

**TESIS DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**Caracterización molecular de *Leishmania (V.) braziliensis* y *Leishmania (L.) infantum* y estudios ecológicos de *Lutzomyia longipalpis* en Misiones.**

**Por**

**Lic. Acardi Soraya Alejandra**

**Director: Oscar Daniel Salomón**

**Co-Director: Domingo Javier Liotta**

**LaBiMAp - FCEQyN, UNaM**



**FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS FÍSICAS Y NATURALES**

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA**

**Córdoba, Argentina**

**2016**

## **COMISIÓN ASESORA**

**Dra. María Carla Cecere, FCEyN, UBA**

**Dr. Walter Ricardo Almirón, FCEyN, UNC**

**Dr. Oscar Daniel Salomón, INMeT-MSN**

## **DEFENSA ORAL Y PÚBLICA**

**Lugar y fecha:**

**Calificación:**

### **TRIBUNAL**

**Firma:.....**

**Aclaración:.....**

**Firma:.....**

**Aclaración:.....**

**Firma:.....**

**Aclaración:.....**

## **Dedicatorias**

*Este trabajo está dedicado*

*A la educación pública y gratuita que me formó:*

*Jardín “El patito coletón”, Escuela N 88 “Del centenario”, Colegio Nacional “Ramon J. Càrcano” Mte Caseros (Ctes), Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales, UNaM*

*A mi familia*

*A Julián y Alvaro ... todos juntitos ... todos juntitos*

## ***Agradecimientos***

*A Daniel y Javier formadores extraordinarios ambos, libertad para trabajar, apoyo incondicional, enseñanza con el ejemplo. No podría enumerar las cosas que aprendí de cada uno, me siento privilegiada y orgullosa de transitar con ustedes el camino de la ciencia.*

*Al LaBiMAp, un gran lugar de trabajo de donde destaco la solidaridad, compañerismo, profesionalismo y crecimiento conjunto de los que lo integramos, en especial agradezco a Ine, a mis compañeras de Leishmaniasis en especial Magui y Jéscica y a todos quienes formaron parte; fueron muchos años y muchas personas las que acompañaron este camino; de los últimos tiempo gracias a Marilina, Micaela, Daiana y Laura.*

*A la Universidad Nacional de Misiones, Universidad Nacional de Córdoba y CONICET.*

*A las “soledades”, Sole Fernández y Sole Santini, amigas de oro que encontré en este camino, con quienes el trabajo nunca fue trabajo, aprendí tanto de ambas y sobre todo gracias por el apoyo emocional tan necesario que siempre me brindaron.*

*A la Secretaría de Calidad de Vida de la Municipalidad de Posadas, en especial a Lilian Tartaglino; a los veterinarios del Instituto Municipal de Sanidad Animal, en especial a Carlo, Pelusa y Carolina; al Instituto Municipal de Vectores, un gracias enorme a Kike, Ingrid y Omar excelentes técnicos y compañeros de trabajo como así también a quienes nos conducían día a día, José, marcelito y Nacho. Al Instituto Nacional de Parasitología Fátala Chabén. Al Centro Nacional de Diagnóstico e Investigación en Endemo-epidemias. A la Fundación Mundo Sano.*

*A los asesores de este trabajo de tesis Dra. Carla Cecere y Dr. Walter Almirón por sus aportes y buena predisposición en cada encuentro.*

*A todos y cada uno de los vecinos de la ciudad de Posadas y de las 2000 hectáreas en Puerto Iguazú por abrirme tan amable y cálidamente las puertas de sus hogares.*

*A mis compañeros redilos, Gaby, Denise, Cristina, Jose, Juan, Enrique, Matías, Sole S., Sole F., Mariana, Mariela, Lucrecia, Euge, Pablo, Andrea, Magui, Lori, Analía, Beatriz, Christina, Lorena y todos los que vendrán... orgullosa de trabajar con ustedes, feliz de compartir momentos tan lindos de muestreos, laboratorio, escritura de trabajo y cada encuentro.*

*A TODA mi familia en especial a mamá, papá, May, Hori, Pia, Juanma y Juli todos y cada uno a mi lado en cada paso.*

*En especial a Alvarito fue hermoso e intenso, fue duro por momentos, pero SIEMPRE estuviste ahí.*

*A mi amado JULIAN, su sonrisa ES Y SERÁ mi motor eterno.*

## Listado de publicaciones derivadas de la tesis

- Lorena G. Caligiuri, **Soraya A. Acardi**, María Soledad Santini, Oscar D. Salomón and Christina B. McCarthy. Polymerase chain reaction-based assay for the detection and identification of sand fly gregarines in *Lutzomyia longipalpis*, a vector of visceral leishmaniasis. 2014, J. Vector Ecol. Vol. 39 (1): 83–93.
- **Soraya A Acardi**, Maria V Rago, Domingo J Liotta, Eduardo Fernandez-Duque, Oscar D Salomon. *Leishmania (Viannia)* DNA detection by PCR-RFLP and sequencing in free-ranging owl monkeys (*Aotus azarai azarai*) from Formosa, Argentina. 2013, Vet Parasitol 193: 156-159.
- María Soledad Fernández, María Soledad Santini, Regino Cavia, Adolfo Enrique Sandoval, Adriana Alicia Pérez, **Soraya Acardi**, Oscar Daniel Salomón. Spatial and temporal changes in *Lutzomyia longipalpis* abundance, a *Leishmania infantum* vector in an urban area in northeastern Argentina. 2013. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Vol. 108(7): 817-824.
- **Soraya A Acardi**, Domingo J Liotta, María S Santini, Carlo M Romagosa, Oscar D Salomon. Detection of *Leishmania infantum* in naturally infected *Lutzomyia longipalpis* (Diptera:Psychodidae: Phlebotominae) and *Canis familiaris* in Misiones, Argentina: First report of PCR-RFLP and a sequencing confirmation assay. 2010, Mem. Inst. Oswaldo Cruz 105 (6): 796-799.
- Santini MS, Salomón OD, **Acardi SA**, EA Sandoval, Tartaglino LC. *Lutzomyia longipalpis* behavior and control at an Urban Visceral Leishmaniasis Focus in Argentina. 2010, Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo 52(4): 187-191.

# 1 INDICE

1	Indice.....	v
1.1	Índice de ilustraciones, tablas y gráficos.....	1
1.2	Abreviaturas.....	3
1.3	Resumen.....	4
2	Introducción.....	5
2.1	Agente etiológico.....	7
2.1.1	Clasificación.....	8
2.1.2	organización genómica.....	9
2.2	El vector.....	10
2.2.1	Clasificación.....	12
2.2.2	Ciclo de transmisión.....	13
2.2.3	Criterios de incriminación vectorial.....	14
2.2.4	Escenarios eco-epidemiológicos de transmisión para LC y LV y factores determinantes..	15
2.3	Epidemiología.....	17
2.3.1	LC en argentina.....	18
2.3.2	LV en Argentina.....	20
2.4	Diagnóstico clínico.....	23
2.4.1	LC y LV en humanos.....	23
2.4.2	Leishmaniasis Visceral canina (LVC).....	26
2.5	Tipificación de <i>Leishmania</i> .....	27
2.6	Detección de <i>Leishmania</i> en el vector.....	28
2.7	Control.....	30
2.7.1	Control vectorial.....	31
2.7.2	Control de reservorios.....	32
2.8	Justificación del estudio.....	34
3	Hipótesis de trabajo.....	36
4	Objetivo General.....	37
4.1	Objetivos Específicos.....	37
5	Materiales y Métodos.....	38
5.1	Adaptación de protocolos de extracción de ADN y optimización de protocolos de PCR-RFLP para detección y tipificación de especies de <i>Leishmania</i> .....	39
5.1.1	Adaptación de protocolos de extracción de ADN.....	39
5.1.2	Optimización de protocolos de PCR-RFLP.....	40
5.1.3	Ensayos de límite teórico de detección (LTD) de parásitos.....	43
5.2	Estudio regional: análisis de infección a partir de muestras de zona endémica de LT y de zona epidémica emergente de LV de la provincia de Misiones.....	44
5.2.1	Ensayos moleculares.....	47

5.2.2	Análisis de concordancia entre protocolos de PCR-RFLP para detección de infección con <i>Leishmania</i> sp.....	48
5.3	Estudio microfocal: análisis de tasa de infección en flebótomos y canes capturados en AAV Y ASV	49
5.3.1	Selección de áreas de alta abundancia del vector (AAV) y áreas sin captura del vector (ASV)	49
5.3.2	Muestreo base de vectores y al año .....	51
5.3.3	Muestreo base de canes y al año .....	52
5.3.4	Análisis estadísticos .....	53
5.4	Descripción de dinámica anual y actividad horaria de <i>Lutzomyia longipalpis</i> .....	56
5.4.1	Muestreos .....	56
5.4.2	Análisis Estadísticos .....	60
6	resultados .....	62
6.1	Adaptación de protocolos de extracción de ADN y optimización de protocolos PCR-RFLP para detección y tipificación de especies de <i>Leishmania</i> .....	63
6.1.1	Adaptación de protocolos de extracción de ADN .....	63
6.1.2	Optimización de protocolos de PCR-RFLP.....	64
6.1.3	Ensayo de límite teórico de detección (LTD) de parásitos.....	68
6.2	Estudio Regional: Análisis de infección a partir de muestras de zona endémica de LT y de zona epidémica emergente de LV de la provincia de Misiones.....	70
6.2.1	Ensayos de detección y caracterización del parásito por PCR-RFLP .....	70
6.3	Estudio microfocal: análisis de tasa de infección en flebótomos y canes capturados en AAV Y SVC	75
6.3.1	Caracterización del macrohabitat: áreas .....	75
6.3.2	Caracterización del microhabitat. Viviendas .....	77
6.3.3	Muestreo base y al año de vector .....	81
6.3.4	Muestreo base de canes .....	83
6.3.5	Análisis de Asociación entre técnicas de detección y tipos de muestras de canes .....	86
6.3.6	Análisis de Regresión logística .....	87
6.4	Descripción de dinámica anual y actividad horaria de <i>Lutzomyia longipalpis</i> .....	88
6.4.1	Dinámica anual.....	88
6.4.2	Actividad horaria.....	92
7	Discusión.....	97
7.1	Adaptación de protocolos de extracción de ADN y optimización de PCR-RFLP para detección y tipificación de especies de <i>Leishmania</i> .....	98
7.2	Detección y caracterización del parásito e índices de concordancia entre protocolos moleculares .....	103
7.3	Estudio microfocal: análisis de tasa de infección en flebótomos y canes capturados en AAV y ASV de la ciudad de Posadas.....	108
7.3.1	Caracterización del macro y microhabitat en áreas y viviendas de AAV y ASV. ....	108
7.3.2	<i>Lutzomyia Longipalpis</i> : Abundancia e infección.....	110
7.3.3	Canes: infección por diferentes protocolos de PCR, a partir de diferentes muestras.....	111
7.3.4	Serología y PCR .....	114
7.3.5	Regresión logística edad, serología e ITS-1 h.....	116
7.4	Dinámica anual y actividad horaria de <i>Lutzomyia longipalpis</i> en la ciudad de Posadas.....	118

