). These isolates were compared with 8 reference stocks and typified as: *L. braziliensis*, *L. guyanensis*, *L. panamensis*, *L. mexicana*, *L. amazonensis*, *L. colombiense*, *L. peruviana*, and *L. chagasi*. Our results and the statistical study gave six clusters. The main species that are currently found circulating in Peru are *L. peruviana*, which is located

mainly in the Andes valleys and in Pacific coastal zones, *L. braziliensis*, which is located in the Peruvian Amazon, together with *L. guyanensis* and with lesser prevalence *L. amazonensis*. This is the first time that the presence of *L. colombiense* has been detected in the departments of the north of the country, bordering Ecuador, where its presence may be due to human migratory movements.

Characterization of Leishmaniasis aetiological agents in Peru

Jesus Urbano,¹ Gloria Minaya,² Manuel Sánchez-Moreno,¹ Ramon Guitierrez-Sánchez,³
and Clotilde Marín,^{1*}

¹Department of Parasitology. University of Granada, Severo Ochoa s/n, E-18071 Granada (Spain).

² Laboratorio de Leishmaniosis y Chagas, Instituto Nacional de Salud, Lima. Peru

⁵ Department of Statistics, University of Granada, Severo Ochoa s/n, E-18071 Granada (Spain).

Running title: *Leishmania* spp. in Peru

* for correspondence: Clotilde Marín Sánchez, Department of Parasitology. University of Granada, Severo Ochoa s/n, E-18071 Granada (Spain). Tel.: +34 958 242369; fax: +34 958 243174. *E-mail address:* cmaris@ugr.es.

ABSTRACT

The National Health Institute of Lima, ever since its foundation, attends patients from all the departments of the country, with different clinical forms of leishmaniasis. The clinical characteristics of *Leishmaniasis* in Peru present differences according to the geographical region where the disease appears, being predominantly cutaneous in the Andes and coastal regions, and cutaneous-mucosa in the Amazon jungle, although also in both regions the two clinical forms can appear. A total of 35 new aetiological agents have been isolated, which in this work have been characterized both phenotypically (isoenzymatic analysis) as well as genotypically (kDNA studies by means of restriction enzymes and PCR). These isolates were compared with 8 reference stocks and typified as: *L. braziliensis*, *L. guyanensis*, *L. panamensis*, *L. mexicana*, *L. amazonensis*, *L. colombiensis*, *L. peruviana*, and *L. chagasi*. Our results and the statistical study gave six clusters. The main species that are currently found circulating in Peru are *L. peruviana*, which is located mainly in the Andes valleys and in Pacific coastal zones, *L. braziliensis*, which is located in the Peruvian Amazon, together with *L. guyanensis* and with lesser prevalence *L. amazonensis*. This is the first time that the presence of *L. colombiensis* has been detected in the departments of the north of the country, bordering Ecuador, where its presence may be due to human migratory movements.

Keywords: Leishmaniasis, Peru; isoenzymatic characterization, kDNA analysis by restriction enzymes, PCR.

I. Introduction

Leishmaniasis is a group of zoonotic parasite diseases caused by different protozoan haemoflagellates of the genus *Leishmania*. The disease is transmitted by the bite of small insect commonly called phlebotomine sand flies from the order Diptera, subfamily Phlebotominae, belonging to the genera *Phlebotomus* of the Old World and *Lutzomyia* of the New World. The potential reservoirs of the disease are many different orders of mammals: rodents, canids, edentates, marsupials, procyonids, primitive ungulates, and primates, whereas humans are considered to be accidental hosts.

These diseases are characterized by lesions on the skin, in the mucosas, and in the viscera, depending on the species of *Leishmania* and the immune response of the host. These are chronic diseases of low pathogenicity and relatively low morbidity [1].

In Peru, leishmaniasis is an endemic disease found in 12 departments and constitutes the second most important tropical disease and the third cause of morbidity by transmissible disease after malaria and tuberculosis [2]. This endemic disease affects roughly 74% of the total area of the country, both in the mountainous areas as well as in the jungle. There are two clinical forms of leishmaniasis, cutaneous and the mucocutaneous. Cutaneous leishmaniasis extends throughout the Andes and the Andes valleys between 600 to 3000 m a.s.l., and mucocutaneous leishmaniasis in the high and low jungle zones below 2000 m [2]. In 2005, a total of 7,127 cases were reported, 95.3% of which were cutaneous, and 4.7% of which were mucocutaneous; 70% of the reported cases originated in Amazonas, Madre de Dios, Cajamarca, and Cusco [3]. Leishmaniasis en Peru causes a negative social and economic impact in the population, which stunts development. Furthermore, destructive, irreversible after-effects in the mucocutaneous type provokes the isolation of the individual.

The classification of the species of *Leishmania* has been one of the most complex aspects in studying the aetiology of this parasitosis, due to the phenotypic diversity and genetic polymorphism found among the species of the parasite [4]. The epidemiological complexity increases in some endemic areas by the overlap in the distribution of the parasites, and therefore in the transmission cycles of the different species. The dispersion of *Leishmania* beyond its traditional ecological distribution area is closely related with the movement of human populations, and therefore it is currently considered an emerging or re-emerging disease [5,6]. The identification of the causal agent of leishmaniasis is of vital importance in clinical and epidemiological studies in order to provide a correct prognosis, to select the appropriate treatment, and to implement effective prevention and control measures. The first classifications of *Leishmania* species were based on different ecobiological criteria (vectors, geographic distribution, tropism, antigenic properties, clinical manifestations, reservoir species, behaviour in hamsters and in culture) [1]. However, biochemical and molecular analyses later showed that pathological and geographical criteria were often inadequate [7] and thus other criteria—such as the polymorphism patterns exhibited by kinetoplastic DNA (kDNA) markers, proteins, or antigens based on the intrinsic characteristics of these parasites—came to be used to classify *Leishmania*, as in the case of isoenzyme analysis, and analysis of kDNA restriction fragment-length polymorphism using different restriction endonucleases and PCR assay [8].

In this study, we characterized 35 new stocks, all isolated in humans from different regions of Peru, by the National Health Institute of Lima. The characterization was made by isoenzyme analysis, restriction kDNA analysis using different restriction endonucleases, and single-step multiplex PCR assay.

2. Materials and methods

2.1. Parasite isolation and *in vitro* culture

The 35 stocks were isolated from patients treated by personal of National Health Institute of Lima (Peru). All the patients had a confirmed diagnosis of cutaneous leishmaniasis, and their clinical histories were reviewed to gather information related to the clinical form: probable site of infection, plus the patient's age, sex, and origin (Table 1).

The sample was taken by aspiration of the edge of the cutaneous lesions characterized by multiple ulcerated plaques with violet edges of different sizes and with at various locations of the patient's anatomy. The sample was placed in Seneckjie medium, incubated at 27°C, and monitored for 5 weeks. The parasites isolated were cultivated in Schneider *Drosophila* medium (Sigma Chemical Co.) supplemented to 10% with inactivated foetal bovine serum. Once in the logarithmic growth phase, these isolates were sent to our laboratory from the National Health Institute of Lima and were cultured *in vitro* in MTL medium plus 10% inactivated foetal bovine serum kept in an air atmosphere at 27°C[6]. For reference stocks, we used *L. peruviana* (MHOM/PE/1984/LC26), *L. guyanensis* (MHO/BR/75/M4147), *L. colombiensis* (IHAR/CO/85/CL500), *L. brazilensis* (MHOM/BR/1975/M2903), *L. panamensis* (MHOM/PA/71/LS94), *L. mexicana* (MHOM/BZ/82/BEL21), *L. amazonensis* (MHOM/BR/73/PH8), and *L. chagasi* (MHOM/BR/74/PP75). The reference stocks have been maintained in our laboratory by successive passes in cultures of NNN medium modified with a liquid phase of minimal essential medium (MEM) plus 10% inactivated foetal bovine serum kept in an air atmosphere at 27°C.

2.2. Isoenzyme characterization

Crude homogenates were obtained from 300mL of culture medium containing 2×10^7 cells.mL⁻¹. Cells were harvested by centrifugation at 600 x g 10 min, washed twice in a phosphate-buffered saline (pH 7.4), and resuspended in a hypotonic enzyme stabilizer solution containing 2mM dithiothreitol, 2mME-aminocaproic acid, and 2mM EDTA [9]. The samples were frozen at -80 °C for 15 min and thawed at 25 °C. After several freezing–thawing cycles, cell lysates were centrifuged at 8000 x g 20 min at 4 °C, and the supernatants were stored in liquid nitrogen until use. The protein concentration was determined using the Bradford method and stored at a final concentration of 1mg.mL⁻¹ of protein.

The enzymes were separated by isoelectric focusing in a PhastSystem apparatus, using Phast-gel IEF 3-9 (Pharmacia, Freiburg, Germany).

The following enzymes were tested: malic enzyme (EM), glucose 6-phosphate dehydrogenase (G6PDH), 6-phosphate gluconate dehydrogenase (6PGDH), isocitrate dehydrogenase (IDH), malate dehydrogenase (MDH), glucosa phosphate isomerase (GPI), and superoxide dismutase (SOD). The staining procedures are described in [9].

2.3. kDNA isolation

Promastigotes were collected by centrifugation of 300mL of culture medium, when their concentrations had reached about 2×10^7 cells.mL⁻¹, after about 5 days. They were washed twice in 50mL of 0.15M NaCl, 0.015M sodium citrate, and once with SE buffer (0.15M NaCl, 0.1M EDTA, pH 8.0). Meanwhile, kDNA was obtained according to the procedure described by Gonçalves [10].

2.4. Restriction-enzyme digestion and electrophoresis analysis

The kDNA extracts (3 mg.mL⁻¹) were completely digested with restriction endonucleases (Hae III, BamH I, Hinf I, EcoR I and Msp I) according to the manufacturer's prescribed buffer conditions (Boehringer-Ingelheim, Barcelona, Spain). The digestion products were electrophoresed in 1.3% agarose slab gels as described elsewhere [11] and the fragment sizes were estimated by comparing their mobilities with those of a 100-bp DNA ladder (Gibco- BRL, Gaithersburg). The gels were stained with ethidium bromide (10 mg.mL⁻¹ for 10 min) and photographed under UV light with a Polaroid camera (665 film).

2.4. PCR procedure

The PCR was performed on lysed cultures in a 25 µL reaction mixture consisting of 2.5 µL 10X buffer (Promega), 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM of each nucleotide, 1 µL of each primer, 1.25 units of Taq polymerase (Promega), and 1 µL of lysed culture.

The primer design was based on a published sequence from the *L. maior* kDNA minicircle. Primer Uni21 was designed on a sequence within the conserved region (5' GGG GTT GGT GTA AAA TAG GCC 3'). The Lmj4 primer design was based on the variable region of the same *L. maior* strain (5' CTAGTTTCC CGC CTCCGAG 3') [12].

Cycling was performed in a thermocycler (Minicycle®, BioRad). After a preheating step of 5 min at 94°C, 36 cycles of denaturation (1 min at 94°C, annealing (1 min at 54°C) and elongation (15 min at 72°C) followed with, finally, an extension step of 10 min at 72°C. Then, the PCR products were loaded on a 1.3% agarose gel containing

ethidium bromide and visualized with ultraviolet light. DNA samples (20 ng) from the WHO reference strains were used as positive controls.

2.5. Statistical study

The statistical methods were based on individual hierarchical cluster analysis, selecting the Euclidean distance to the square as the basis for measuring the associations between individuals. The Euclidean distance was calculated by the following grouping procedures of simple linkage (Rk 0.7355), average linkage among groups (Rk 0.7518), average linkage (Rk 0.7726), centroid method (Rk 0.7586), median method (Rk 0.7204), and the Ward method (Rk 0.7570). The cophenetic coefficient (Rk) measures the degree of distortion between relationships, means in terms of original distances between individuals and those existing at the end of the analysis. The one with the highest cophenetic correlation was chosen as the optimal method. In the selection procedures, the average linkage between groups was considered using the coefficient Rk of Rand, which is an index of the similarity between classifications. This analysis was made with the STATGRAPHICS program, version 5.0.

3. Results

A total of 35 new stocks of *Leishmania* species were isolated from patients in different departments of Peru. The new isolates were cloned and cultivated in MTL medium plus 10% IFBS. Cell densities reached on the order of 2×10^7 cell.ml⁻¹. These 35 stocks, together with 8 reference stocks (*L. peruviana*, *L. guyanensis*, *L. colombiense*, *L. braziliense*, *L. panamensis*, *L. mexicana*, *L. amazonensis*, and *L.*

chagasi) were analysed by isoenzymatic profiles using 7 different enzyme systems (EM, G6PDH, IDH, 6GPDH, MDH, GPI, and SOD). Some of the enzymatic systems studied revealed significant differences between reference stocks in the number of bands and the isoelectric points, presenting a distinct isoenzymatic profile (Fig.1). Malic enzyme differentiated the stocks *L. peruviana*, *L. braziliensis*, *L. mexicana*, *L. amazonensis* and *L. chagasi* from each other as well as from the rest of the reference stocks (Fig.1A, lines 1, 4, 6, 7, and 8). Of the 35 new stocks, the isolates LP20, LP28, LP30, LP31, LP35, LP42, LP45, LP50, and LP51 (Fig.1A, lines 9, 16, 18, 19, 22, 29, 32, 39, and 43) presented an isoenzymatic profile similar to that of *L. peruviana*. The isolates LP21, LP25, LP37, LP43, and LP47 had a profile similar to that of *L. braziliensis* (Fig.1A, lines 10, 14, 24, 30, 34). Only the isolates LP 32, LP39, LP43 and LP52 did not have an electrophoretic pattern that resembled that of any of the other reference stocks (Fig.1A, lines 19, 25, 30 and 37). The enzyme G6PDH clearly differentiated *L. colombiensis*, *L. mexicana*, and *L. chagasi* from the rest. The profiles presented by *L. peruviana* and *L. braziliensis* for this enzyme were very similar (Fig.1B, lines 1 and 4), and this pattern was shared by most of the isolates studied. The enzyme IDH differentiated *L. peruviana* (Fig.1C, line 1) from the rest of the reference stocks and identified the isolates LP20, LP23, LP25, LP28, LP30, LP33, LP39, LP48, LP50, LP 54, and LP55 (Fig.1C, lines: 9, 12, 14, 16, 18, 21, 26, 35, 36, 40 and 41), as similar to *L. peruviana*. The enzyme 6PGDH gave no useful information for identification (Fig.1D). The MDH enabled the clear differentiation of *L. braziliensis*, *L. panamensis*, and *L. mexicana* from each other as well as from the rest of the reference stocks. Isolates LP48, LP 52 and LP54 presented a pattern of bands that did not correspond to any of the reference stocks (Fig. 1E, lines 35, 37 and 40), while the other isolates presented an isoenzymatic profile that resembled that of different reference stocks. The

enzyme GPI differentiated *L. guyanensis* and *L. amazonensis* from each other and from the rest of the reference stocks (Fig.1F, lines: 2 and 7). The isolates LP35 and LP53 presented a single band that did not coincide with any of the reference stocks (Fig.1F, lines 22 and 39) while for the rest of the isolates the profiles resembled primarily the reference stocks. For example, the isolate LP26 presented a profile unique (Fig.1F, line 15). The enzyme SOD gave isoenzymatic profiles that enabled the clear differentiation, on the one hand, of *L. peruviana* from *L. guyanensis* and, on the other hand, *L. colombiensis* from *L. braziliensis* (Fig.1G, lines:1, 2, 3, and 4), whereas the rest of the stocks analysed resembled the reference stock, except for isolates LP20, LP33, and LP37, the profile of which did not resemble any of the reference stocks (Fig.1G, lines 9, 21, and 25).

The kDNA of the 35 isolates and the eight reference strains were purified and then digested with five restriction endonucleases (Msp I, BamH I, Hinf I, Hae III, and EcoR I). The kDNA restriction products were electrophoresed in 1.3 % agarose gel (Fig. 2). All the DNA endonucleases assayed were capable of digesting the different kDNA in different-sized fragments. The heterogeneous restriction profiles in all the DNAs studied were noteworthy. *L. peruviana* presented a restriction pattern which differed from that of the other reference stocks used in this study with the enzyme EcoR I (Fig. 2E, line, 1). *L. guyanensis* was differentiated by the endonuclease Hae III (Fig. 2D, line 2), while *L. colombiensis* was distinguished from the rest of the reference stocks with the enzymes Hinf I, Hae III, and EcoR I (Fig. 2C, D, and E, line 3). The enzyme Hinf I enabled us to differentiate *L. braziliensis* from the others (Fig.2C, line 4). *L. mexicana* was identified by the restriction pattern presented with the endonucleases BamH I, Hae III, and EcoRI (Fig.2B,D, and E, line 6). The stocks *L. panamensis* and *L. amazonensis* were not differentiated with any of the endonucleases assayed (Fig. 2, lines 5 and 7).

The 35 isolates presented 5 restriction patterns when their kDNA was submitted to the endonuclease Msp I; the isolates LP 21, LP 25, LP26, LP29, LP33, and LP48, showed completely different restriction patterns from those presented by the reference stocks (Fig. 2A, lines 10, 14,15, 17, 21, and 35). The kDNA of the isolates LP29 to LP32, LP36, LP38 to LP41, together with the isolates LP45 to LP48 and LP51 to LP53, when subjected to the action of the endonuclease BamH I, provided only one restriction fragment that did not correspond to any of those found for the reference stocks (Fig. 2B, lines 17 to 20, 23, 25 to 28, 32 to 35, and 37 to 39). The endonuclease Hinf I gave a very uniform restriction profile for most of the isolates and similar to the reference stocks *L. peruviana*, *L. braziliensis*, *L. panamensis*, and *L. amazonensis*, (Fig. 2C), and only isolates LP 20, LP21, LP25, LP26, LP30, LP31, LP51, and LP52 presented a restriction pattern that did not correspond to any of the reference strains (Fig.2C, lines 9, 10, 14, 15, 18, 19, 37, and 38). All the isolates presented different restriction fragments with the endonuclease Hae III and that corresponded with the reference stocks (Fig. 2D), and the same occurred with the endonuclease EcoR I; only the isolates LP 29 and LP37 presented a single fragment that did not coincide with those of the reference stocks (Fig. 2E, lines 17, and 24).

Figure 3 presents the result corresponding to the amplification of the kDNA by PCR assay of the 35 new isolates and the eight references strains, characterized previously by isoenzyme analysis and by restriction enzymes. An amplification band of approximately 370 bp was visible in the all stocks. In the case of *L. colombiensis*, *L. panamensis*, *L. mexicana*, and *L. amazonensis* a second band of 260-270 bp was visible, as happened with the isolates LP37 LP43 and LP53 (Fig.3, lanes 24, 30 and 39). *L. chagasi* and LP47 presented 3 amplified bands of approximately 150, 360, and 450 bp (Fig.3, lane 8 and 34).

4. Discussion

In Peru, leishmaniasis constitutes the second endemic tropical disease and the third cause of morbidity by transmissible disease after malaria and tuberculosis [13]. In recent years, reports of cases of leishmaniasis have increased considerably due to more frequent transmission of this parasitosis. The spread of the disease is attributed primarily to factors such as the greater human activity in jungle environments, where the enzootic transmission occurs; and to the changes in the transmission settings, which now include the dwelling, the surroundings of the dwelling, and suburban zones [14]. Today, roughly 74% of the total area of the country is considered endemic for this disease, i.e. some 95,1820 Km², extending through the Andes and the Andes valleys for cutaneous leishmaniasis, and dense as well as open jungle zones for mucocutaneous leishmaniasis [15].

For the design of prevention and control measures of the disease, it is fundamental to achieve correct identification of the parasite species responsible for the disease [16]. Therefore, for more than 20 years, effort has been made to determine the geographic distribution of the *Leishmania* species in Peru. The National Health Institute of Lima, ever since its foundation, attends patients from all the departments of the country, with different clinical forms of leishmaniasis. A total of 35 new aetiological agents have been isolated, which in this work have been characterized both phenotypically (isoenzymatic analysis) as well as genotypically (kDNA studies by means of restriction enzymes and PCR). It is known that one technique by itself makes it very difficult to identify an isolate with exactitude, and therefore, we have made an analysis with the results from the three analytical techniques used (Fig.4), grouping the isolates into 6 broad clusters. **Cluster 1** includes *L. peruviana* and the stocks LP20, LP23, LP25 and

LP33, all isolated in the Andes valleys of the departments of Junin and Huanuco, together with the stocks LP47 and LP56, isolated in the Andes zone of the department of Amazonas and in the coastal zone of the department of Ancash, respectively. **Cluster 2** is formed by 13 stocks, all isolated in different departments of the Andes zone and of the coastal zone (Fig.4). Its phylogenetic proximity with **cluster 1** indicates that they should be considered as belonging to *L. peruviana*. **Cluster 3** is comprised of *L. braziliensis* and the stocks LP50, LP51, LP52, and LP55, isolated from the Peruvian Amazon of the department of Madre de Dios, and the stocks LP24 and LP57 isolates also in the Amazon region of the department of San Martin. Within the cluster, a subcluster can be distinguished, which includes *L. colombiensis* and stocks LP28, LP30, and LP38, these stocks having been isolated from the department of Piura, situated to the north of the country on the border with Ecuador. This geographic origin would explain the presence of *L. colombiensis* in Peru. This gives rise to the hypothesis that these isolates must have been introduced into Peru from Colombia through Ecuador, as a consequence of migratory movements of people [17, 18]. The fourth **cluster** includes *L. guyanensis* and the stocks LP37, LP43, LP48, and LP53, isolates of the Amazon zone of the departments of San Martin, Huanuco, and Madre de Dios. **Cluster 5** is divided into two subclusters: subcluster 5.1, with *L. panamensis* and the stock LP41 isolated from the Amazon zone of the department of Cuzco, and subcluster 5.2, containing *L. amazonensis* and its phylogenetically closest stocks LP21 and LP22, isolated on the border of the departments of Junin and Pasco with the Amazon department of Ucayali. **Cluster 6** contains *L. mexicana*, with no reported case in Peru.

In conclusion, protozoans of the genus *Leishmania* present a wide variety of species which have biochemical and molecular characteristics that allow them to be characterized phenotypically and genotypically. The current availability of multiple

techniques that are becoming steadily more specific and sensitive, thanks to the level of knowledge of the molecular biology of the parasite, together with their use in combination, enable the correct interpretation of the changes in the behaviour of the parasite (geographic distribution and clinical appearance of the disease), as well as a correct diagnosis, appropriate selection of treatment, and control and prevention measures. The clinical characteristics of *Leishmaniasis* in Peru present differences according to the geographical region where the disease appears, being predominantly cutaneous in the Andes and coastal regions, and cutaneous-mucosa in the Amazon jungle, although also in both regions the two clinical forms can appear [19]. The main species that are currently found circulating in Peru are *L. peruviana*, which is located mainly in the Andes valleys and in Pacific coastal zones (Fig. 5), *L. braziliensis*, which is located in the Peruvian Amazon, together with *L. guyanensis* and with lesser prevalence *L. amazonensis*. This is the first time that the presence of *L. colombiense* has been detected in the departments of the north of the country, bordering Ecuador, where its presence may be due to human migratory movements.