8	Conclusiones.....	126
9	Bibliografía.....	130
10	Anexos.....	147
	10.1 Anexo I.....	147
	10.1.1 Protocolos de extracción de ADN adaptados en el marco de esta tesis: .....	147
	10.1.2 Protocolos de extracción de ADN con los que se contaba en el laboratorio previamente al desarrollo de esta tesis:.....	149
	10.1.3 Optimización protocolos de PCR-RFLP .....	151
	10.2 Anexo II .....	154
	10.3 Anexo III.....	155
	10.3.1 Estadística descriptiva áreas .....	155
	10.3.2 Estadística descriptiva viviendas .....	156

# 1.1 ÍNDICE DE ILUSTRACIONES, TABLAS Y GRÁFICOS

## Índice de Ilustraciones

Ilustración 1: Visualización al MO de <i>Leishmania</i> .....	8
Ilustración 2: Taxonomía del genero <i>Leishmania</i> .....	9
Ilustración 3: Ciclo biológico de <i>Phlebotominae</i> .....	10
Ilustración 4: Flebótomos adultos.....	11
Ilustración 5: Ciclo de vida de <i>Leishmania</i> .....	14
Ilustración 6: Distribución de casos de leishmaniasis cutánea y mucocutánea en América.....	17
Ilustración 7: Distribución de casos de leishmaniasis visceral en América.....	18
Ilustración 8: Concentración de ADN diluciones seriadas de cultivo.....	44
Ilustración 9: Disección de hembras <i>Phlebotominae</i> .....	46
Ilustración 10: Espermatecas de hembras <i>Phlebotominae</i> .....	47
Ilustración 11: Imagen satelital de la ciudad de Posadas.....	51
Ilustración 12: Toma de muestra de sangre entera e hisopado de conjuntiva de canes.....	53
Ilustración 13: Imagen satelital de la ciudad de Posadas.....	57
Ilustración 14: Muestreo de dinámica y actividad horaria de <i>Lu. longipalpis</i> .....	59
Ilustración 15: Electroforesis en gel de Agarosa 2.5 % del producto de PCR-RFLP obtenido por el protocolo de Mini-exón.....	65
Ilustración 16: Electroforesis en gel de Agarosa 2.5 % del producto de PCR-RFLP obtenido por el protocolo de hsp70.....	66
Ilustración 17: Electroforesis en gel de Agarosa 2.5 % del producto de PCR-RFLP obtenido por el protocolo de ITS-1 a partir de cepas de referencia.....	67
Ilustración 18: Comparación del límite de detección teórica de los protocolos de PCR a partir de diluciones seriadas de ADN de <i>Leishmania</i> .....	69
Ilustración 19: Electroforesis en gel de Agarosa 2.5 % del producto de PCR-RFLP obtenido por el protocolo de Mini-exón a partir de biopsias cutáneas.....	71
Ilustración 20: Electroforesis en gel de Agarosa 2.5 % del producto de PCR-RFLP obtenido por el protocolo de hsp70 a partir de diferentes tipos de muestras.....	72
Ilustración 21: Electroforesis en gel de Agarosa 2.5 % del producto de PCR-RFLP obtenido por el protocolo de ITS-1 a partir de diferentes muestras.....	73
Ilustración 22: Electroforesis en gel de Agarosa 2.5 % del producto de PCR-RFLP obtenido por el protocolo de Mini-exón a partir de muestras caninas y de vector.....	74
Ilustración 23: Electroforesis en gel de Agarosa 2.5 % del producto de PCR-RFLP obtenido por el protocolo de ITS-1 a partir de muestras caninas.....	75

## Índice de tablas

Tabla 1: <i>Primers</i> utilizados en los tres protocolos de detección y tipificación de <i>Leishmania</i> .....	42
--	----

Tabla 2: Variables ambientales analizadas en cada una de las áreas de alta abundancia y área sin presencia del vector y en cada vivienda.....	54
Tabla 3: Protocolos de extracción de ADN a partir de diferentes tipos de muestras.....	63
Tabla 4: Resultados obtenidos por protocolos de Mini exón, ITS-1 y hsp70 en muestras clínicas, clínico veterinarias y flebotomos e índices de concordancia entre resultados de Mini- exón e ITS-1 .....	70
Tabla 5. Resultados de Prueba T de diferencias entre medias de variables de áreas AAV Y ASV .....	76
Tabla 6. Análisis de Componentes Principales sobre variables ambientales de áreas AAV y ASV. ....	76
Tabla 7. Resultados de Prueba T para ver diferencias entre medias de variables tomadas en viviendas provenientes de áreas AAV y ASV .....	78
Tabla 8 Análisis de Componentes Principales sobre variables ambientales de viviendas correspondientes a AAV y ASV.....	79
Tabla 9. Hembras de <i>Lu. longipalpis</i> capturadas en muestreo base diciembre 2009 enero de 2010 y muestreo al año en diciembre de 2010 en la ciudad de Posadas y lotes destinados a análisis de infección.....	82
Tabla 10. Resultados de análisis de rk 39 y PCR-RFLP a partir de muestras caninas de sangre entera discriminados por área. ....	84
Tabla 11 Resultados de infección detectados mediante PCR-RFLP en muestras de hisopado de conjuntiva discriminados por área. ....	85
Tabla 12. Análisis de asociación de la técnica de rk39 <i>versus</i> los protocolos de PCR ME e ITS-1 para ambos tipos de muestras .....	87
Tabla 13. Análisis de asociación entre los protocolos de PCR ME e ITS-1 y para ambos tipos de muestras .....	87
Tabla 14. Análisis de asociación entre canes seroreactivos o positivos por PCR con la edad Canina .....	88
Tabla 15. Medidas de estadística descriptiva a partir de las abundancias promedio trampa/noche de <i>Lutzomyia longipalpis</i> correspondientes a los doce meses de muestreo (N).....	90

## Índice de Gráficos

Gráfico 1: Ordenamiento de las áreas alta abundancia y sin presencia del vector. Biplot. ....	77
Gráfico 2: Ordenamiento de viviendas de áreas de alta abundancia y sin presencia del vector. Biplot. ....	80
Gráfico 3: Abundancia promedio trampa/noche de <i>Lu. longipalpis</i> en Posadas, Misiones 2009-2010. ....	89
Gráfico 4. Coeficientes de correlación de Spearman entre abundancias en función de variables climática del mes de muestreo, de 30 días y 60 días previos al muestreo .....	91
Gráfico 5: Actividad horaria de <i>Lu. longipalpis</i> capturados en periodos cada dos hora .....	93
Gráfico 6. Registros de Temperatura y Humedad Relativa para las 6 noches de muestreo .....	95

## Índice de Ilustraciones del Anexo I

Ilustración a.....	151
Ilustración b.....	152
Ilustración c.....	152
Ilustración d.....	152
Ilustración e.....	153
Ilustración f.....	153
Ilustración g.....	153

## 1.2 ABREVIATURAS

**AAV:** Alta Abundancia del Vector

**ACP:** Análisis de Componentes Principales

**ADEE:** Abundancia a Diferentes Escalas Espaciales

**ADN:** Ácido Desoxirribonucleico

**ADNk:** ADN del kinetoplasto

**AMV:** Abundancia Moderada del Vector

**ARN:** Ácido Ribonucleico

**ASV:** Área Sin Vector

**CENDIE:** Centro Nacional de Diagnóstico e Investigación en Endemo-epidemias

**CDC:** Centro para el control y prevención de enfermedades

**CIOMS:** Organización Internacionales de las Ciencias Médicas

**DDT:** Dicloro Difenil Tricloroetano

**DTT:** Dithiothreitol

**DMSO:** Dimetil-Sulfóxido.

**dNTP:** dinucleótidos trifosfato

**ELISA:** ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas

**fg:** femtogramos.

**GB:** muestras de glóbulos blancos

**H:** Hisopados

**HCl:** Ácido clorhídrico

**IFI /IFAT:** Inmunofluorescencia Indirecta/ prueba de inmunofluorescencia indirecta

**IMUSA:** Instituto Municipal de Sanidad Animal

**ISOPS:** Simposio internacional de flebotomos

**ITS-1:** Regiones espaciadoras transcritas

**LaBiMap:** Laboratorio de Biología Molecular Aplicada

**LC:** Leishmaniasis Cutánea.

**LM:** Leishmaniasis Mucocutánea.

**LTD:** Límite de detección Teórica

**LV:** Leishmaniasis Visceral.

**LVC:** Leishmaniasis Visceral Canina

**MgCl<sub>2</sub>:** Cloruro de Magnesio

**MO:** Microscopio óptico

**ml:** mililitros.

**MLEE:** Tipificación por electroforesis de enzimas multilocus

**mM:** milimolar

**ng:** nanogramo

**OMS:** Organización Mundial de la Salud

**OPS:** Organización Panamericana de la Salud

**pb:** Pares de bases.

**PCR:** Reacción en Cadena de la Polimerasa

**RFLP:** Polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción

**µg:** microgramos.

**µl:** microlitros.

**uM:** Micromolar

**UV:** Ultra violeta.

## 1.3 RESUMEN

La leishmaniasis es una enfermedad parasítico-infecciosa causada por protozoos del género *Leishmania* que se transmiten a través de la picadura de dípteros hembras pertenecientes a la subfamilia *Phlebotominae*; en Argentina la Leishmaniasis Cutánea es endémica en el norte del país mientras que el escenario de transmisión de Leishmaniasis Visceral se encuentra en expansión. Este trabajo tiene por objeto optimizar metodologías de biología molecular para la caracterización de las especies de parásitos intervinientes en la LC y LV en la provincia de Misiones, demostrar su factibilidad operacional e integración con estudios eco-epidemiológicos en terreno, y generar a su vez resultados preliminares que contribuyan al conocimiento y desarrollo de medidas de control locales. Se adaptaron protocolos de extracción de ADN a partir de diferentes muestras biológicas (sangre, tejidos, fluidos, vectores) y se optimizaron protocolos de amplificación de diferentes blancos genómicos (ITS-1 y Mini-exón), para detección/tipificación de especies de *Leishmania* por 2 protocolos de PCR-RFLP y secuenciación. Se llevaron a cabo capturas de *Phlebotominae* con trampas de luz y adaptador multi-muestreo para actividad horaria. Se establecieron pretratamientos, concentraciones/tiempo de digestión por proteinasa k y volúmenes de diluciones post-extracción para las diferentes muestras; el protocolo con mayor sensibilidad teórica de detección fue el de ITS-1. En muestras clínicas de LC se tipificó la especie *L.(V.) braziliensis* mientras que en lotes de *Lutzomyia longipalpis* y casos de Leishmaniasis Visceral Canina se tipificó *L.(L.) infantum* con una concordancia entre protocolos de PCR muy buena en muestras clínicas y buena en vectores y casos LVC. Los análisis de infección por *Leishmania* en *Lu. longipalpis* provenientes de áreas de Alta Abundancia del Vector y Áreas Sin Vector resultaron negativos; a partir de los canes de dichas áreas se tipificó *L. (L.) infantum* con concordancia muy buena de protocolos con blanco en ITS-1 y Mini-exón para muestras de ganglio y pobre en hisopados de conjuntiva (ITS-1 detectó más positivos), no encontrándose diferencias entre porcentajes de canes positivos de dichas áreas. El protocolo de ITS-1 sobre muestras de hisopados de conjuntiva detectó más porcentaje de positivos que el análisis serológico por rk39 y que el de Mini-exón. La probabilidad de que una muestra sea positiva por rk39 aumenta con la edad no observándose asociación entre edad canina e infección detectados por PCR. En relación con los datos eco-epidemiológicos la dinámica de *Lu. longipalpis* mostró un patrón bi-modal anual y una asociación entre su abundancia en ámbito urbano con la temperatura máxima promedio mensual correspondiente al mes de captura como así también a 30 y 60 días previos a la captura. Las hembras se presentan de 17:00 hs a 23:00 hs disminuyendo su abundancia hasta casi desaparecer después de las 3:00 hs; los machos mostraron actividad hasta el último periodo horario; no se observó diferencia significativa entre el número de machos y hembras registrados después de las 03:00. Sin embargo, se observó diferencia significativa entre la abundancia promedio de machos y hembras que ingresaron a la trampa por periodos en febrero y abril. La abundancia de hembras se correlacionó positivamente con la temperatura y negativamente con humedad relativa en febrero y marzo. La capacidad de tipificación de *Leishmania* sp. en las especies de *Phlebotominae* incriminadas como vectores y asociadas a la transmisión en la provincia, como así también su abundancia estacional y actividad horaria, ofrecen una línea de base para el diseño de protocolos de prevención-investigación de estrategias de control. Estos resultados obtenidos a partir de un esfuerzo de captura limitado por razones éticas en el momento de aparición del primer brote urbano de LV en el país, siendo una patología sin estrategia de control efectiva comprobada, necesitarán confirmación posterior mediante capturas con mayores réplicas de sitios/días. Sin embargo, la descripción preliminar de estas tendencias se consideró necesaria, ya que no se contaba con datos previos, y el escenario epidemiológico requirió generar protocolos de investigación operativa para tener antecedentes que permitiesen analizar indicadores y factores de riesgo, como herramientas para estimar tasa de infección, y las variables climáticas y horarias asociadas a la abundancia peridoméstica del vector.