Acknowledgments

This work was supported by grants from the Projects CGL-2006-27889-E and CGL-2008-03687-E of the Ministry Science and Technology (MEC-Spain).

References

- [1] Ministerio de Salud. Oficina General de Epidemiología. Módulos Técnicos. Serie de Monografías. Leishmaniasis. Lima, Peru. 2000: 08-83.
- [2] Lucas C, Franke A, Cachay M, Tejada A, Cruz ME, Kreutzer RD, Barker DC, McCann SH, Watts DM. Geographic distribution and clinical description of leishmaniasis cases in Peru. *Am J Trop Med Hyg* 1998; 59:312-317.
- [3] Pan American Health Organization. Health in the Americas, 2007. vol II–Countries.

- [4] Sánchez-Saldaña L, Saenz-Anduaga E, Pancorbo J, Zegarra R, Cagarces N, Regis A. Leishmaniasis. *Dermatol Peru* 2004;14: 82-98.
- [5] Ashford R.W. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. *Int J Parasitol* 2000;3:1269-1281.
- [6] Desjeux P. The increase risk factors for leishmaniasis worldwide. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg* 2001; 95: 239-243.
- [7] Vidyashankar C, Noel GJ. Leishmaniasis. *Med J* 2002;3:1-194.
- [8] Rodríguez-González I, Marín C, Longoni SS, Mateo H, Alunda JM, Minaya G, Gutiérrez-Sánchez R, Vargas F, Sánchez-Moreno M. Identification of New World *Leishmania* species from Peru by biochemical techniques and multiplex PCR assay. *FEMS Microbiol Lett.* 2007;267:9-16.
- [9] Fernandez-Ramos C, Luque F, Fernandez-Becerra C, Osuna A, Jankevicius SI, Jankevicius V, Rosales MJ, Sánchez-Moreno M. Biochemical characterisation of flagellates isolated from fruits and seeds from Brazil. *FEMS Microbiol Lett* 1999;170: 343-348.
- [10] Gonçalves AM, Nehme NS, Morel CM. Trypanosomatid characterization by schizodeme analysis. In: Morel, C.M. (ed). *Genes and antigens of parasites (A laboratory manual)* 2nd. Edn. Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil. 1984.
- [11] Riou G, Yot. Heterogeneity of the kinetoplast DNA molecules of *Trypanosoma cruzi*. *Biochem.* 1977; 16: 2390–2396.
- [12] Anders, G., Eisenberger, C. L., Jonas, F. and Greenblatt, C. L.; 2002. Distinguishing *Leishmania tropica* and *Leishmania major* in the Middle East using the polymerase chain reaction with kinetoplast DNA-specific primers. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 96, 87-92.
- [13] Ministerio de Salud del Perú. Dirección General de Salud de las Personas. Dirección del Programa de Control de Enfermedades Transmisibles–Control de Malaria y OEM. *Doctrina, Normas y Procedimientos para el control de las Leishmaniasis en el Perú.* Perú. 1995.
- [14] Instituto Nacional de Salud. Leishmaniasis. *Biomédica* 26. 2006.
- [15] Lucas C, Franke A, Cachay M, Tejada A, Cruz M, Kreutzer R, Barker D, McCann S, Watts D. Geographic distribution and clinical description of leishmaniasis cases in Peru. *Am J Trop Med Hyg.* 1998; 59: 312-317.
- [16] Sierra D, Ochoa M, Calle JI, García G, Colorado D, Vélez ID. *Leishmania (L) mexicana* in the village of San Matias, municipality of Gomez Plata, North West of Antioquia, Colombia. *Biomedica.* 2006; 26:232-235.
- [17] Desjeux P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 2004;27:305-318;
- [18] Cabrera R. Leishmaniasis. *Bol Epidemiol (Lima).* 16(52), 2007:720-2.
- [19] Zuño Burstein AI, Guillén A. Leishmaniasis cutánea y mucocutánea en el Perú. *Rev Peru Med Exp Salud Publica* 2002; 19: 215-219.

Legends

Fig. 1. Isoenzyme profiles of *Leishmania* isolates. Organisms: (1) *L. peruviana* (2); *L. guyanensis*; (3) *L. colombiensis*; (4) *L. braziliensis*; (5) *L. panamensis*; (6) *L. mexicana*; (7) *L. amazonensis*; (8) *L. chagasi*; (9) isolate LP20; (10) isolate LP21; (11) isolate LP22; (12) isolate LP23; (13) isolate LP24; (14) isolate LP25; (15) isolate LP26; (16) isolate LP28; (17) isolate LP29; (18) isolate LP30; (19) isolate LP31; (20) isolate LP32; (21) isolate LP33; (22) isolate LP35; (23) isolate LP36; (24) isolate LP37; (25) isolate LP38; (26) isolate LP39; (27) isolate LP40; (28) isolate LP41; (29) isolate LP42; (30) isolate LP43; (31) isolate LP44; (32) isolate LP45; (33) isolate LP46; (34) isolate LP47; (35) isolate LP48; (36) isolate LP50; (37) isolate LP51; (38) isolate LP52; (39) isolate LP53; (40) isolate LP54; (41) isolate LP55; (42) isolate LP56 and (43) isolate LP57. Enzymes: (A) malic enzyme (ME); (B) glucose 6-phosphate dehydrogenase (G6PDH); (C) isocitrate dehydrogenase (IDH); (D) 6-phosphate gluconate dehydrogenase (6PGDH); (E) malate dehydrogenase (MDH); (F) glucose phosphate isomerase (GPI); (G) superoxide dismutase (SOD).

Fig. 2. Restriction endonuclease analysis of kDNA of *Leishmania* isolates. (A) kDNAs + MspI; (B) kDNAs+ BamHI; (C) kDNAs+ HinfI; (D) kDNAs+HaeIII and (E) kDNAs+EcoRI. Organisms: (1) *L. peruviana* (2); *L. guyanensis*; (3) *L. colombiensis*; (4) *L. braziliensis*; (5) *L. panamensis*; (6) *L. mexicana*; (7) *L. amazonensis*; (8) *L. chagasi*; (9) isolate LP20; (10) isolate LP21; (11) isolate LP22; (12) isolate LP23; (13) isolate LP24; (14) isolate LP25; (15) isolate LP26; (16) isolate LP28; (17) isolate LP29; (18) isolate LP30; (19) isolate LP31; (20) isolate LP32; (21) isolate LP33; (22) isolate LP35; (23) isolate LP36; (24) isolate LP37; (25) isolate LP38; (26) isolate LP39; (27) isolate LP40; (28) isolate LP41; (29) isolate LP42; (30) isolate LP43; (31) isolate LP44; (32) isolate LP45; (33) isolate LP46; (34) isolate LP47; (35) isolate LP48; (36) isolate LP50; (37) isolate LP51; (38) isolate LP52; (39) isolate LP53; (40) isolate LP54; (41) isolate LP55; (42) isolate LP56 and (43) isolate LP57. Size markers are 1 Kb DNA ladder fragments (Lane M).

Fig. 3. Amplification products of the PCR multiplex assay from different *Leishmania* species and isolates using the primers Uni21 and Lmj4. In each lane 10 μ L of sample

was placed. Lane : (1) *L. peruviana* (2); *L. guyanensis*; (3) *L. colombiensis*; (4) *L. braziliensis*; (5) *L. panamensis*; (6) *L. mexicana*; (7) *L. amazonensis*; (8) *L. chagasi*; (9) isolate LP20; (10) isolate LP21; (11) isolate LP22; (12) isolate LP23; (13) isolate LP24; (14) isolate LP25; (15) isolate LP26; (16) isolate LP28; (17) isolate LP29; (18) isolate LP30; (19) isolate LP31; (20) isolate LP32; (21) isolate LP33; (22) isolate LP35; (23) isolate LP36; (24) isolate LP37; (25) isolate LP38; (26) isolate LP39; (27) isolate LP40; (28) isolate LP41; (29) isolate LP42; (30) isolate LP43; (31) isolate LP44; (32) isolate LP45; (33) isolate LP46; (34) isolate LP47; (35) isolate LP48; (36) isolate LP50; (37) isolate LP51; (38) isolate LP52; (39) isolate LP53; (40) isolate LP54; (41) isolate LP55; (42) isolate LP56 and (43) isolate LP57. Lane M, 100-bp DNA ladder; the lower band shown is 100 bp.

Fig. 4. Dendrogram based on individual hierarchical cluster analysis (Program Stat-Graphics version 5.0).

Fig. 5. Distribution map of the new isolates from *Leishmania* species. (1) Dept. Piura; (2) Dept. Amazonas; Dept San Martin; (4) Dept. Ancash; (5) Dept. Huanuco; (6) Dept. Pasco; (7) Dept. Junin; (8) Dept. Lima; (9) Dept. Ayacucho; (10) Dept. Cuzco; (11) Dept. Madre de Dios. ♠ *L. peruviana*, ♣ *L. braziliensis*, ♥ *L. colombiensis*, ▲ *L. guyanensis*, ◆ *L. panamensis*, ● *L. amazonensis*. * (*n*^o of isolates).

Table 1. Data referring to the isolates from *Leishmania* species in patients at the National Health Institute of Lima, Peru (Instituto Nacional de Salud de Lima) 2000-2005.

Laboratory Code	Clinic manifestation	Patients data		
		Sex	Age	Origin
LP20	cutaneous-mucous	M	26	Huanaco
LP21	cutaneous-mucous	F	10	Pasco
LP22	cutaneous-mucous	F	13	Junin
LP23	cutaneous-mucous	M	24	Junin
LP24	cutaneous-mucous	M	22	San Martin
LP25	cutaneous-mucous	M	53	Junin
LP26	Andean cutaneous	M	25	Cuzco
LP28	cutaneous-mucous	M	62	Piura
LP29	Andean cutaneous	M	40	Piura
LP30	cutaneous-mucous	F	50	Piura
LP31	cutaneous	M	38	Cuzco
LP32	cutaneous-mucous	F	17	Junin
LP33	Andean cutaneous	F	33	Amazonas
LP35	Andean cutaneous	F	69	Amazonas
LP36	Andean cutaneous	F	13	Junin
LP37	cutaneous-mucous	M	6	Huanuco
LP38	cutaneous-mucous	M	62	Piura
LP39	Andean cutaneous	F	64	Lima
LP40	Andean cutaneous	F	72	Ayacucho
LP41	cutaneous-mucous	M	22	Cuzco
LP42	Andean cutaneous	M	19	Ayacucho
LP43	cutaneous-mucous	M	23	San Martin
LP44	cutaneous-mucous	F	49	Junin
LP45	Andean cutaneous	M	12	Lima
LP46	cutaneous-mucous	M	21	Huanuco
LP47	Andean cutaneous	F	32	Ancash
LP48	cutaneous-mucous	M	40	Madre de Dios
LP50	cutaneous-mucous	M	23	Madre de Dios
LP51	cutaneous-mucous	M	47	Madre de Dios
LP52	cutaneous-mucous	M	20	Madre de Dios
LP53	cutaneous-mucous	M	18	Madre de Dios
LP54	Andean cutaneous	F	55	Ancash
LP55	cutaneous-mucous	F	38	Madre de Dios
LP56	Andean cutaneous	M	29	Piura
LP57	cutaneous-mucous	M	31	San Martin