## 2 INTRODUCCIÓN

La leishmaniasis es una enfermedad parasítico-infecciosa causada por protozoos del género *Leishmania* que se transmite a través de la picadura de dípteros hembras pertenecientes a la sub-familia *Phlebotominae*; esta enfermedad se da en forma zoonótica en América desarrollando en el humano un conjunto de síndromes clínicos que pueden comprometer la piel causando Leishmaniasis Cutánea (LC), las mucosas provocando Leishmaniasis Mucocutánea (LM) y las vísceras siendo entonces conocida como Leishmaniasis Visceral (LV). El desenlace hacia las diferentes formas clínicas depende principalmente de la especie parasitaria de *Leishmania*, asociado a la respuesta inmune del hospedador vertebrado (WHO 2010).

La LC es causada por varias especies del género *Leishmania* que se distribuyen en áreas geográficas diferentes y escenarios epidemiológicos según la especie parasitaria involucrada. Sus presentaciones clínicas pueden ser diferentes dependiendo de la especie de *Leishmania* interviniente y de la relación entre el parásito con su hospedador; la LC localizada (simple o múltiple) consiste en la aparición en la piel de una o más pápulas que se agrandan y transforman en úlceras indoloras. La lesión ulcerada se caracteriza por bordes elevados con fondo granuloso con o sin un exudado; según el agente etiológico, estas heridas se curan espontáneamente o requieren de tratamiento. Otras formas clínicas de leishmaniasis cutánea son difusa, diseminada y atípica (Roberts et al. 2000; PNL. Ministerio de Salud Pública de la Nación. 2004; WHO 2010).

La leishmaniasis mucocutánea (LM), afecta principalmente la mucosa oronasofaríngea. Es una secuela de la leishmaniasis cutánea causada por parásitos del subgénero *Viannia* asociada en la mayoría de los casos en América a *Leishmania braziliensis*. Se genera por contigüidad cutánea o por metástasis de lesiones cutáneas. Su aparición es concomitante con la úlcera primaria o puede ocurrir varios meses o años luego de la cicatrización de la misma. Aparentemente, ciertos factores como retraso en la cicatrización de la lesión primaria de la LC o un tratamiento inicial inadecuado podrían estar asociados con la evolución hacia la LM (Roberts et al. 2000; PNL. Ministerio de Salud Pública de la Nación. 2004; WHO 2010).

Varias especies de mamíferos pertenecientes a diferentes órdenes como roedores, edentados, marsupiales, carnívoros, murciélagos y primates no humanos han sido descritas como reservorios potenciales de las especies causantes de LC y LM en distintos países americanos, aunque todavía no puede determinarse si se trataría de un reservorio específico o de un “sistema de reservorios” y qué relación habría en cada caso (Haydon et al. 2002; Ready 2008; Roque & Jansen 2014).

La leishmaniasis visceral (LV) se caracteriza principalmente por fiebre de larga duración con comienzo agudo o progresivo y hepatoesplenomegalia; también se puede presentar linfadenopatía, anemia, leucopenia, trombocitopenia, anorexia, pérdida de peso, caquexia y debilidad progresiva. Es la forma más grave de leishmaniasis en donde la falta de tratamiento conlleva a la muerte. El agente etiológico en América es *Leishmania (L.) infantum*, mientras que el perro doméstico (*Canis familiaris*) es el principal reservorio urbano, aunque también están implicados en mantener y propagar la zoonosis varias especies de animales salvajes (PAHO/WHO & SOPERJ 2008; WHO 2010). Los canes con leishmaniasis visceral canina (LVC) pueden presentar una amplia gama de perfiles clínicos, desde aparentemente sano hasta críticamente enfermo, dependiendo del equilibrio entre las respuestas humorales y celular; se sugiere entonces que estos animales podrían ser clasificados como: asintomáticos, sin signos clínicos de la infección por *Leishmania*; oligosintomáticos, presentando linfadenopatía, pérdida de peso ligero y/o alopecia; o sintomáticos, mostrando todas o algunas de los graves signos de la enfermedad, incluyendo lesiones cutáneas, onicogriposis, queratoconjuntivitis y rigidez de las extremidades traseras (Reithinger et al. 2002; da Costa-Val et al. 2007; Dantas-Torres 2009; Solano-Gallego et al. 2011).

## 2.1 AGENTE ETIOLÓGICO

Los protozoos del género *Leishmania* pertenecen al orden *Kinetoplastida* y a la familia *Trypanosomatidae* (Alvar Ezquerro 2001; Gontijo 2003).

Es un protozoo dimórfico que en el tubo digestivo del vector adopta la forma libre flagelada o promastigote, mientras que en el mamífero la forma característica observada es el amastigote. La morfología del promastigote varía de acuerdo al estadio de desarrollo del mismo. Después de ingresar al vector, se genera una elongación

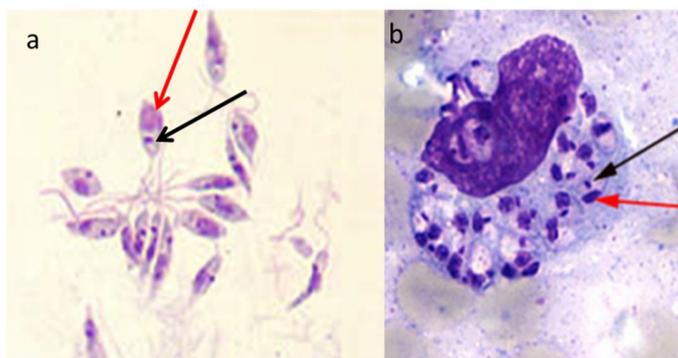


Ilustración 1: Visualización al MO de *Leishmania*

a) Promastigotes; b) Amastigotes en macrófagos flecha roja: núcleo, flecha negra: kinetoplasto.  
Fuente: <http://www.cdc.gov/dpdx/>. MO: Microscopio Óptico.

progresiva del soma del parásito hasta alcanzar los 10-15  $\mu\text{m}$ , en donde emerge el flagelo desde la placa basal (Gull 2001; Lukes et al. 2002). Al cabo de unas horas, éste se vuelve funcional adquiriendo una longitud cercana a la del soma (Ilustración 1).

El amastigote, situado dentro de las células del sistema reticuloendotelial, presenta una forma oval con un tamaño de 2-4  $\mu\text{m}$  (Ilustración 1b). En todas las especies del género *Leishmania*, ambas formas se multiplican por fisión binaria y los caracteres morfológicos son marcadamente similares (Alvar Ezquerro 2001).

### 2.1.1 CLASIFICACIÓN

*Leishmania* es un protozoario de la familia *Trypanosomatidae*. Esta familia contiene 9 géneros diferentes (Ilustración 2). Las especies del género *Leishmania* se agrupan en 2 subgéneros, teniendo como criterio taxonómico el sitio de desarrollo del parásito dentro del vector. En el subgénero *Leishmania*, que agrupa a las especies del Viejo Mundo y en el Nuevo Mundo al complejo *mexicana* y a la especie *L. (L.) infantum* (syn.*chagasi*) del complejo *donovani*, los parásitos se localizan en el intestino medio de los flebótomos sin pasar la válvula pilórica. En el subgénero *Viannia*, que incluye la totalidad restante de especies del Nuevo Mundo, los parásitos se ubican en el intestino posterior a la altura del triángulo pilórico (Muskus & Marin Villa 2002).

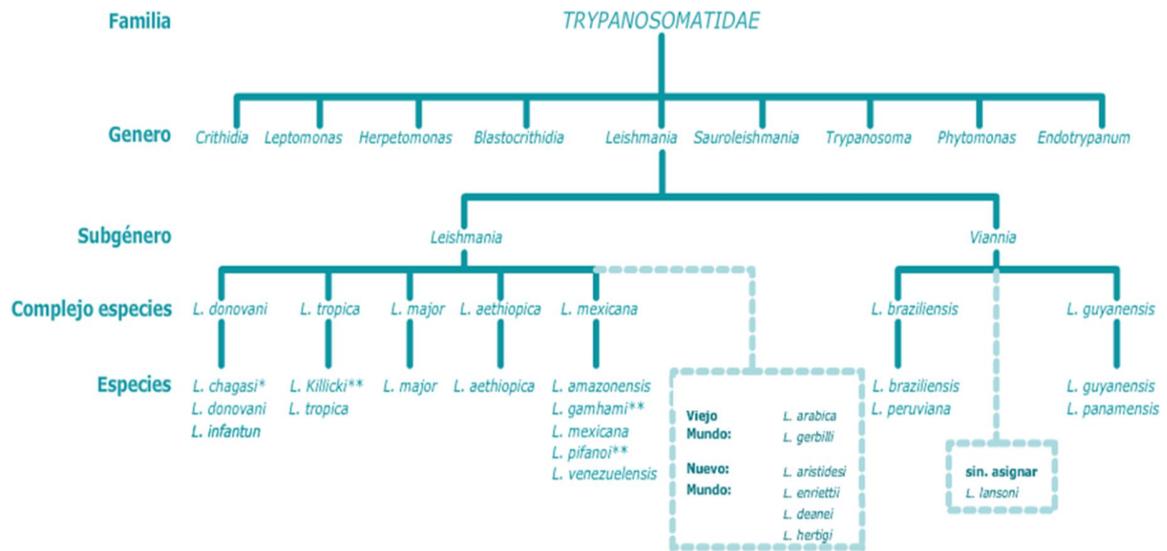


Ilustración 2: Taxonomía del género *Leishmania*

Fuente: WHO TRS 949,2010. (\*\*) Estatus de especies en discusión. (\*) En el nuevo mundo *L. chagasi* como se considera como misma especie que *L. infantum*. Línea punteada especies no patogénicas.

## 2.1.2 ORGANIZACIÓN GENÓMICA

Todos los protozoos del orden kinetoplástida presentan ADN genómico circunscripto en el núcleo celular, las leishmanias del viejo mundo presentan un número cromosómico de 36 pares, mientras que las especies del nuevo mundo tienen 34 y 35 pares cromosómicos dependiendo del complejo. Además *Leishmania* presenta ADN extracromosómico localizado en la mitocondria o kinetoplasto de la base del flagelo. La organización estructural del ADN kinetoplástico (ADNk) consiste en una red de miles de círculos de ADN concatenados que pueden ser de 2 tipos, maxicírculos y minicírculos. Los primeros se encuentran presentes en número de 20 a 50 copias, mientras que los segundos se presentan en un número cercano a las 10.000 copias por parásito (Peacock et al. 2007).

Cada *Leishmania* posee una masa total de ADN que se encuentra en el rango de 100 a 300 femtogramos aproximadamente (Myler & Stuart 2000; Gontijo 2003; Ranasinghe et al. 2008; Quaresma et al. 2009).

## 2.2 EL VECTOR

Aunque hay mucha diferencia entre especies, se presentarán aquí las generalidades de *Phlebotominae*. Son insectos pequeños (2-3 mm), su cuerpo se encuentra cubierto por una pilosidad densa, la cabeza y el abdomen forman un ángulo de 90° lo que les da un aspecto jorobado; las alas son lanceoladas, angostas y erectas en forma de V cuando están en reposo (Alvar Ezquerro 2001; Salomón 2005).

Su ciclo de vida es holometábolo e incluye la fase de huevo, 4 estadios larvales, pupa y adulto (Ilustración 3). Los huevos son depositados de manera aislada o en pequeños grupos sobre el suelo húmedo y rico en materia orgánica, inicialmente son de color blanco o gris claro aunque viran a marrón oscuro o negro dentro de las primeras horas de la oviposición; la etapa larval comprende 4 estadios detritívoros, durante los cuales es móvil pero con vagilidad limitada, morfológicamente se caracterizan por sus cápsulas cefálicas con aparato bucal masticador, pequeñas antenas y porque presentan setas largas en su región caudal;

las pupas tienen el cuerpo dividido en cefalotórax y abdomen, un esbozo de las alas en formación y la exuvia de la última etapa larval adherida al extremo posterior, una vez cumplimentado este estado alcanza finalmente el estado adulto (Alvar Ezquerro 2001; Salomón 2005; Maroli et al. 2013).

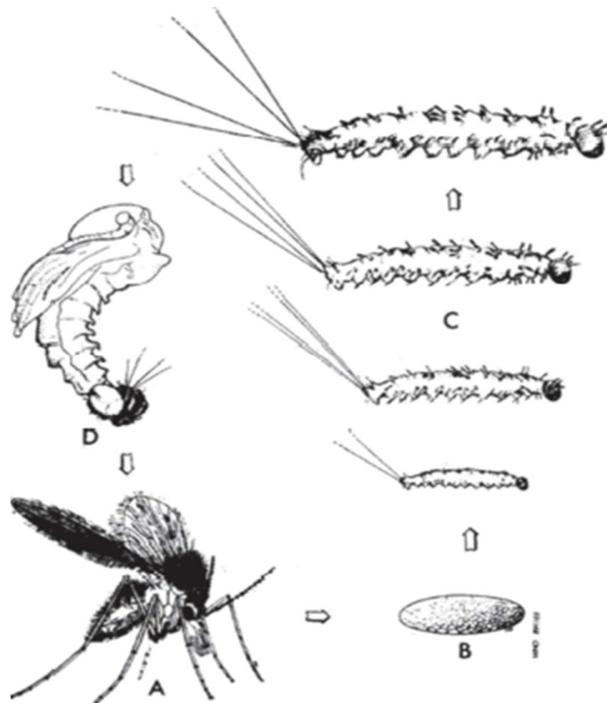


Ilustración 3: Ciclo biológico de *Phlebotominae*

A: adulto, B: huevo, C: estadios larvales y D: pupa.  
Fuente: WHO 2010.

El primer estadio larval emerge en 12-19 días aproximadamente posteriores a la oviposición, las pupas emergen a los 25-29 y los adultos en 35-39 días (Volf & Volfova 2011; Maroli et al. 2013). El ciclo de desarrollo precisa, para ser completado, de un lapso de tiempo de unos 40 días aunque algunas especies extienden este periodo bajo condiciones ambientales adversas como el invierno (diapausa) que ocurre frecuentemente en la fase de huevo o cuarto estadio larval (Salomón 2005; Ready 2013).

Los ejemplares adultos machos y hembras (Ilustración A y B) se alimentan de jugos vegetales, mientras que las hembras son también hematófagas debido a la necesidad fisiológica requerida para la oviposición. La ingesta de sangre se realiza en los primeros días de vida adulta. Entre los 3 a 10 días después de haberse alimentado colocan unos 40 huevos en promedio, pero en algunos casos el número puede ascender a 110 unidades por ovipostura (Maroli et al. 2013). El ciclo gonotrófico (tiempo que transcurre entre la ingesta de sangre y la puesta de huevos) se realiza 3 o 4 veces durante la vida de un adulto cuya duración es en promedio cuatro semanas (Alvar Ezquerro 2001).

Por lo general el área de dispersión de muchas especies cubre zonas con vegetación elevada y densa caracterizadas por un alto grado de humedad, aunque algunas pueden estar presentes en zonas con una



Ilustración 4: Flebótomos adultos

Hembra (a) y macho (b) de *Lutzomyia migonei*. Fuente: Dantas Torres et al.2009.

importante intervención antrópica, tanto en el ambiente peridoméstico, como con hábitos endofágicos y endofílicos. Son insectos voladores de naturaleza débil; en cada etapa de vuelo cubren distancias cortas, de manera que su radio de dispersión no sobrepasa los 200 metros por día. La actividad de los adultos es más intensa durante el período matutino y vespertino, pero en días nublados ésta puede ocurrir durante todo el día (Salomón 2005; Maroli et al. 2013). Los machos atraen a las hembras a través de feromonas y de la

vibración de sus alas ocurriendo la cópula cerca o sobre los animales vertebrados fuente de la ingesta sanguínea. Los sitios de reposo son usualmente los mismos donde se desarrollaron los estadios inmaduros y consisten en microhábitats oscuros y húmedos como madrigueras de animales o plantas epífitas (Ready 2013).

---

### 2.2.1 CLASIFICACIÓN

Reino: Animalia

Phyllum: Artrópoda

Clase: Insecta

Orden: Díptera

Suborden: Nematocera

Familia: Psychodidae

Subfamilia: Phlebotominae

En América las más de 500 especies de flebótomos descritas fueron clasificadas por Lewis (Lewis et al. 1977) en 3 géneros: *Warileya*, *Brumptomyia* y *Lutzomyia*, 15 subgéneros y 6 grupos o complejos de especies; posteriormente esta clasificación fue revisada por Young & Duncan (Young & Duncan 1994). Una de las revisiones más recientes y aceptadas es la de Galati, que reconoce 508 especies, agrupadas en 23 géneros, 20 subgéneros, 3 grupos de especies y 28 series, nomenclatura que será la utilizada en este texto (Galati 2003). De estas 500 especies, en América poco más de 50 son consideradas vectores o sospechadas de estar involucradas en la transmisión de las diferentes especies de *Leishmania* de la región (OPS/OMS 2013).

En Argentina se describieron 28 especies de flebótomos (Quintana et al. 2012) de las cuales se destacan con capacidad vectorial: *Lutzomyia longipalpis* (vector de LV) (Salomón et al. 2008 a; Acardi et al. 2010), *Mygonemyia migonei* (vector de LC y potencial de LV) (Salomón et al. 2010), *Nyssomyia neivai* y *Nyssomyia whitmani* (vectores de LC) (Salomón et al. 2008 b; Salomón et al. 2011; Maroli et al. 2013) y flebótomos miembros del complejo *cortelezzi* como probables vectores de LC en el NO argentino (Rosa et al. 2012).

---

### 2.2.2 CICLO DE TRANSMISIÓN

Los parásitos presentan un ciclo de vida heteroxénico, en el cual alternan entre hospedadores vertebrados e insectos vectores (Ilustración 5). En el ciclo zoonótico, los parásitos se transmiten a través de la picadura de flebótomos hembras quienes se infectan primariamente al succionar sangre de un reservorio vertebrado no humano iniciando el ciclo, los amastigotes ingeridos son entonces liberados en el intestino del vector en donde se diferencian a formas flageladas proceso que se denomina *metaciclologénesis* (Ilustración 5, 1-4) su finalidad es permitir la generación de un estadio replicativo y altamente infeccioso el promastigote metacíclico, con la facultad de generar a su vez formas con capacidad de supervivencia en el hospedador vertebrado en donde estará sujeto a los ataques por parte del sistema inmunitario (Muskus & Marin Villa 2002). La cadena de transmisión que incluye al hombre concluye cuando una hembra infectada se alimenta de sangre humana, permitiendo el ingreso de la forma promastigote (Ilustración 5, 5-9). Éstos son fagocitados por los macrófagos en donde sufren un cambio a la forma amastigote. El número de parásitos se incrementa por fisión binaria hasta que los macrófagos se lisan mecánicamente liberando nuevos amastigotes que reinician la infección de los macrófagos (en un mamífero reservorio no humano estos parásitos pueden ser ingeridos por el vector reiniciando el ciclo) (Alvar Ezquerra 2001; Gontijo 2003; Kato et al. 2010).