Figure 1

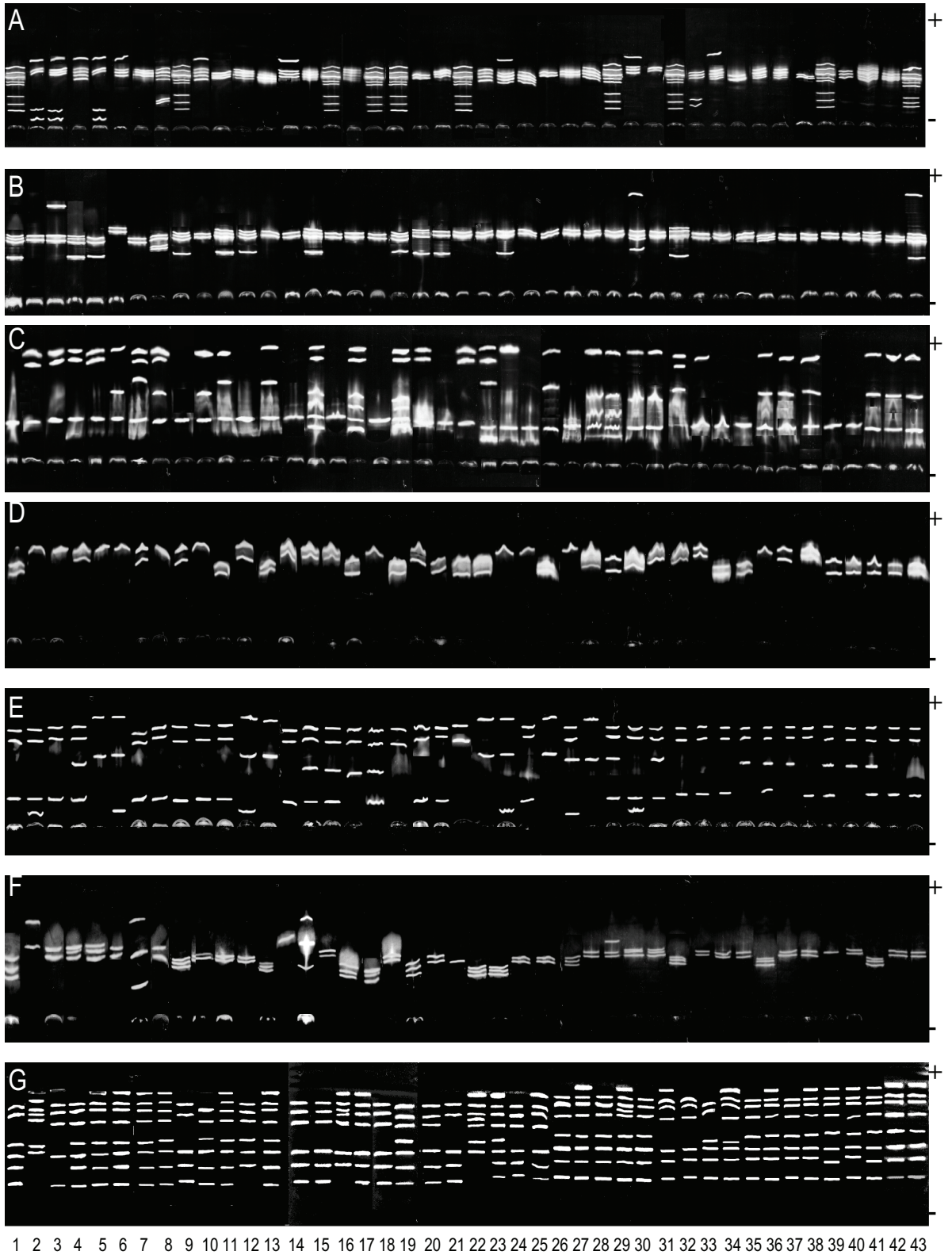
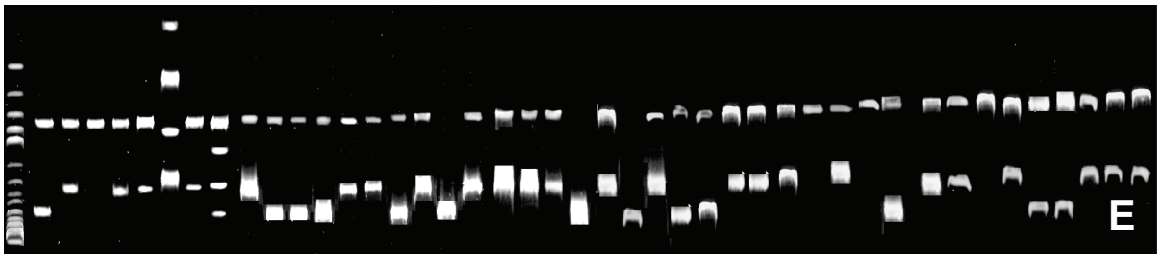
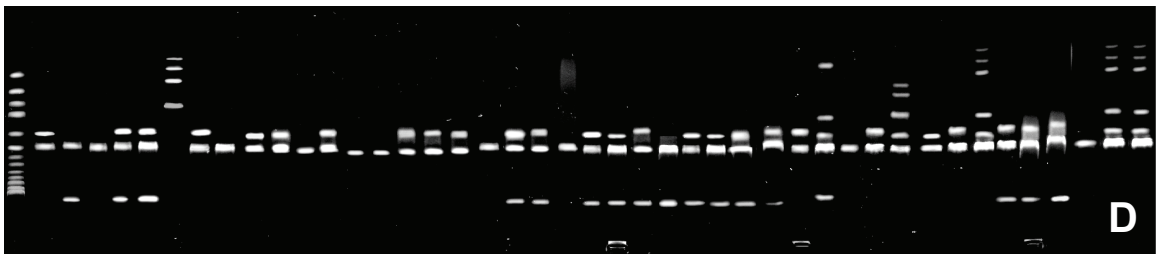
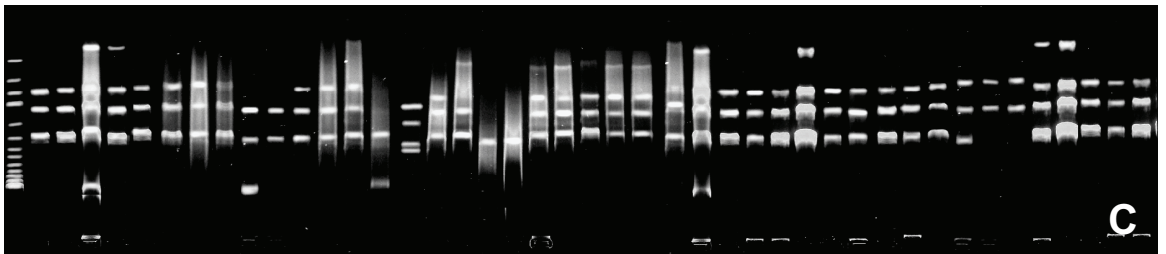
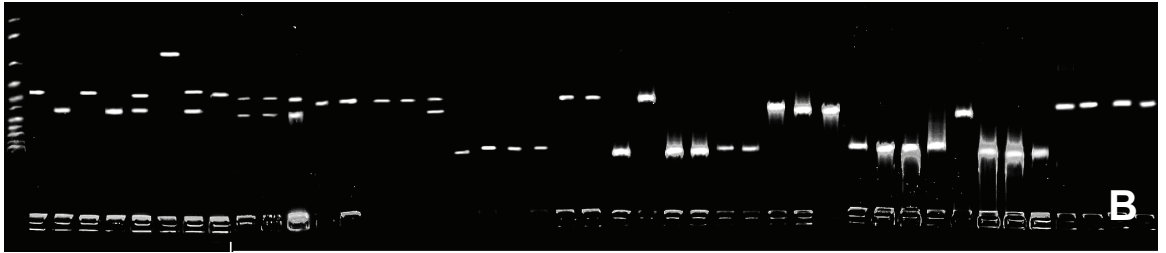
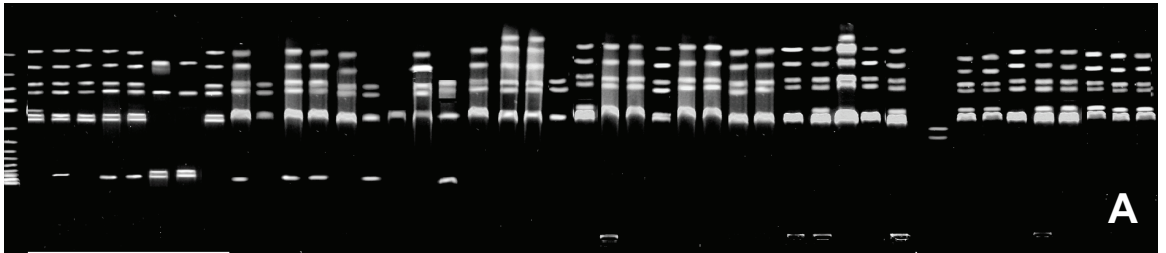