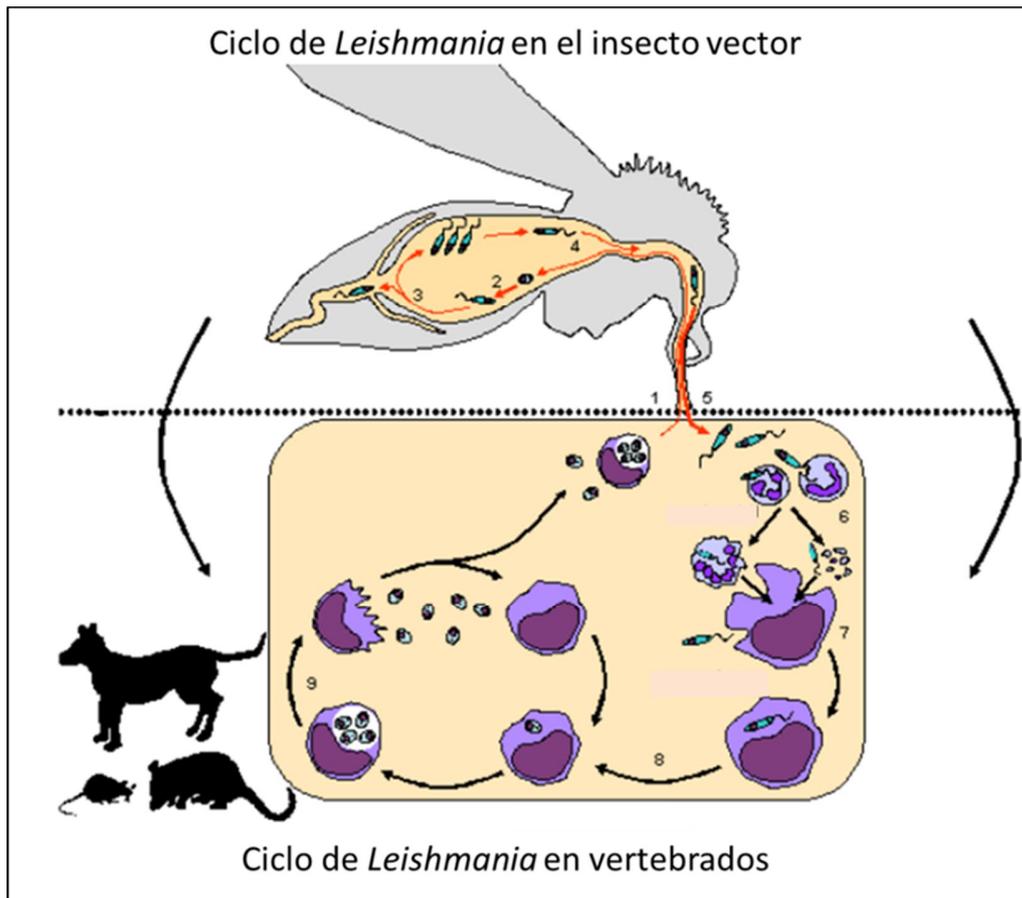


Ilustración 5: Ciclo de vida de *Leishmania*

1-4 metacicloogénesis en el vector; 5-9 multiplicación de *Leishmania* en vertebrados. Fuente: modificado de Kato et al. (2010).

### 2.2.3 CRITERIOS DE INCRIMINACIÓN VECTORIAL

Para ser considerada vector de especies de *Leishmania*, de riesgo para el ser humano, una especie de flebotomo debe cumplir con una serie de criterios: 1) debe ser antropofílica; 2) en ciclos zoonóticos debe picar al reservorio; 3) debe encontrarse en la naturaleza infectada con la misma especie de *Leishmania* que la encontrada en humanos, y esto debe ser confirmado por análisis de isoenzimas o ADN; 4) el vector debe soportar el desarrollo completo de *Leishmania* después de digerida la sangre que lo transporta; y 5) el vector debe ser capaz de transmitir el parásito a través de la picadura mientras se alimenta de sangre de hospedadores susceptibles (Killick-Kendrick 1999; WHO 2010). En muchas ocasiones estos criterios son difíciles de probar en su conjunto y diversos autores involucran vectores

de manera condicional en diferentes áreas, aunque con suficiente evidencia molecular y/o ecológica de su participación en el ciclo de transmisión de la leishmaniasis (Córdoba-Lanús et al. 2006; Salomón et al. 2008 a; Salomón et al. 2009 a).

El cumplimiento del quinto criterio (demostración de transmisibilidad de *Leishmania* a los huéspedes susceptibles) es difícil porque los flebótomos primero deben ser infectados “naturalmente” a través de la ingestión del estadio y número de parásitos apropiado y aquellos que sobreviven en condiciones de laboratorio después de la digestión de la sangre deben alimentarse de nuevo en un huésped susceptible. Considerando dichas dificultades, Maroli y col. proponen los siguientes requisitos mínimos para una robusta incriminación vectorial: (a) evidencia epidemiológica indicada por la superposición de las distribuciones geográficas del vector y la enfermedad humana; (b) evidencia de que el vector se alimenta de seres humanos y (c) pruebas de que el vector soporta infecciones intestinales naturales con promastigotes de la misma especie de *Leishmania* detectada en los seres humanos (Maroli et al. 2013).

Ready propone que se agreguen dos criterios más a los clásicos ya mencionados, uno que implique uso de datos retrospectivos y modelado matemático para demostrar que el vector es esencial para el mantenimiento de la transmisión, con o sin la participación de otros vectores, y el segundo hacer modelado matemático basado en un programa planificado de control para demostrar que la incidencia de la enfermedad disminuye significativamente después de una disminución significativa en la densidad de picaduras del vector específico. Así se demostraría que una especie es un vector importante mediante el modelado de su rol y la demostración del efecto directo de su control en la transmisión (Ready 2013).

---

#### 2.2.4 ESCENARIOS ECO-EPIDEMIOLÓGICOS DE TRANSMISIÓN PARA LC Y LV Y FACTORES DETERMINANTES.

En América la transmisión de LC ocurre en ciclos zoonóticos en lugares con vegetación primaria donde el hombre es un huésped accidental o en sitios con vegetación residual cercana a las viviendas en zonas rurales y periurbanas con patrón epidemiológico endémico

o epidémico (Salomón et al. 2006). En este último escenario, la deforestación suele tener un rol importante, ya que aumenta el contacto efectivo hombre-vector en el frente de deforestación, o cejas de monte, a la vez que la alteración del ambiente produce cambios en las comunidades de vectores y/o reservorios (Azevedo et al. 2002; Salomón. et al. 2006; Quintana et al. 2010). La LC es una enfermedad que pasó de ser característica de personas que por su actividad tenían contacto con el ambiente selvático (por ejemplo trabajadores forestales) (Mastrangelo & Salomón 2010), a presentarse en brotes en diferentes escenarios afectando a diferentes grupos etarios y a ambos sexos, en proporciones variables de acuerdo al escenario de transmisión particular produciéndose así una “urbanización” o “domesticación” de la enfermedad (Mott et al. 1990; Leonardo & Rebelo 2004; Salomón et al. 2006; Shaw 2007).

De esta manera, los principales factores determinantes de la re-emergencia de esta enfermedad en América y el mundo son los procesos migratorios, la urbanización no planificada, la deforestación (con diferentes objetivos como construcción de rutas y caminos, minería y nuevos frentes agrícolas) y el cambio climático (Mott et al. 1990; Shaw 2007; Ready 2008).

En relación con la LV, originalmente la transmisión en América se caracterizaba por ocurrir en zonas rurales con episodios esporádicos asociados a la transmisión en el domicilio y peridomicilio. En las últimas décadas se ha observado en América del Sur un nuevo escenario de transmisión de la enfermedad, con un perfil urbano asociado a grandes ciudades (PAHO/WHO & SOPERJ 2008). Construcciones de ingeniería a gran escala, centros urbanos densamente poblados y aspectos de la ecología de *Lutzomyia longipalpis*, como hábitos alimentarios flexibles y fácil adaptación a condiciones domésticas, han jugado un papel preponderante en la urbanización de la LV (Correa Antonialli et al. 2007; Rangel 2008).

La tenencia de perros y otros animales domésticos dentro de la casa promovería la infección en humanos dado que son reservorios y atraen a *Lu. longipalpis* principalmente. La ubicación de gallineros cerca de la vivienda principal puede ser otro factor de riesgo

importante, ya que constituyen un importante sitio de alimentación y reposo para este vector, aumentando así el contacto de flebótomos con los perros y los seres humanos (Alexander et al. 2002; WHO 2010).

## 2.3 EPIDEMIOLOGÍA

Actualmente la leishmaniasis es endémica en los 5 continentes, se encuentra presente en 98 países con una incidencia anual de 1,5 millones de casos, de los cuales entre 0,7 a 1,2 millones corresponden a casos cutáneos y 0,2 a 0,4 millones a casos viscerales; se estima una mortalidad anual de 20.000 a 40.000 casos (Alvar et al. 2012; OPS/OMS 2013).

En América se reportan aproximadamente 70.000 casos de LC por año representando un 30% respecto de los casos reportados en el mundo (3% de los cuales corresponden a casos de LMC) y se encuentra presente desde el sur de Estados Unidos hasta el norte de Argentina, excluyendo a Chile y Uruguay (Ilustración 6) (Salomón 2010; Alvar et al. 2012).

Para LV se reportan 3700 casos al año los cuales representan un 7% respecto a los casos totales reportados mundialmente, encontrándose desde el Sur de Estados Unidos hasta el Norte de Argentina, siendo Brasil el país sudamericano donde se dan el 91,9% de los casos (Ilustración 7) (Alvar et al. 2012; Gould, et al. 2013; OPS/OMS 2013).

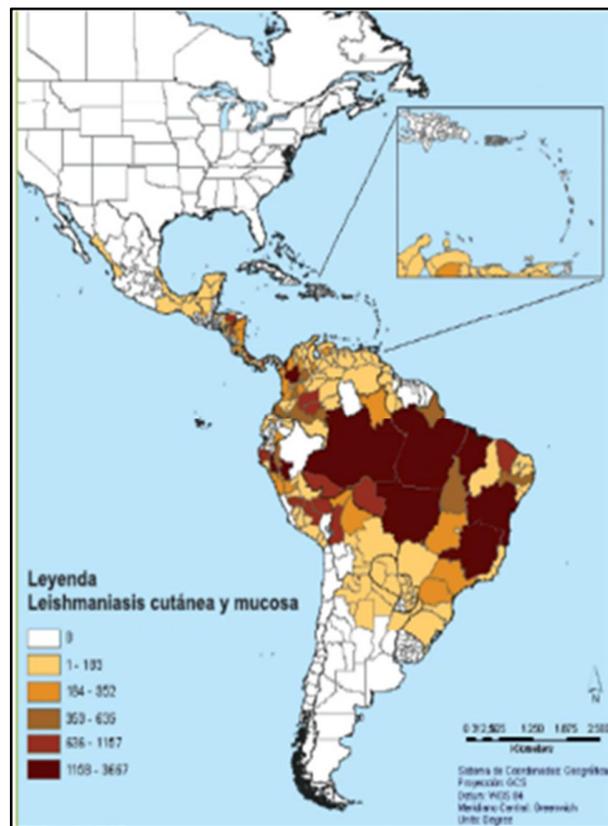


Ilustración 6: Distribución de casos de leishmaniasis cutánea y mucocutánea en América

Distribución por países y primer nivel administrativo subnacional. Fuente OPS/OMS 2013.

Recientemente se hallaron casos de LV canina y el vector de transmisión *Lutzomyia longipalpis* en Uruguay, encontrándose esta patología en expansión en dicho país (com. Pers. D. Willat; Badmasjian et al. 2015),

### 2.3.1 LC EN ARGENTINA

Los primeros casos autóctonos de LC registrados en Argentina datan de 1916; son endémicas las provincias de Salta, Jujuy, Tucumán, Chaco, Santiago del Estero, Formosa, Catamarca, Corrientes y Misiones (Sosa-Estani et al. 2001; Salomón 2002; Salomón et al. 2006). *Nyssomyia neivai* es la especie de vector más abundante en situación de brote con frecuencia acompañada por *Mygonomyia migonei* o *Nyssomyia whitmani* (Salomón et al. 2008 b).