Figure 2



M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43

Figure 3

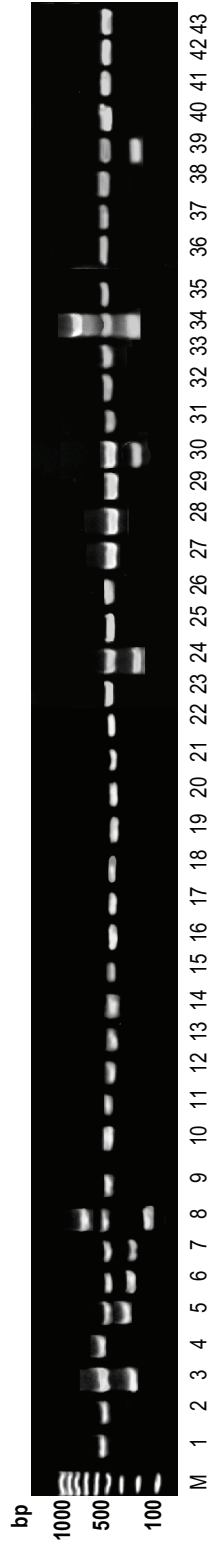


Figure 4

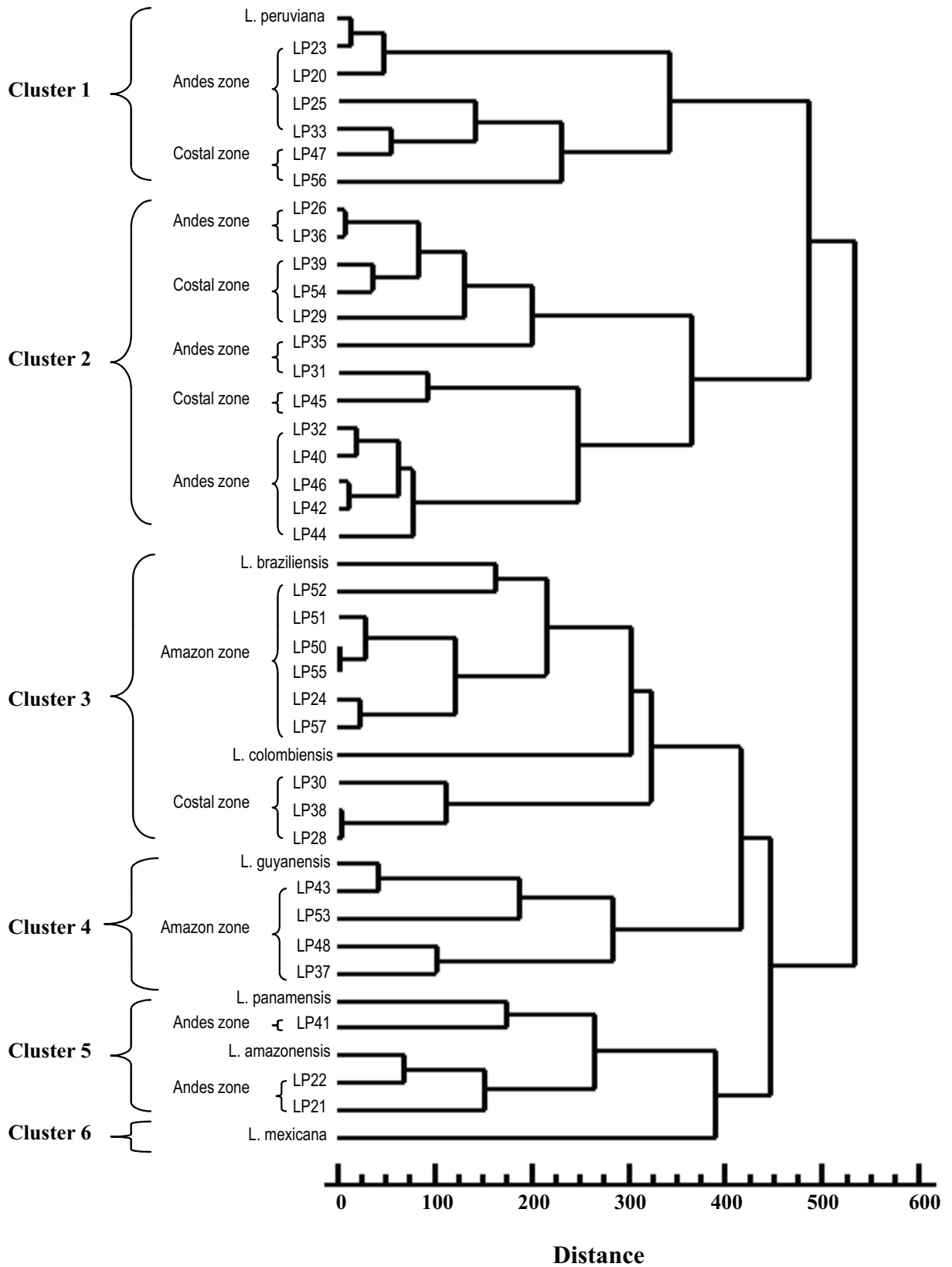


Figure 5



Elsevier Editorial System(tm) for Experimental Parasitology
Manuscript Draft

Manuscript Number: EP-09-193

Title: *Trypanosoma cruzi* diversity and epidemiology of Chagas' disease in Latin America

Article Type: Research Paper

Keywords: Key-words: *Trypanosoma cruzi*, Latin America, characterization, lineage 1, lineage 2.

Corresponding Author: Dr. Clotilde Marín Sánchez, PhD

Corresponding Author's Institution: University of Granada

First Author: Jesús Urbano

Order of Authors: Jesús Urbano; Manuel Sánchez-Moreno; Gloria Minaya; Mario A Barrera; Javier Escobedo; Paulino Tamay; Guillermo Martín-Gutiérrez; Gregorio Pérez-Cordón; Ramón Gutiérrez-Sánchez; Clotilde Marín Sánchez, PhD

Abstract: The characterization of 15 trypanosome stocks isolated in different geographical areas of Latin America and from different host and vector species, in comparison with six reference strains by isoenzyme analysis and the study of the kDNA of the parasite. The phylogenetic approach grouped the isolates into five clusters. Cluster I formed by three reference stocks with four Mexican isolates. The second cluster formed by the two isolates from Chile, the isolates from Peru, and the isolates from Panama. These two clusters belonged to the *T. cruzi* lineage 1 and its grouping into two clusters could be due to genetic changes that this population underwent. The third cluster would include one reference strain, which could be considered as *T. cruzi* lineage 2. The fourth cluster would consist of two isolates from Mexico of uncertain characterization and the fifth cluster would include the two stocks of *T. rangeli*.

***Trypanosoma cruzi* diversity and epidemiology of Chagas' disease in Latin America**

Jesús Urbano¹, Manuel Sánchez-Moreno¹, Gloria Minaya², Mario Antonio Barrera³, Javier Escobedo³, Paulino Tamay⁴, Guillermo Martín-Gutiérrez¹, Gregorio Pérez-Cordón¹, Ramón Gutiérrez-Sánchez⁵, Clotilde Marín^{1*}.

¹Department of Parasitology. University of Granada, Severo Ochoa s/n, E-18071 Granada (Spain).

²Laboratorio de Leishmaniosis y Chagas, Instituto Nacional de Salud, Lima. Peru

³Laboratorio de parasitología. Centro de Investigaciones Regionales Dr, Hideyo Noguchi. Universidad Autónoma de Yucatán, Mérida, Mexico.

⁴ Centro de Investigaciones en Enfermedades Tropicales de la Universidad Autónoma de Campeche, Campeche, México.

⁵ Department of Statistics, University of Granada, Severo Ochoa s/n, E-18071 Granada (Spain).

* for correspondence: Clotilde Marín Sánchez, Department of Parasitology. University of Granada, Severo Ochoa s/n, E-18071 Granada (Spain). Tel.: +34 958 242369; fax: +34 958 243174. *E-mail address:* cmaris@ugr.es.

Abstract

The characterization of 15 trypanosome stocks isolated in different geographical areas of Latin America and from different host and vector species, in comparison with six reference strains by isoenzyme analysis and the study of the kDNA of the parasite. The phylogenetic approach grouped the isolates into five clusters. Cluster I formed by three reference stocks with four Mexican isolates. The second cluster formed by the two isolates from Chile, the isolates from Peru, and the isolates from Panama. These two clusters belonged to the *T. cruzi* lineage 1 and its grouping into two clusters could be due to genetic changes that this population underwent. The third cluster would include one reference strain, which could be considered as *T. cruzi* lineage 2. The fourth cluster would consist of two isolates from Mexico of uncertain characterization and the fifth cluster would include the two stocks of *T. rangeli*.

Key-words: *Trypanosoma cruzi*, Latin America, characterization, lineage 1, lineage 2.

1. Introduction

Chagas disease is caused by the protozoan *Trypanosoma cruzi*. In Latin America, some 18 million people are affected with *T. cruzi*, while up to 28 million people are at risk of contracting the disease (WHO, 2007). The extensive variability in the symptoms of Chagas disease may be correlated with specific markers in the host or parasite, although it is likely that both affect the outcome of the infection (Sturm et al., 2003). The variable course of the human disease, which ranges from symptomless infection to severe heart and digestive tract anomalies, has been attributed both to the variable genetic constitution of the exposed human population as well as to the extensive genetic polymorphism detected among different *T. cruzi* isolates (Buscaglia and Noia, 2003; Macedo et al., 2004). *T. cruzi* exhibits considerable intra-specific diversity exemplified by differences in morphology of blood forms, virulence, pathogenicity, susceptibility to chemotherapeutic agents, immunological properties and infectivity in host cells (Murta and Romanha, 1999). These intra-specific variations show strong linkage disequilibrium, i.e. non-random association between alleles from different loci, thus indicating a basically clonal population structure for the species (Tibayrenc and Ayala, 1999).

Early works that highlighted *T. cruzi* intra-specific diversity used multi-locus enzyme electrophoresis analyses, leading to the arrangement of the parasite populations into three major zymodemes termed Z1, Z2, and Z3 (Miles et al., 1978). This complexity was also revealed by kinetoplastic DNA restriction fragment length polymorphism (Morel et al., 1980) and random amplified polymorphic DNA (RAPD) analyses, among other studies reviewed in (Tibayrenc and Ayala, 1999), suggesting an almost absolute genetic individuality of parasite clones. In fact, the three original

zymodemes turned into 43 when more parasite stocks and a broader range of enzymes were studied (Tibayrenc et al., 1986). Phylogenetic reconstruction of these zymodemes enabled the identification of two major groups, each exhibiting considerable genetic variability (Tibayrenc, 1998).

More recently, the identification of nuclear DNA markers have built a consensus concerning the existence of two major phylogenetic lineages within the *T. cruzi* taxon (Liarte et al., 2009). Lineage 1 corresponds to zymodeme Z2, whereas lineage 2 matches zymodeme Z1. Strains belonging to zymodeme Z3 could not be unambiguously classified as either lineage 1 or 2, since they harbour unusual rRNA and mini-exongene structures (Mendonça et al., 2002). Ecological and molecular data suggest that Z3 strains are more related to lineage 1 than to lineage 2, but their exact phylogeny is controversial (Kawashita et al., 2001).

Overall, typological schemes proposed by different authors based on biochemical and/or genetic evidence converged in an overall picture, supporting the clustering of *T. cruzi* strains into two principal groups that were recently called *T. cruzi* I and II in an effort to unify the nomenclature (Buscaglia and Noia, 2003). However, evidence indicates that this phylogenetic classification is preliminary and should be taken as an evolving theoretical framework for the study of *T. cruzi* populations. Furthermore, within these two groups, various subgroups need to be considered (Souto et al., 1996; Brisse et al., 2000; Henriksson et al., 2002; Robillo et al., 2000; Machado and Ayala, 2000).

The objective of the present study was to characterize 15 new *T. cruzi* isolates and 6 stocks already characterized and used as reference, of different geographical origins, in order to establish a classification based on isoenzymatic techniques and the

study of the kDNA of the parasite (by restriction endonucleases and PCR) and thereby establish a certain geographic correlation of the isolates.

2. Materials and methods

2.1. Parasite isolation and in vitro culture

The new fifteen stocks from different areas of South America and the reference strains (Table 1). After isolation, the new flagelates were transferred to the biphasic culture medium Nicolle Nocloe Novi and MacNeal medium, supplemented with minimal essential medium, and 20% inactivated foetal bovine serum. The isolates were cloned and cultured *in vitro* using Grace's medium (Sigma) (Sánchez-Moreno et al., 1995). The parasites were inoculated at a density of 1.6×10^6 into 5 mL of medium in 25-mL flacon flasks, and cultured at 28°C. Aliquots were taken every 24 h for 9 days and the number of parasites was counted in a Neubauer haemocytometer. On the last day, the cells were removed by centrifugation at 600 g for 10 min.

2.2. Isoenzyme characterization

Crude homogenates were obtained from 300mL of culture medium containing 2×10^7 cells.mL⁻¹. Cells were harvested by centrifugation at 600 x g 10 min, washed twice in a phosphate-buffered saline (pH 7.4), and resuspended in a hypotonic enzyme stabilizer solution containing 2mM dithiothreitol, 2mM E-aminocaproic acid, and 2mM EDTA (Miralles et al., 2002). The samples were frozen at -80 °C for 15 min and thawed at 25 °C. After several freezing–thawing cycles, cell lysates were centrifuged at 8000 x g

during 20 min at 4 °C, and the supernatants were stored in liquid nitrogen until use. The protein concentration was determined using the Bradford method and stored at a final concentration of 1mg.mL⁻¹ of protein.

The enzymes were separated by isoelectric focusing in a PhastSystem apparatus, using Phast-gel IEF 3-9 (Pharmacia, Freiburg, Germany).

The following enzymes were tested: malic enzyme (EM), glucose 6-phosphate dehydrogenase (G6PDH), isocitrate dehydrogenase (IDH), malate dehydrogenase (MDH), glucosa phosphate isomerase (GPI), and superoxide dismutase (SOD). The staining procedures are described in [Miralles et al. \(2002\)](#).

2.3. kDNA isolation

Epimastigote forms were collected by centrifugation of 300mL of culture medium, when their concentrations had reached about 2×10^7 cells.mL⁻¹, after about 5 days. They were washed twice in 50mL of 0.15M NaCl, 0.015M sodium citrate, and once with SE buffer (0.15M NaCl, 0.1M EDTA, pH 8.0). kDNA was obtained according to the procedure described by ([Gonçalves et al., 1984](#)).

2.4. Restriction-enzyme digestion and electrophoresis analysis

The kDNA extracts (3 mg.mL⁻¹) were completely digested with restriction endonucleases (Hae III, BamH I, Hinf I, Hind III, EcoR I, Msp I and RSA I) according to the manufacturer's prescribed buffer conditions (Boehringer-Ingelheim, Barcelona, Spain). The digestion products were electrophoresed in 1.3% agarose slab gels as described elsewhere ([Riou and Yot, 1977](#)) and the fragment sizes were estimated by

comparing their mobilities with those of a 100-bp DNA ladder (Gibco- BRL, Gaithersburg). The gels were stained with ethidium bromide (10 mgmL⁻¹ for 10 min) and photographed under UV light with an Olympus Camedia digital camera, C-4000 Zoom.

2.5. PCR procedure

The PCR was performed on lysed cultures (1 µL) in a 25 µL reaction mixture consisting of 2.5 µL 10X buffer (Promega), 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM of each nucleotide, 25 µM of the primers **S35** (5'-AAATAATGTACGGGTGAGATGCATGA-3') and **S36** (5'-GGGTTTCGATTGGGGTTGGTGT-3') which amplifies the variable region of minicircle kDNA of *T. cruzi*, and 1.25 units of Taq polymerase (Promega). The primer set S35/S36 amplifies 330 bp and 760 bp fragment from the variable region, for *T. cruzi* and *T. rangeli*, respectively (Sturm et al., 1989). Cycling was performed in a thermocycler (Minicycle®, BioRad). After a preheating step of 5 min at 94°C, 36 cycles of denaturation (1 min at 94°C, annealing (1 min at 60°C) and elongation (1 min at 72°C) followed with, finally, an extensión step of 10 min at 72°C. Then, the PCR products were loaded on a 1.3% agarose gel containing ethidium bromide, visualized with ultraviolet light and photographed under UV light with an Olympus Camedia digital camera, C-4000 Zoom.

2.6. Statistical study

The statistical methods were based on individual hierarchical cluster analysis, selecting the Euclidean distance to the square as the basis for measuring the associations

between individuals. The Euclidean distance was calculated by the following grouping procedures of simple linkage (Rk 0.7355), average linkage among groups (Rk 0.7518), average linkage (Rk 0.7726), centroid method (Rk 0.7586), median method (Rk 0.7204), and the Ward method (Rk 0.7570). The cophenetic coefficient (Rk) measures the degree of distortion between relationships, means in terms of original distances between individuals and those existing at the end of the analysis. The one with the highest cophenetic correlation was chosen as the optimal method. In the selection procedures, the average linkage between groups was considered using the coefficient Rk of Rand, which is an index of the similarity between classifications. This analysis was made with the STATGRAPHICS program, version 5.0.

3. Results

Fifteen new stocks of species belonging to the genus *Trypanosoma*, isolated from humans with and without symptoms of Chagas disease, from the faeces and the salivary glands of different vectors from different origins (Table 1), were cloned and cultivated in Grace's medium supplemented with 10% inactivated foetal bovine serum, reaching growth densities on the order of $1-2 \times 10^7$ cells/ml. These new isolates, together with 6 reference stocks (TCM, TC1, TY, TCL, and two trypanosomes characterized as *T. rangeli* (TRaPa and TRaPe) were analysed by isoenzymatic electrophoresis with six enzyme systems (G6PDH, GPI, MDH, EM, SOD, and IDH). The enzyme G6PDH clearly distinguished the two *T. rangeli* isolates from the rest of the reference trypanosomes (Fig. 1A). The enzyme MDH differentiated TY and TCL from the rest of the reference strains and from each other (Fig.1C). The same applies to the SOD enzyme that differentiated TCL from the rest (Fig.1E). When the 15 new isolates were

submitted to the isoenzymatic analysis against the six systems, phylogenetic relations could be established between these isolates and the reference stocks. With the enzyme G6PDH, the isolates TH7 and TCMP1 presented a different electrophoretic pattern from that of the other isolates but similar to that of TCM and TCL (Fig. 1A, lines 10 and 16). Meanwhile, the isolate TCPa3 had a profile completely different from that on any of the other isolates and did not coincide with any of the reference stocks (Fig. 1A, lane 20). With the enzyme GPI, the electrophoretic profile of the isolates TMF, TW3539, TH5, TH7, TP34, TCMP1, and TCPa1 showed a strong similarity to that of the TC1 reference stock (Fig. 1B, lines 7, 8, 9, 10, 14, 16, and 19). The enzyme MDH registered significant differences in the profile of the isolates TH17, TH1, and TCPa3, which do not resemble the profiles of the reference strains (Fig. 1C, lines 12, 17, and 20). The TCMP2 isolate had an isoenzymatic profile different from that of the rest of the stocks with the enzyme SOD (Fig. 1E, lane 18), as happened with the isolates TCPa1, TCPa2, and TCPa3, which with the enzyme IDH presented a profile that differed from that of the rest of the isolates (Fig. 1F, lines 19, 20, and 21).

The kDNA of the 15 new isolates and the 6 reference stocks were purified and digested with 7 restriction endonucleases (BamHI, EcoRI, HaeIII, HinfI, HindI, MspI, and RsaI). The products of the digestion were submitted to electrophoresis in gels of 1.3% agarose. The endonucleases assayed were capable of digesting the kDNAs studied into different fragments (Fig. 2). The heterogeneity of the restriction profiles was notable in all the stocks studied. TCM had a restriction profile completely different from that of the rest of the isolates with the 7 restriction enzymes (Fig. 2, lane 1). The same occurred with TCL (Fig. 2, lane 4). TC1 and TY showed a restriction pattern that was quite homogeneous with respect to all the endonucleases assayed (Fig. 2, lines 2 and 3). Also, the two stocks characterized as *T. rangeli* (TRaPa and TRaPe) had similar

patterns but different from the others (Fig. 2, line 5 and 6). The endonuclease BamH I gave 4 different restriction patterns when submitted to the kDNA of the 15 new isolates: TMF, TH7, TH4, TH17, TP27, TP34, TP59, TCPa3, and TCPa4 presented strong similarities with one another as well as with the reference stocks TC1 and TY (Fig. 2A, lines 7, 10 to 15, 20, and 21 and the lines 2 and 3). The isolate TW3539 had a profile similar to those of *T. rangeli* (TRaPa and TRaPe) (Fig. 2A, lines 8, 5, and 6). The isolates TCMP1, TH1, and TCMP2 had a similar TCL profile (Fig. 2A, lines 16, 17, 18 and 4) while the isolates TH5 and TCPa1 presented a profile that differed from that of the rest (Fig. 2A, lines 9 and 19). In general, all the endonucleases presented very homogeneous restriction patterns when they digested the kDNA of the 15 isolates of species belonging to the genus *Trypanosoma* (Fig. 2).

Fig. 3 gives the amplification profiles of the S35/S36 PCR assay which showed that all the isolates, except for the two stocks characterized as *T. rangeli*, presented an amplified band of 300-320 bp (Fig.3, lines 1-3 and 7-21). The PCR on kDNA of *T. rangeli* (TRaPa and TRaPe) amplified two bands of 760 bp and 300 to 450 bp (Fig.3, lines 5 and 6), while the isolate TCL, presented a band of about 270 bp (Fig.3, lane 4).

4. Discussion

The clonal structure of the *T. cruzi* population has been intensively investigated by several research teams in recent years (Buscaglia and Noia, 2003; Macedo et al., 2004 and Cerqueira et al., 2008), reflecting the pronounced heterogeneity of this group of pathogens. This heterogeneity has been assessed using different biochemical and genetic markers as well as other parameters (e.g. pathogenicity, tissue tropism, drug sensitivity). As a result of this appraisal, different classifications have been proposed (Milles et al., 1978, Souto et al., 1996, Breisse et al., 2000, Buscaglia and Noia, 2003;

Liarte et al., 2009); however, it is a complex task to disentangle the relationships between the different stocks, and therefore in the present study we study the characterization of 15 *T. cruzi* isolates and 6 stocks already characterized, of different geographical origins, in order to establish a classification based on isoenzymatic techniques as well as the study of the DNA of the parasite.

The statistical studies based on isoenzymatic characterization of the isolates grouped the isolates and reference stocks used in this study into 4 **Clusters**. **Cluster 1** would include the reference stocks TCM, TY, and TCI together with the isolates from Mexico (TH7, TH5, TH4, and TCMP1), all these being considered as Zymodeme 1 (Z1) (Miles et al., 1978). **Cluster 2** would be divided into two subclusters: Subcluster 2A, for the isolates from Chile (TMF and TW3559), the isolates from Peru (TP27, TP34, and TP59) and the isolates from Panama (TCPa1, TCPa3, and TCPa4); and Subcluster 2B, containing the two *T. rangeli*, i.e. one *T. rangeli* (TRaPa) isolate from Panama, and the second one (TRaPe) from Peru. This categorization points to a possible correlation between the stocks and their geographic origins (Steindel et al., 2008). **Cluster 3** would be formed by a single stock, TCL, which could correspond to Zymodeme 2 (Salazar et al., 2006), while the **fourth Cluster** would be formed by the Mexican isolates TCMP2, TH1, and TH17, which we could consider as also belonging to Zymodeme 1 (data not shown).

When the statistical study was made on the basis of the restriction cleavage pattern, the isolates were regrouped again into four **Clusters**. The reference stock TCL formed a **cluster** separate from the others, as happened with the isoenzyme analysis. Again, a correlation of geographic origin of the stocks and their grouping became evident, the isolates of a given region being genotypically similar. Nevertheless, some stocks failed to follow this rule, but it should not be overlooked that today there is no

geographic barrier that blocks a stock from becoming established in another region (Buscaglia and Noia, 2003).

Also, the kDNA was used for the specific amplification by PCR technique which showed the typical approximately 330 bp band derived from *T. cruzi* minicircles with four conserved regions (Sturm et al., 1989), except in the TCL stock (270 bp) and different of the *T. rangeli* profile (760 bp and 300 to 450 bp), fragments derived from *T. rangeli* minicircles with two conserved regions (Recinos et al., 1994; Vallejo et al., 1994), and from minicircles of with four conserved regions (Recinos et al., 1994).

The statistical analysis of all the results together (Fig. 4) provides a more real phylogenetic approach, grouping the isolates into five **Clusters**. The **first cluster** would be formed by the reference stocks TCM, TC1, and TY, together with the Mexican isolates TH17, TCMP2, TCMP1, and TH4. This **cluster** could be divided into two subclusters according to phylogenetic affinity, in which the first subcluster (1A) would encompass three reference stocks and the second subcluster (1B) would include the Mexican isolates, all from the Yucatan Peninsula. The **second cluster** would consist of the two Chilean isolates TMF and TW3559 (also phylogenetically so close that they can be considered identical), the Peruvian isolates TP34, TP27, and TP59 (also phylogenetically close), and the Panamanian isolates TCPa4, TCPa1, and TCPa3 (phylogenetically more dispersed with regard to each other), and the Mexican isolate TH7. The **third cluster** would include TCL, with a phylogenetic relationship quite distant from the above-mentioned isolates. **Cluster 4** would be formed by the isolates from Mexico, TH5 and TH1, while **Cluster 5** would include the two stocks of *T. rangeli*.