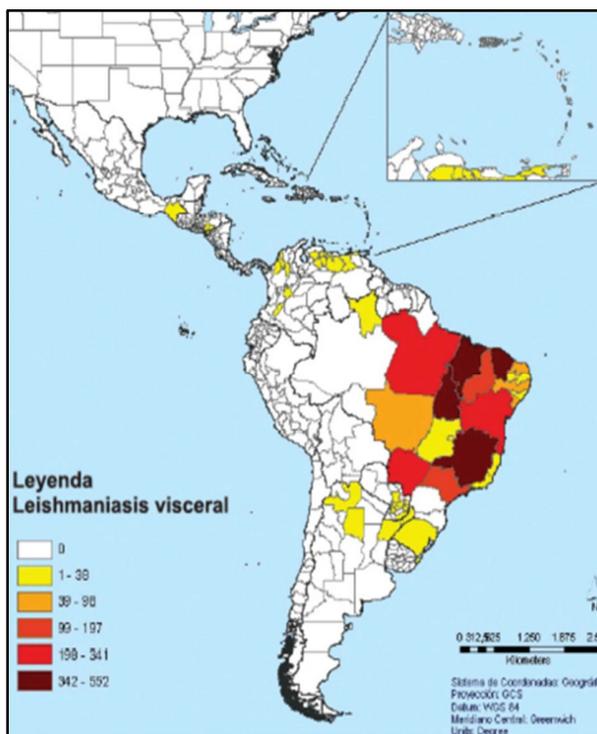


Ilustración 7: Distribución de casos de leishmaniasis visceral en América

Distribución por países y primer nivel administrativo subnacional. Fuente: OPS, OMS 2013

La especie de parásito asociado con mayor frecuencia en Argentina a casos humanos y caninos de LC es *Leishmania (Viannia) braziliensis*, aunque también se ha tipificado *L. (Leishmania) amazonensis* y *L. (V.) guyanensis* (PNL. Ministerio de Salud Pública de la Nación. 2004; Marco et al. 2005; Cordoba Lanus et al. 2005; Salomón et al. 2008; Barrio et al. 2009).

#### 2.3.1.1 SITUACIÓN VECTORIAL Y ESCENARIO DE TRANSMISIÓN DE LC EN MISIONES

Para la provincia de Misiones se destacan los brotes epidémicos que totalizaron 259 casos humanos ocurridos durante el período 1998-2005 en las localidades de Puerto Esperanza,

Puerto Iguazú e inmediaciones del lago artificial Urugua-í. Las especies de vector involucradas en los diferentes ciclos de transmisión fueron: *Nyssomyia neivai*, en ciclo silvestre con transmisión peridoméstica por alteración de parches de vegetación residual en el brote de Puerto Esperanza (Salomón et al. 2001 b) y *Nyssomyia whitmani* en los brotes de ciclo silvestre con transmisión en vegetación primaria o residual de 2004-2005 ocurridos en el área perimetral de la presa Urugua-í y en el área conocida como “dos mil hectáreas” (“2000 hectáreas”) de Puerto Iguazú (Salomón et al. 2006; Salomón et al. 2009 a).

En “2000 hectáreas”, la reciente deforestación con instalación inmediata de asentamientos humanos en granjas de subsistencia con animales domésticos, ha generado un incremento del contacto vector-humano, y podría conducir a la adaptación del vector a ambientes peridomesticiarios. En dicho escenario se han capturado, además de *Ny. whitmani* y *Mg. migonei*, hembras de otras especies como *Pintomyia pessoai*, *Micropygomyia quinquefer*, *Pintomyia fischeri*, *Psathyromyia shannoni*, *Psathyromyia misionensis*, *Mygonemya migonei*, *Pintomyia monticola*, *Nyssomyia neivai* y *Evandromyia cortelezii* (Salomón et al. 2009 a).

En el brote de 2004-2005 en Iguazú se detectó infección por *Leishmania* mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) en *Ny. whitmani* y *Micropygomyia quinquefer* (Salomón et al. 2009 a); en ninguno de estos brotes epidémicos se pudo determinar la especie de *Leishmania* responsable en los casos humanos, aunque la sintomatología de los pacientes coincidía con lo observado en otros brotes del país, por lo que se pudo inferir que el agente causante podría ser *Leishmania (V.) braziliensis* (Salomón et al. 2003). Durante 2006-2008 en un estudio llevado a cabo en Puerto Iguazú para estudiar la composición de la comunidad de flebótomos en granjas cercanas a selva primaria y secundaria en casas y chiqueros en “2000 hectáreas”, se confirmó que la especie *Ny. whitmani* es la especie dominante seguida en abundancia por *Mg. migonei* ambas especies se encuentra presentes todo el año (Fernández et al. 2012).

En estudios realizados posteriormente en el marco de dos tesis de grado<sup>1,2</sup> llevadas a cabo en el LaBiMap y en este trabajo de tesis se ha logrado tipificar por PCR-RFLP y confirmar por secuenciación *L. (V.) braziliensis* en muestras provenientes de casos humanos ocurridos en el período de 2005-2009 en las localidades del norte de la provincia de Misiones. La incidencia registrada para LC en Misiones en los últimos años fue de 22 casos en 2012, 15 en 2013 y 8 en 2014, no habiéndose registrado casos de LMC (Ministerio de Salud de la Nación 2014).

---

### 2.3.2 LV EN ARGENTINA

En la Argentina el escenario de transmisión de LV se encuentra en expansión. A partir de la tendencia en tiempo y espacio de la LV en Brasil y Paraguay, el Programa Nacional de Leishmaniasis generó en el año 2000 un alerta amarilla con vigilancia entomológica que detectó presencia de *Lu. longipalpis* en el año 2004 dando lugar a una alerta naranja (Salomón & Orellano 2005). El primer caso humano autóctono se confirmó en el año 2006, en la ciudad de Posadas, Misiones (Salomón et al. 2008 a). A partir de ese momento el vector se dispersó a cuatro provincias del noreste y Uruguay, con casos en Misiones, Corrientes y Santiago del Estero (debido posiblemente a *Mg. migonei*) (Salomón et al. 2009 b; Salomón 2010; Salomón et al. 2010; Santini et al. 2010; Salomón et al. 2011).

En el año 2012 se notificaron casos de LV humana autóctonos en la provincia de Salta (Barrio et al. 2012; Gould et al. 2013), y se registró *Lu. longipalpis* en la ciudad de Tartagal al ubicada al noroeste de la mencionada provincia, próxima a la frontera con Bolivia (Bravo et al. 2013). Por otra parte, hay presencia de LV canina en todo el país por migración, tránsito y tráfico de mascotas (Salomón 2010).

---

<sup>1</sup> Amplificación del ADN kinetoplasto de *Leishmania sp.* como herramienta para la detección del parásito en muestras clínicas y vector; Lic. Soraya Alejandra Acardi, 2006.

<sup>2</sup> Identificación por PCR-RFLP de la especie causante de la Leishmaniasis Cutánea en el Norte de la Provincia de Misiones; Lic. Maria Cecilia Monzani, 2010.

En Argentina desde el primer caso humano hasta 2012 se registraron 114 casos humanos con una letalidad del 10,5% (0-15 años 8,3%, > 60 años 33,3%). La incidencia es estable (16-24 casos/año) involucrando cada año a más localidades con menor número de casos por localidad, incluyendo en esta tendencia a las ciudades con mayor casuística histórica (Gould et al. 2013; OPS/OMS 2013).

---

#### 2.3.2.1 SITUACIÓN VECTORIAL Y ESCENARIO DE TRANSMISIÓN DE LV EN MISIONES

En el 2001 se registró la presencia de *Lu. longipalpis* en la localidad de Candelaria, Misiones, por segunda vez después de 50 años (Salomón et al. 2001 a). El primer caso autóctono de LV humana se confirmó en junio de 2006 en la ciudad de Posadas, con captura de *Lu. longipalpis* en peridomicilio, seguido por la confirmación de casos de LVC (Salomón et al. 2008 a; Cruz et al. 2010).

En 2007 se realizó en la ciudad un estudio de abundancia del vector, observándose presencia en toda Posadas, con una distribución espacial heterogénea y concentrada en “áreas de alta abundancia” ( $\geq 60$  flebótomos por trampa) en el centro más densamente poblado de la ciudad, pero también con parches de abundante cobertura arbórea y servicios urbanos deficientes (agua potable, recolección de basura y alumbrado público) (Fernández et al. 2010).

El escenario encontrado en Posadas es similar a lo observado en el brote de la ciudad de Santo Tomé, Corrientes, y en otras ciudades de América como Campo Grande en el estado de Mato Grosso do Sul, Brasil, y en Asunción, Paraguay (Cousiño 2006; Michalsky et al 2009 b; Salomón et al. 2009; Salomón et al. 2011).

En 2009 se realizó un nuevo muestreo para estudiar la distribución espacial de abundancia del vector en la ciudad de Posadas, y luego compararla respecto de la obtenida en 2007 (41,5% de los peridomicilios); los autores observaron que *Lu. longipalpis* se registró en el 31,0% de los peridomicilios muestreados, y que las abundancia en la mayoría de los sitios

de captura fueron inferiores a 30 individuos de *Lu. longipalpis*, aunque para los sitios que exhibieron entre 30 y 60 o más de 60 *Lu. longipalpis*, las áreas aumentaron en tamaño y número en 2009 respecto a lo encontrado en 2007 (Fernández et al. 2013).

También durante 2009 Santini y col. describieron la variabilidad en abundancia de *Lu. longipalpis* a dos niveles espaciales diferentes, mesoescala y microescala analizando su relación con diferentes variables ambientales obteniendo en microescala que las viviendas de áreas de alta abundancia del vector presentan mayor número de macetas, mayor distancia a cuerpos de agua y mayor número de especies de árboles; en el análisis a mesoescala si bien los autores observaron que en áreas de baja abundancia del vector hay más calles de tierra y en las de alta abundancia de vector es mayor la proporción de canes seropositivos no se obtuvieron resultados concluyentes (Santini et al. 2012). Por medio de análisis moleculares se logró detectar e identificar ADN de *L. (L.) infantum* a partir de muestras de *Lu. longipalpis* y canes de la ciudad de Posadas (Acardi et al. 2010).

En 2011 se registró la colonización exitosa de *Lu. longipalpis* en algunos sectores de la ciudad de Puerto Iguazú, con abundancia moderada en las trampas donde además había registrados casos caninos autóctonos (Santini et al. 2013), mientras que en el año 2014 ocurrieron dos casos de LV humana en Puerto Iguazú (com. per. Dr. Daniel Salomón).

Finalmente, Misiones es la provincia de mayor casuística de LV con un total de 80 casos humanos en 15 localidades, registrando desde mayo 2006 a julio de 2012 el 80% de los casos del país en ese período, siendo Posadas con 44 casos, la ciudad con más casos del país especialmente asociados a los primeros años de aparición de la enfermedad. La tendencia actual es de aparente disminución en la transmisión en Posadas y Oberá, donde se realizan acciones de control vectorial y sobre reservorio canino con 7 casos humanos confirmados durante 2014 y 4 durante 2015 (Gould et al. 2013; Ministerio de salud de la Nación, 2015).

## 2.4 DIAGNÓSTICO CLÍNICO

### 2.4.1 LC Y LV EN HUMANOS

El diagnóstico de leishmaniasis se realiza según distintos criterios clínicos y epidemiológicos basándose en diagnóstico directo y confirmatorio, parasitológico, o indirecto, inmunológico.