Long-term clonal evolution together with episodes of genetic exchange led to the individualization of six discrete genetic subdivisions or lineages, designated as *T.*

cruzi I, *T. cruzi* IIa, *T. cruzi* IIb, *T. cruzi* IIc, *T. cruzi* IId and *T. cruzi* IIE, which include all typed strains and cloned stocks thus far isolated (Tibayrenc, 2003; Brise et al., 2003). *T. cruzi* lineages appear to be distributed differentially among triatomine and host species as well as habitats in different geographical areas (Higo et al., 2004; Yeo et al., 2005). Although all *T. cruzi* populations cause disease in humans, epidemiological studies suggest that some of these lineages are more closely related to anthromponotic environments, others are related to sylvatic environments, and *T. cruzi* lineage 1 to both. Therefore, we suggest that the isolates included in the first two clusters belong to *T. cruzi* lineage 1, and their grouping into two **clusters**, which in turn are divided into subclusters, is due to genetic changes which this population undergoes and which are possible to detect by submitting the kDNA to restriction enzymes or else by phenotypic study with isoenzymatic analysis. TCL would belong to the *T. cruzi* lineage 2. The isolates from Mexico, which we call TH5 and TH1, are in a difficult position, which requires another type of study to establish their phylogenetic position.

Acknowledgments

This work was supported by grants from the Projects CGL-2006-27889-E and CGL-2008-03687-E of the Ministry Science and Technology (MEC-Spain).

References

- Brise, S., Dujardin, J., Tibayrenc, M. 2000. Identification of six *Trypanosoma cruzi* lineages by sequence-characterised amplified region markers, *Molecular and Biochemical Parasitology* 111, 95-105.

- Brisse, S., Henriksson, J., Barnabe, C., Douzery, E.J., Berkvens, D., Serrano, M., De Carvalho, M.R., Buck, G.A., Dujardin, J.C., Tibayrenc, M., 2003. Evidence for genetic exchange and hybridization in *Trypanosoma cruzi* based on nucleotide sequences and molecular karyotype. *Infection Genetic and Evolution* 2,173-183.
- Buscaglia, C.A., Noia, J.M 2003. *Trypanosoma cruzi* diversity and epidemiology of Chagas' disease. *Microbes and Infection* 5: 419-427. 2003.
- Cerqueira, G.C., Bartholomeu, D.C., DaRocha, I.W., Hou, L., Freitas-Silva, D.M., Renato Machado, C., El-Sayed, N.M., Teixeira, S.M.R. 2008. Sequence diversity and evolution of multigene families in *Trypanosoma cruzi*. *Molecular and Biochemical Parasitology* 157, 65-72.
- Gonçalves, .AM., Nehme, N.S., Morel, C.M. 1984. Trypanosomatid characterization by schizodeme analysis. In: *Genes and Antigens of Parasites (A Laboratory Manual)*. Morel, C.M.,(Ed.) 2nd edn. Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil.
- Henriksson, J., Dujardin, J., Barnabe, C., Brisse, S., Timperman, G., Venegas, J., Pettersson, U., Tibayrenc, M., Solari, A. 2002. Chromosomal size variation in *Trypanosoma cruzi* is mainly progressive and is evolutionarily informative, *Parasitology* 124, 277-286.
- Higo, H., Miura, S., Horio, M., Mimori, T., Hamano, S., Agatsuma, T., Yanagi, T., Cruz-Reyes, A., Uyema, N., Rojas de Arias, A., Matta, V., Akahane, H., Hirayama, K., Takeuchi, T., Tada, I., Himeno. K. 2004. Genotypic variation among lineages of *Trypanosoma cruzi* and its geographic aspects. *Parasitology International* 53, 337-344.
- Kawashita, S., Sanson, G., Fernandes, O., Zingales, B., Briones, M. 2001. Maximum-likelihood divergence date estimates based on rRN-gene sequences suggest two

- scenarios of *Trypanosoma cruzi* intraspecific evolution, *Molecular Biology and Evolution* 18, 2250-2259.
- Liarte, D.B., Murta, S.M.F., Steindel, M., Romanha, A.J. 2008. *Trypanosoma cruzi*: Multiplex PCR to detect and classify strains according to groups I and II. *Experimental Parasitology*. In press.
- Macedo, A.M., Machado, C.R., Oliveira, R.P, Pena, S.D. 2004. *Trypanosoma cruzi*: genetic structure of populations and relevance of genetic variability to the pathogenesis of chagas disease. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 99, 1-12.
- Machado, C., Ayala, F. 2000. Nucleotide sequences provide evidence of genetic exchange among distantly related lineages of *Trypanosoma cruzi*, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 98, 7396-7401.
- Mendonça, M., Nehme, N., Santos, S., Cupolillo, E., Vargas, N., Junqueira, A., Naiff, R., Barrett, T., Coura, J., Zingales, B., Fernandes, O. 2002. Two main clusters within *Trypanosoma cruzi* zymodeme 3 are defined by distinct regions of the ribosomal RNA cistron. *Parasitology* 124, 177-184.
- Miles, M., Souza, A., Pova, M., Shaw, J., Lainson, R., Toyé, P.1978. Isozymic heterogeneity of *Trypanosoma cruzi* in the first autochthonous patients with Chagas' disease in Amazonian Brazil. *Nature* 272, 819-821.
- Miralles, D.M., Marín, C., Magán, R., Fernández-Ramos, C., Entrala, E., Cordova, O., Vargas, F., Sánchez-Moreno, M. 2002. *In vitro* culture and biochemical characterization of six trypanosome isolates from Peru and Brazil. *Experimental Parasitology* 102, 23-29.
- Morel, C., Chiari, E., Camargo, E., Mattei, D., Romanha, A., Simpson, L. 1980. Strains and clones of *Trypanosoma cruzi* can be characterized by pattern of restriction

- endonuclease products of kinetoplast DNA minicircles. Proceedings of the National Academy of Sciences. USA 77, 6810-6814.
- Murta, S.M.F., Romanha, A.J. 1999. Characterization of *Trypanosoma cruzi*. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 94, 177-180.
- Recinos, R. F., Kirshhoff, L.V., Donelson, J.E., 1994. Characterization of kinetoplast DNA minicircles in *Trypanosoma rangeli*. Molecular and Biochemical Parasitology 63, 59–67.
- Robello, C., Gamarro, F., Castanys, S., Alvarez-Valin, F. 2000. Evolutionary relationships in *Trypanosoma cruzi*: molecular phylogenetics supports the existence of a new major lineage of strains. Gene 246, 331-338.
- Riou, G., Yot, P. 1977. Heterogeneity of the kinetoplast DNA molecules of *Trypanosoma cruzi*. Biochemistry 16, 2390-2396.
- Salazar, A., Schijman, A.G., Triana-Chávez, O. 2006. High variability of Colombian *Trypanosoma cruzi* lineage I stocks as revealed by low-stringency single primer-PCR minicircle signatures. Acta Tropica 100, 110-118.
- Sánchez-Moreno, M., Fernández-Becerra, C., Castilla, J., Osuna, A. 1995. Metabolism studies by ¹H NMR of different forms of *Trypanosoma cruzi* strains as obtained *in vitro* culture. FEMS Microbiology Letters. 133,119-125.
- Souto, R., Fernandes, O., Macedo, A., Campbel, D., Zingales, B.1996. DNA markers define two phylogenetic lineages of *Trypanosoma cruzi*, Molecular and Biochemical Parasitology 83, 141-152.
- Steindel, M., Kramer Pacheco, L., Scholl, D., Soares, M., de Moraes, M.H., Eger, I., Kosmann, C., Sincero, T.C., Stoco, P.H., Murta, S.M., de Carvalho-Pinto, C.J., Grisard, E.C. 2008. Characterization of *Trypanosoma cruzi* isolated from humans, vectors, and animal reservoirs following an outbreak of acute human Chagas disease

- in Santa Catarina State, Brazil. *Diagnostic Microbiology of Infection Disease*. 60, 25-32.
- Sturm, N.R., Degraeve, W., Morel, C., Simpson, L., 1989. Sensitive detection and schizodeme classification of *Trypanosoma cruzi* cells by amplification of kinetoplast minicircle DNA sequences: use in diagnosis of Chagas' disease. *Molecular and Biochemical Parasitology* 33, 205–214.
- Sturm, N.R., Vargas, N.S., Westenberger, S.J., Zingales, B., Campbell, D.A., 2003. Evidence for multiple hybrid groups in *Trypanosoma cruzi*. *International Journal for Parasitology*. 33, 269-279.
- Tibayrenc, M. 1998. Genetic epidemiology of parasitic protozoa and other infectious agents: the need for an integrated approach, *Internacional Journal for Parasitology* 28, 85-104.
- Tibayrenc, M., Ayala, F. 1999. Evolutionary genetics of *Trypanosoma* and *Leishmania*. *Microbes and Infection* 1, 465-472.
- Tibayrenc, M., Ward, P., Moya, A., Ayala, F. 1986. Natural populations of *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas' disease, have a complex multiclonal structure. *Proceedings of the National. Academy of Sciences.Proc. USA* 83, 115-119.
- Tibayrenc, M., 2003. Genetic subdivisions within *Trypanosoma cruzi* (Discrete Typing Units) and their relevance for molecular epi- demiology and experimental evolution. *Kinetoplastid. Biology and Disease*. 2, 12-16.
- Vallejo, G.A., Macedo, A.M., Chiari, E., Pena, S.D.J., 1994. The kinetoplast DNA from *Trypanosoma rangeli* contains two distinct classes of minicircle with different size and molecular organization. *Molecular and Biochemical Parasitology* 67, 245–253.

World Health Organization (WHO). 2007. <http://www.who.org>. Accessed in Octubre 2008.

Yeo, M., Acosta, N., Llewellyn, M., Sanchez, H., Adamson, S., Miles, G.A., Lopez, E., Gonzalez, N., Patterson, J.S., Gaunt, M.W., de Arias, A.R., Miles, MA. 2005. Origins of Chagas disease: *Didelphis* species are natural hosts of *Trypanosoma cruzi* I and armadillos hosts of *Trypanosoma cruzi* II, including hybrids. International Journal for Parasitology 35, 225-233.

Legends

Fig. 1. Isoenzyme profiles of *Trypanosoma* isolates. lane 1: TCM; lane 2: TC1; lane 3: TY; lane 4: TCL; lane 5: TRaPa; lane 6: TRaPe; lane 7: isolate TMF; lane 8: isolate TW3539; lane 9: isolate TH5; lane 10: isolate TH7; lane 11: isolate TH4; lane 12: isolate TH17; lane 13: TP27; lane14: TP34; lane 15: TP59; lane 16: isolate TCMP1; lane 17: isolate TH1; lane 18: TCMP2; lane 19: TCPa1; lane 20: TCPa3 and lane 21: TCPa4. Enzymes: (A) glucose 6-phosphate dehydrogenase (G6PDH); (B) glucose phosphate isomerase (GPI); (C) malate dehydrogenase (MDH); (D) malic enzyme (ME); (E) superoxide dismutase (SOD).; (F) isocitrate dehydrogenase (IDH).

Fig. 2. Restriction endonuclease analysis of kDNA of *Trypanosoma* isolates. (A) kDNAs+ BamHI; (B) kDNAs+EcoRI; (C) kDNAs+HaeIII; (D) kDNA+Hindi; (E) kDNAs + HinfI. Lane; (F) kDNAs + MspI and (G) kDNAs+ RSAI. Organisms: lane1: TCM; lane 2: TC1; lane 3: TY; lane 4: TCL; lane 5: TRaPa; lane 6: TRaPe; lane 7: isolate TMF; lane 8: isolate TW3539; lane 9: isolate TH5; lane 10: isolate TH7; lane 11: isolate TH4; lane 12: isolate TH17; lane 13: TP27; lane14: TP34; lane 15: TP59; lane 16: isolate TCMP1; lane 17: isolate TH1; lane 18: TCMP2; lane 19: TCPa1; lane 20: TCPa3 and lane 21: TCPa4. Size markers are 1 Kb DNA ladder fragments (Lane M).

Fig. 3. Amplification products of the PCR assay from different *Trypanosoma* species and isolates using the primers S35 and S36. In each lane 10 μ L of sample was placed. Lane 1: TCM; lane 2: TC1; lane 3: TY; lane 4: TCL; lane 5: TRaPa; lane 6: TRaPe; lane 7: isolate TMF; lane 8: isolate TW3539; lane 9: isolate TH5; lane 10: isolate TH7; lane 11: isolate TH4; lane 12: isolate TH17; lane 13: TP27; lane14: TP34; lane 15:

TP59; lane 16: isolate TCMP1; lane 17: isolate TH1; lane 18: TCMP2; lane 19: TCPa1; lane 20: TCPa3 and lane 21: TCPa4. Lane M, 100-bp DNA ladder; the lower band shown is 100 bp.

Fig. 4. Dendrogram based on individual hierarchical cluster analysis (Program Stat-Graphics version 5.0).

Table 1. Biological hosts, vectors and geographical origin of *Trypanosoma cruzi* stocks.

Laboratory	International code	Geographical origin	Vector/host
Code			
TCM	MHOM/VE/1994/ Maracay	Maracay (Venezuela)	<i>Homo sapiens</i>
TC1	TPRX/CO2000/Cas7	Casanare (Colombia)	<i>Rhodnius prolixus</i>
TY	MHOM/BR/0000Y	Brasil	<i>Homo sapiens</i>
TCL	TINF/BR/1963/CLBrener	Rio grande (Brasil)	<i>Triatoma infestan</i>
TRaPa	MHOM/PA/2000/SA	Panama	<i>Homo sapiens</i>
TRaPe	IRECU/PE/2002/TRa605	Cajamarca (Peru)	<i>Rhodnius ecuadorensis</i>
TMF	---	Chile	<i>Homo sapiens</i>
TW3539	---	Chile	<i>Homo sapiens</i>
TH5	---	Merida (Mexico)	<i>Homo sapiens</i>
TH7	---	Merida (Mexico)	<i>Homo sapiens</i>
TH4	---	Merida (Mexico)	<i>Homo sapiens</i>
TH17	---	Merida (Mexico)	<i>Homo sapiens</i>
TP27	---	Peru	<i>Homo sapiens</i>
TP34	---	Peru	<i>Homo sapiens</i>
TP59	---	Peru	<i>Homo sapiens</i>
TCMP1	---	Campeche (Mexico)	<i>Homo sapiens</i>
TH1	---	Merida (Mexico)	<i>Homo sapiens</i>
TCMP2	---	Campeche (Mexico)	<i>Homo sapiens</i>
TCPa 1	---	Panama	<i>Rhodnius pallicepedes</i>
TCPa 3	---	Panama	<i>Rhodnius pallicepedes</i>
TCPa 4	---	Panama	<i>Rhodnius pallicepedes</i>

Figure 1

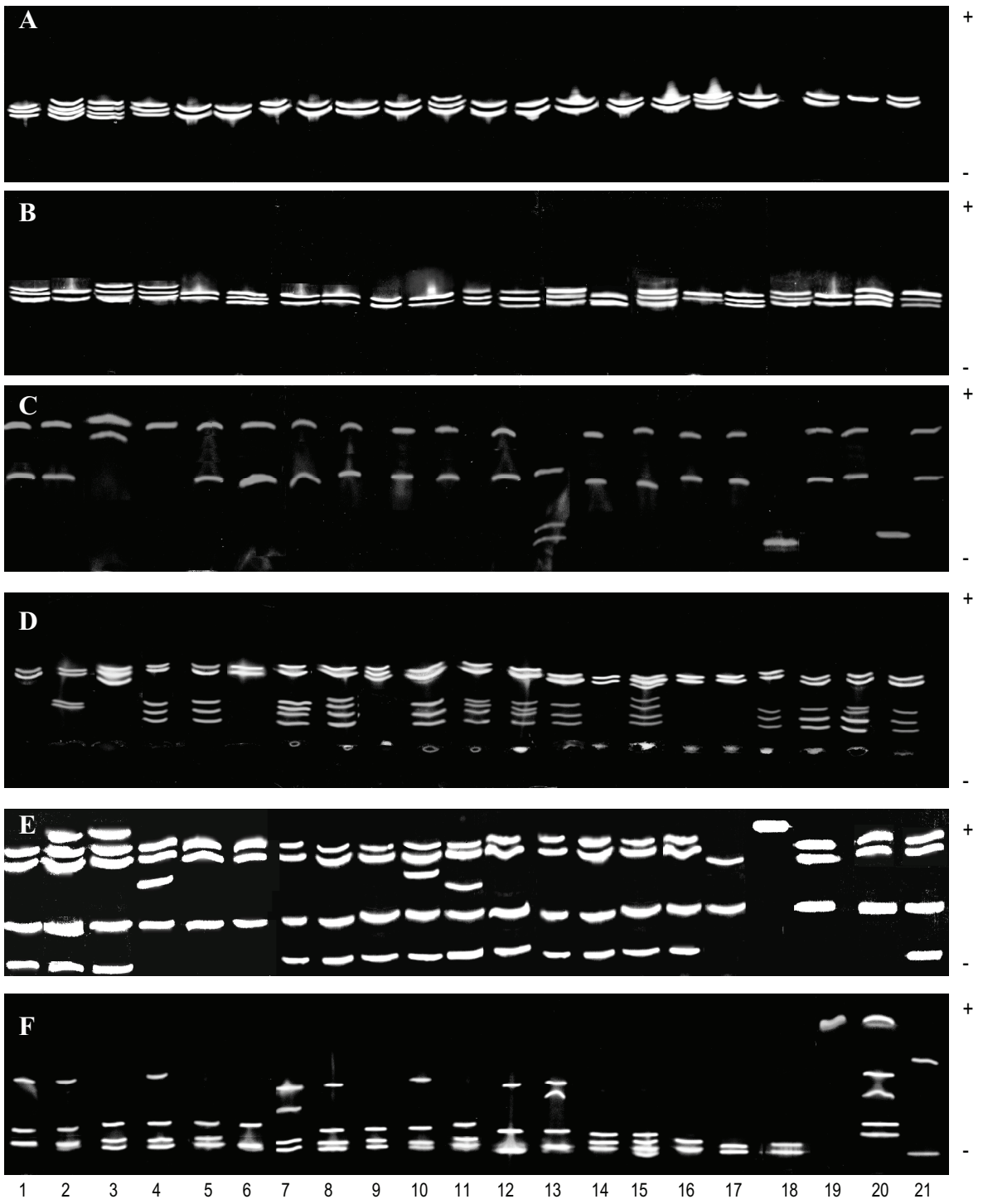


Figure 2

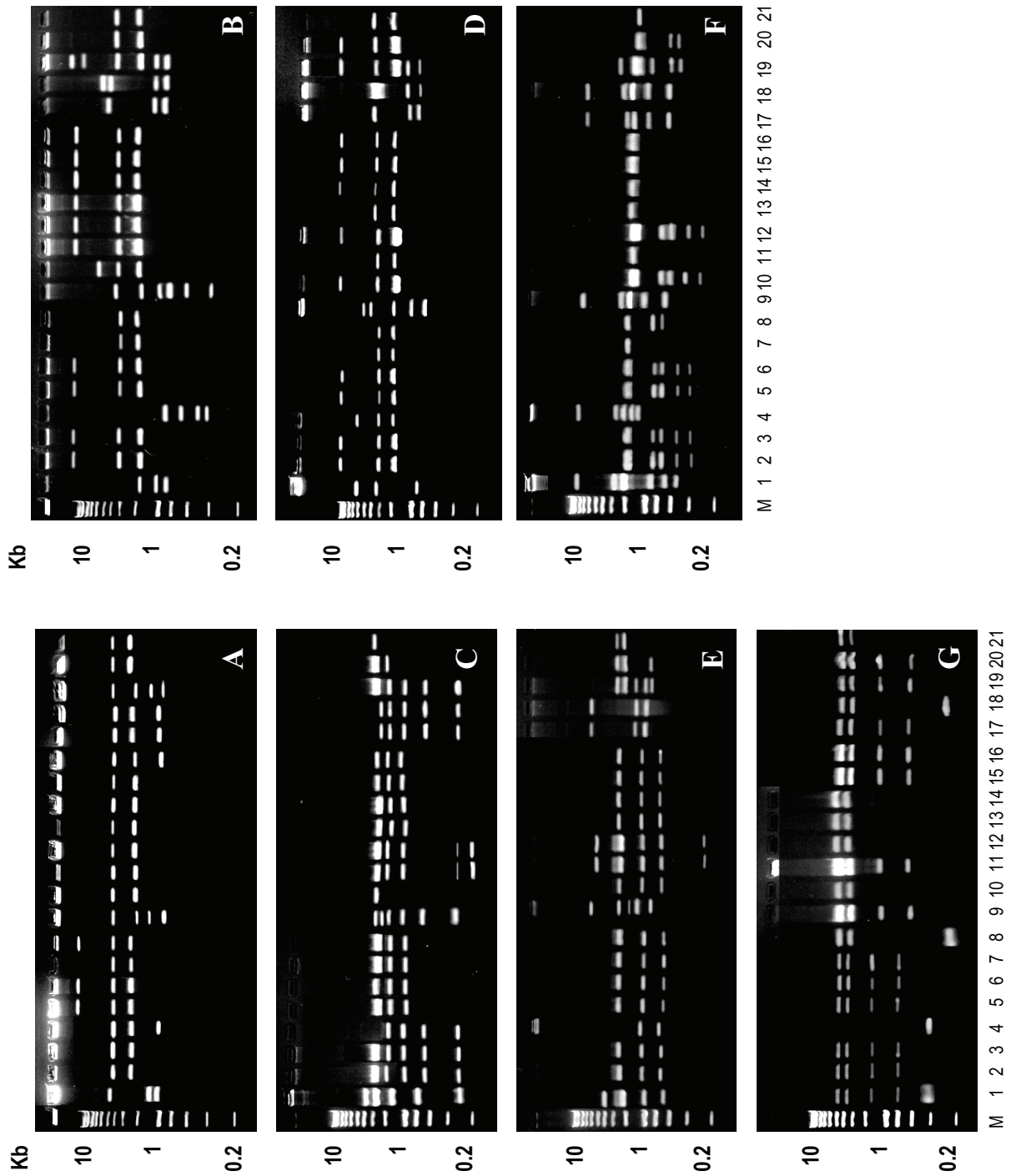


Figure 3

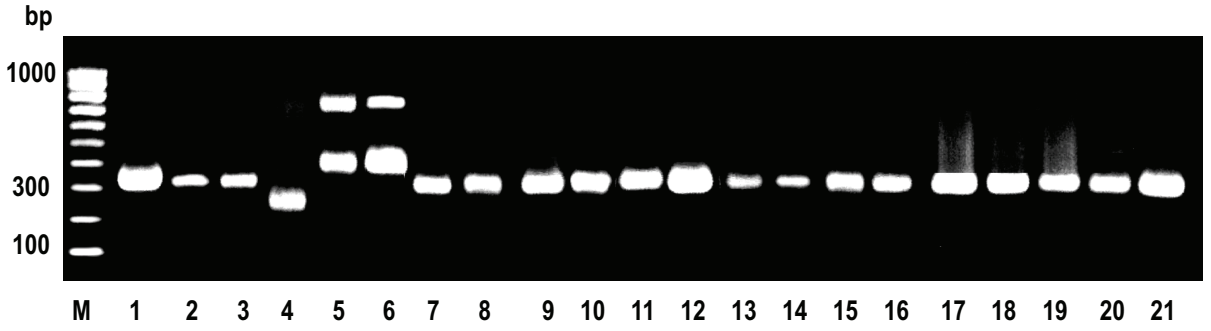


Figure 4