#### 2.4.1.1 MÉTODOS INMUNOLÓGICOS O INDIRECTOS

Los métodos de diagnóstico inmunológicos se basan en la detección de una respuesta inmune específica, celular o humoral, que se desarrolla como consecuencia de la infección. La intradermoreacción de Montenegro es utilizada en el diagnóstico de LC (inoculación subcutánea del antígeno Leishmanina) siendo indicativo de contacto con el parásito el desarrollo de una pápula (induración mayor de 5 mm de diámetro). Es de utilidad en estudios epidemiológicos pero por su baja sensibilidad y especificidad variables, así como no poder discriminar entre caso incidente y prevalente, tiene poco valor diagnóstico. Otros métodos inmunológicos son el de Inmunofluorescencia Indirecta (IFI) y el test inmunoenzimático ELISA (Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas) que expresan los niveles de anticuerpos circulantes aunque tienen muy baja especificidad y cruzan con infecciones por otros tripanosomatídeos (Alvar Ezquerro 2001; PNL Ministerio de Salud Pública de la Nación 2004).

Para LV son comúnmente utilizados IFAT (prueba de Inmunofluorescencia indirecta), ELISA o *western blotting*. Para uso en estudios de campo fueron desarrolladas específicamente dos pruebas serológicas con buena precisión diagnóstica en zonas endémicas, la prueba de aglutinación directa y la de inmunocromatografía basada en el antígeno rk39; esta última es fácil de realizar, rápida, económica y da resultados reproducibles utilizándose por lo tanto para el diagnóstico precoz, tanto a nivel central como periférico. Igualmente pruebas basadas en anticuerpos para diagnóstico de leishmaniasis visceral deben utilizarse siempre en combinación con una definición de caso clínico estandarizado (PAHO/WHO & SOPERJ 2008; WHO 2010).

Todas las pruebas serológicas presentan la limitación de que los anticuerpos específicos permanecen detectables hasta varios años después de la curación y que una proporción significativa de las personas sanas que viven en zonas endémicas, sin antecedentes de leishmaniasis visceral, son positivos para anticuerpos antileishmania debido a infecciones asintomáticas. Independientemente del tipo de leishmaniasis, la respuesta inmune puede implicar estar cursando o haber cursado la enfermedad (WHO 2010).

---

#### 2.4.1.2 MÉTODOS DIRECTOS O PARASITOLÓGICOS

Los métodos diagnósticos parasitológicos o directos implican demostrar la presencia de *Leishmania* en su forma de amastigotes o de promastigotes. Estos métodos constituyen la base fundamental del diagnóstico confirmatorio de la infección activa. Para LC comprenden el frotis, cultivo *in vitro*, preparados histológicos de lesión y varios métodos moleculares (PCR, *dot blot*, RFLP, secuenciación) (Baron et al. 2013; Ministerio de Salud de la Nación 2013).

El examen directo de frotis es un método confiable basado en la identificación de amastigotes y es operador dependiente pues depende de la experiencia de quien realiza el diagnóstico; se alcanza un 60-70% de sensibilidad en las formas cutáneas. Este método es el de elección para el diagnóstico de rutina por su bajo costo y mínimos requerimientos de infraestructura laboratorial. La desventaja del examen microscópico está dada por la incapacidad de identificar especies de *Leishmania* (PNL. Ministerio de Salud Pública de la Nación 2004) y la necesidad de contar con recursos humanos capacitados y una red de control de calidad diagnóstica.

El empleo de cultivos *in vitro* (medio Senekjie o medio NNN) o *in vivo* (inoculación en *hamster*) permiten un aumento de sensibilidad en el diagnóstico y el mantenimiento de cepas para su caracterización posterior. El inconveniente en su utilización radica en que los laboratorios de análisis clínicos carecen de la infraestructura necesaria para la realización de cultivo *in vivo* y que los cultivo *in vitro* son susceptibles a diferentes requerimientos de

cada parásito además de ser propensos a la contaminación por otros microorganismos (PNL. Ministerio de Salud Pública de la Nación 2004). El análisis histopatológico se considera un método diagnóstico directo cuando se realiza la observación de amastigotes de *Leishmania*; en muchas situaciones el método sólo permite determinar compatibilidad de proceso histopatológico infiltrativo, en el cual no se encuentran parásitos en la muestra; esto sumado a la naturaleza invasiva de la toma de muestra lo posiciona en desventaja respecto a los otros métodos de elección (PNL. Ministerio de Salud Pública de la Nación 2004).

Para LV humana el diagnóstico confirmatorio consiste en la visualización al Microscopio Óptico (MO) de amastigotes provenientes de Frotis de médula ósea, bazo, hígado, ganglio linfático; cultivo *in vitro*, preparados histológicos y PCR en muestras de tejidos (WHO 2010; Baron et al. 2013; Ministerio de Salud de la Nación 2013).

---

#### 2.4.1.3 DIAGNÓSTICO DIRECTO POR REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

La sensibilidad y especificidad de técnicas moleculares como la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) ofrece una alternativa valiosa para determinar la presencia del parásito en muestras clínicas tanto de leishmaniasis cutánea como visceral, presentándose además versátil en cuanto a los diferentes tipos de muestras a partir de las cuales pueda llevarse a cabo como raspado, biopsia, *imprint* de biopsias, o aspirado-lavado con jeringa en casos de LC (Oliva et al. 2006; WHO 2010), o bien diferentes tipos de muestra de sangre (periférica, capa enriquecida de glóbulos blancos), aspirados de médula ósea y ganglios linfáticos y biopsias de diferentes tejidos para LV (Cruz et al. 2006; WHO 2010).

También esta técnica ha permitido detectar e identificar especies de *Leishmania* a partir de varios protocolos diferentes teniendo como blanco tanto ADN cromosómico (microsatélites, secuencias teloméricas, gp63, hsp70, mini-exón,  $\beta$ -tubulina, o genes de ARNr) como ADN del Kinetoplasto (Marfurt et al. 2003; Botilde et al. 2006; Rotureau et al. 2006; Garcia et al. 2007; Decuyper et al. 2008; Fraga et al. 2012).

Para detección de *Leishmania* causantes de LC se han obtenido sensibilidades entre 80 a un 100 %, por ejemplo: 87,5 % obtenido con blanco en la SSR (Rotureau et al. 2006); 96,15 % reportado por Gomes y col. (Gomes et al. 2008), y del 100 % con blanco en el mini-exón (Marfurt et al. 2003); 98,7 % para kDNA y 91 % para SSU-ITS (Bensoussan et al. 2006). Para LV diferentes protocolos de PCR realizados a partir de diferentes tipos de muestras clínicas han obtenido 79%, 92,3% y 100% de sensibilidad (Cruz et al. 2006; Brustoloni et al. 2007; WHO 2010).

---

#### 2.4.2 LEISHMANIASIS VISCERAL CANINA (LVC)

El diagnóstico confirmatorio de LVC consiste en la visualización de la forma amastigote del parásito por microscopía óptica a partir de frotis de médula, bazo, hígado y ganglio linfático, cultivo, histopatología y PCR en muestras de diferentes tejidos (Ministerio de Salud de la Nación 2013).

Como ya se mencionó anteriormente, aunque la especificidad de género de la visualización al MO es elevada, su sensibilidad varía en función de la habilidad y entrenamiento del profesional que lo realiza. Por otra parte, por ser las especies morfológicamente indistinguibles al microscopio, no es factible la tipificación del parásito a través de este método (Manna et al. 2004; Dantas-Torres 2009; Solano-Gallego et al. 2011). El aporte de la Biología Molecular (PCR, RFLP, secuenciación) al diagnóstico de la LVC se basa en su alta sensibilidad, especificidad y en la factibilidad de su aplicación a diferentes tipos de muestras; además de los aspirados, punciones, biopsias y muestras de diferentes fracciones de la sangre se pueden utilizar hisopados de diferentes mucosas como ser: de conjuntiva, oral, nasal y de oído, menos invasivos para el animal. Esta posibilidad de utilizar muestras tan diversas hacen de esta metodología una herramienta valiosa y complementaria a los métodos tradicionales de diagnóstico (Reithinger et al. 2000; de Almeida Ferreira et al. 2008; Manna et al. 2008; Pilatti et al. 2009; Quaresma et al. 2009; Leite et al. 2010; Ferreira et al. 2013).

Los pruebas serológicas cualitativas (Test rápidos de aglutinación directa e inmunocromatografía rk 39) y cuantitativas (IFAT, ELISA), dada su alta sensibilidad y especificidad, son empleadas tanto para el análisis de casos individuales que presentan sintomatología compatible como para el tamizaje del parásito en estudios poblacionales que incluyen canes asintomáticos para LVC, presentando además ventajas durante su ejecución relacionadas a la rapidez y facilidad en su empleo (Reithinger et al. 2002; Moshfe et al. 2008; Martín-Sánchez et al. 2009; Cruz et al. 2010; Solano-Gallego et al. 2011).

Un caso canino confirmado por laboratorio es todo perro proveniente de área endémica con manifestaciones clínicas compatibles con la enfermedad que presente serología reactiva a través de tiras inmunocromatográficas rk39 o parasitología positiva. En cambio se considera como infectado asintomático a todo perro asintomático captado en estudios poblacionales en municipios con transmisión activa confirmada, o procedente de área endémica, con serología o parasitología positiva para leishmaniasis (Ministerio de Salud de la Nación 2013).

## 2.5 TIPIFICACIÓN DE *LEISHMANIA*

El análisis de referencia para tipificación de especies y cepas de *Leishmania*, desde un punto de vista taxonómico, es el análisis por Isoenzimas o MLEE (*Multilocus Enzyme Electrophoresis*) (WHO 2010, la técnica implica la separación de las isoenzimas por electroforesis en gel y posterior visualización de enzimas específicas utilizando reacciones de tinción apropiadas. Los aislamientos con patrones de bandas idénticas se denominan generalmente como zimodemas (*zymodeme*)(Cupolillo et al. 1998); la desventaja que presenta esta técnica es que estudia el genotipo indirectamente, dado que no son visualizadas las sustituciones nucleotídicas que no cambian la composición aminoacídica, cambios de aminoácidos que no alteran la movilidad electroforética, y las conversiones post traduccionales que modifican la movilidad electroforética (Lewin et al. 2002).

Entre las desventajas operativas de este método se encuentran que es laborioso, se realiza en pocos centros de referencia y utilizando únicamente cultivo de parásitos, teniendo en

cuenta que en estudios epidemiológicos se analizan diferentes tipos de muestras tomadas a campo, se vuelve difícil mantener condiciones de temperaturas requeridas y poder evitar contaminación de los mismos (El Tai et al. 2000; Botilde et al. 2006; Tashakori et al. 2006; WHO 2010). Para muchas especies de *Leishmania* (*Viannia*) el aislamiento exitoso y el mantenimiento del parásito en cultivo es difícil (da Silva et al. 2010). Por otra parte, en ocasiones no es lo suficientemente discriminativo para detectar diversidad genotípica de parásitos dado que varios genotipos diferentes pueden pertenecer a un mismo *zymodeme* (Cupolillo et al. 2003; Buitrago et al. 2011). En el caso particular de las cepas de *L. infantum* europeas, la mayoría pertenecen al *zymodeme* MON-1 aunque ellos provienen de diferentes hospedadores (humanos y canes) y diferentes ciclos de transmisión (antropo-zoonótico y zoonótico) (Botilde et al. 2006).

Probablemente técnicas moleculares reemplazarán la tipificación por isoenzimas en un futuro cercano. Estas técnicas tienen la ventaja de que se pueden aplicar directamente a las muestras biológicas, evitando la necesidad de realizar cultivo del parásito (WHO 2010). Los métodos basados en genes *housekeeping* permiten además identificar relaciones filogenéticas. La secuenciación, polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción o polimorfismo de conformación de cadena sencilla y más recientemente el análisis de secuencias multilocus (MLST) se utilizan para la identificación de los aislados individuales. Estas técnicas son aplicables para las investigaciones de variabilidad genética intraespecífica de cepas, para comparar los grupos genéticos con factores epidemiológicos relevantes en investigación de brotes, o para la incriminación de los reservorios y/o vectores en el ciclo de transmisión. La principal limitación de estas técnicas es la falta de estandarización entre laboratorios y que los resultados no se correlacionan totalmente con resultados obtenidos por isoenzimas (WHO 2010; Fraga et al. 2012, Marlow et al. 2014).

## 2.6 DETECCIÓN DE *LEISHMANIA* EN EL VECTOR

La detección y caracterización de las especies de *Leishmania* en el vector, constituyen una herramienta fundamental en la predicción del riesgo y expansión de la enfermedad en áreas

endémicas y alrededores (Salomón et al. 2006; Kato et al. 2010; WHO 2010). Por otra parte, uno de los criterios en la incriminación de una especie de flebótomo como vector de *Leishmania*, como ya se indicó, es la detección de infección natural y aislamiento de la misma especie de parásito encontrada en casos clínicos (Killick-Kendrick 1999; WHO 2010).

Tradicionalmente, la detección del parásito en el vector se realiza en forma directa por examen al microscopio de los especímenes o por cultivo (Santamaría et al. 2005; Kato et al. 2010; Bezerra-Vasconcelos et al. 2011). Con los insectos recién capturados se realiza un congelamiento progresivo de los mismos para mantener vivo al parásito, luego se procede con la disección del tracto digestivo de la hembra y búsqueda al microscopio (Kato et al. 2010); en caso de encontrar flagelados se inocula a un animal de prueba. Sin embargo, todas las especies de *Leishmania* son morfológicamente similares y con viscerotropismos no conclusivos, por lo que la identificación de la especie no es posible hacerla con certeza (Schönian et al. 2003). Este procedimiento posee factores limitantes como lo laborioso de la técnica y la dificultad en el procesamiento ya que se deben analizar un gran número de muestras para obtener información representativa a la tasa de infección, las cuales rondan entre 0,01-1%, lo que habla de su baja sensibilidad aun en aéreas endémicas (Santamaría et al. 2005; Salomón et al. 2006).

En los últimos años los métodos moleculares han sido utilizados para detectar infección natural de flebótomos con *Leishmania*, contribuyendo no sólo a la investigación epidemiológica sobre la leishmaniasis, sino también a estudios biológicos sobre las interacciones vector-parásito (PAHO/WHO & SOPERJ 2008; Kato et al. 2010; Maroli et al. 2013; Ready 2013). La PCR posee ventajas que otras técnicas hasta el momento no nos han proporcionado, como su capacidad de procesamiento, ya que nos permite analizar un gran número de muestras en simultáneo, con muy buena sensibilidad y especificidad, siendo en áreas endémicas una herramienta importante a la hora de evaluar qué especies de *Leishmania* infectan a qué especies de flebótomos (Aransay et al. 2000; Paiva et al. 2006; Reithinger & Dujardin 2007; Pita-Pereira et al. 2009; Acardi et al. 2010; Kato et al. 2010; Rosa et al. 2012).

En cuanto a los protocolos de PCR para la detección de infección o identificación de *Leishmania* a diferentes niveles taxonómicos (género, complejo y especies) han sido descritos hasta el momento como secuencias blanco ADN cromosómico de copia única, multicopia y ADN del Kinetoplasto como ya se mencionó en la sección 2.4.1.3 página 25 de esta Introducción.

La muestra de vector es de naturaleza compleja, la presencia de ciertos inhibidores (proteína del exoesqueleto del insecto, quelantes de magnesio, ADN del parásito, etc.), puede tener como consecuencia la amplificación escasa o nula y dar como resultado falsos negativos (Pita-Pereira et al. 2005; Promega 2011). Debido a esto se utilizó como control interno en muestras de *Phlebotominae* un protocolo descrito por Lins y col.<sup>3</sup>(Lins et al. 2002), el cual amplifica un gen denominado *cacophony*; éste codifica una subunidad  $\alpha$ -1 de un canal de calcio dependiente de voltaje involucrado en estímulo acústico durante el cortejo y funciona como un importante control de amplificación empleado en otros trabajos de análisis de infección vectorial (Peixoto et al. 2001; Bottecchia et al. 2004; Pita-Pereira et al. 2005; Pita-Pereira et al. 2008).

## 2.7 CONTROL

Al ser la leishmaniasis una zoonosis que depende del escenario de transmisión, parásitos, vectores, reservorios involucrados y con características ecoepidemiológicas tan diversas, no existe una única recomendación para el control de la misma. Las principales estrategias de control incluyen propuestas como la búsqueda de casos y tratamiento, el control vectorial y de los reservorios cuando es posible (Desjeux 2004).

---

<sup>3</sup> El protocolo fue puesto a punto en el marco de una tesis de grado llevada a cabo en el LaBiMAP. “Detección de *Leishmania* sp en *Phlebotominae*: Optimización de la PCR del gen *cacophony* (intrón IVS6) y su evaluación como control de inhibición de reacción”. Lic. Jesica Anabel Fraga, 2012.

---

### 2.7.1 CONTROL VECTORIAL

El objetivo del control vectorial es reducir o interrumpir la transmisión vectorial, habiendo disponibles varios tipos de control entre ellos el químico, de protección personal y de manejo ambiental, siendo una recomendación de OMS que se apliquen en conjunto para implementar así un manejo integrado de los vectores. La adecuación de los mismos va a depender del conocimiento de la epidemiología local sobre especies de flebótomos involucradas, si sus hábitos son peridoméstico o selváticos, rango de vuelo, preferencia de hospedadores a partir de los cuales alimentarse, sitios de reposo, ritmo circadianos y estacionalidad (WHO 2010).

Las medidas de control vectorial clásicas con insecticida como fumigación de interiores y peridomicilio o tratamiento de uniformes o telas mosquiteras, como así también técnicas más recientes de cebo azucarado con insecticidas e insecticidas sistémicos, se basan en el control de los adultos, ya que los sitios de cría de larvas son difíciles de identificar (Ready 2013). Sin embargo, muchas de estas medidas de control sólo sirven para áreas urbanas, y su efectividad varía dependiendo de características particulares de cada foco (Santini et al. 2010; Ready 2013; Bates et al. 2015). En áreas silvestres, han demostrado ser poco efectivas (Alexander & Maroli 2003; Maroli et al. 2013).

Las medidas de protección para personas expuestas, como el uso de repelente, ropa adecuada y evitar zonas de riesgo, son ampliamente recomendadas y efectivas, sin embargo cuando se señalan prescripciones de prevención, aunque sean sencillas, es necesario tener en cuenta las limitaciones de cada escenario socio-cultural para ser llevadas a la práctica (Programa Nacional de Leishmaniasis 2009; Mastrangelo & Salomón 2010).

En el caso de la LV, la principal medida de control del vector se basa en el ordenamiento del ambiente (alejamiento de sitios de cría o dormitorios de animales domésticos a más de 5 metros de los sitios de reposo de los seres humanos, remover la tierra con frecuencia para evitar el asentamiento de criaderos) (Programa Nacional de Leishmaniasis 2009; Santini et al. 2010).

En el último Simposio Internacional sobre flebótomos (ISOPS-VIII 2014 Pto. Iguazú, Argentina) se reconoció la necesidad de evaluar el impacto de medidas de control vectorial sobre los resultados clínicos, remarcando que la utilización de resultados entomológicos es informativa, pero las recomendaciones de salud pública sólo pueden basarse en los resultados derivados de estudios bien diseñados (ensayos controlados aleatorios) que evalúan los resultados clínicos en las personas (infección, la incidencia de la enfermedad). Por ejemplo, en India es ampliamente usada la fumigación intradomiciliaria con DDT para controlar *Phlebotomus (Euphlebotomus) argentipes* pero hay poca evidencia científica que soporte su eficacia en la reducción de la incidencia de leishmaniasis visceral. También se observó que, el uso de mosquiteros tratados con insecticida reducen la densidad de flebótomos en un 25%, pero no disminuyen significativamente el riesgo de infección por *L. donovani* o el desarrollo de enfermedad (Bates et al. 2015). Los expertos recomendaron también una colaboración entre entomólogos que trabajan en ciencia básica de flebótomos y quienes trabajan en desarrollo y evaluación de control lo que ayudaría a desarrollar herramientas de control más eficaces y una traducción de la investigación biológica básica en las estrategias de intervención innovadoras. Por otra parte, Ready destaca la importancia de diferenciar vectores de importancia biomédica, de las especies de flebótomos que son vectores competentes<sup>4</sup> pero que carecen de la capacidad vectorial. Finalmente, se remarcó la necesidad del modelado de la transmisión (Stauch et al. 2011; Stauch et al. 2014; Ready 2013) para identificar los vectores que son una prioridad de salud pública real y deben ser controlados en el marco del control integrado de la leishmaniasis (Bates et al. 2015).

---

## 2.7.2 CONTROL DE RESERVORIOS

El control del reservorio canino de leishmaniasis visceral es una tarea compleja, que debe adaptarse a cada situación local. La Organización Mundial de la Salud así como el Programa Nacional de Leishmaniasis recomiendan el sacrificio de los perros callejeros

---

<sup>4</sup> Estos son aquellos que a pesar de tener asociaciones ecológicas con los reservorios y cuya ecoepidemiología descriptiva sugeriría un papel potencial vectorial, tienen una tasa de inoculación entomológica (EIR) para una determinada especie de *Leishmania* que aún es demasiado baja para establecer un foco de la enfermedad

infectados<sup>5</sup> o caso confirmado de LVC<sup>6</sup> dado que la mitad de los perros infectados muestran síntomas de leishmaniasis pero una gran proporción de canes asintomáticos muestran ser infectivos para los flebótomos por xenodiagnóstico (Programa Nacional de Leishmaniasis 2009; WHO 2010; Laurenti et al. 2013).

Desde un punto de vista teórico la situación ideal sería que todos los perros sintomáticos o seropositivos sean eliminados tengan o no dueño; sin embargo, la detección y el sacrificio masivo de perros seropositivos no ha demostrado ser uniformemente eficaz en los programas de control y no es socialmente aceptable (Romero & Boelaert 2010; Salomón et al. 2012; Costa et al. 2013). La eficacia subóptima se ha atribuido a los retrasos entre el análisis serológico y el sacrificio, la baja sensibilidad de las pruebas serológicas para identificar los perros más infectantes y sobre todo, una cobertura solamente parcial de la población canina infectada (WHO 2010).

Se promueve entonces la tenencia responsable de mascotas con serología positiva sin síntomas y con análisis parasitológico negativo por medio de control regular con el médico veterinario. El uso de insecticidas tópicos con eficacia probada contra las picaduras de flebótomos (collares impregnados con permetrina o deltametrina) ha demostrado reducir la incidencia de leishmaniasis visceral en perros significativamente en Brasil, Italia y Túnez; sin embargo, no ha sido probado en campañas masivas y no puede ser aprobado como una alternativa para la interrupción de la transmisión (Programa Nacional de Leishmaniasis 2009; WHO 2010).

Finalmente, entre las recomendaciones de expertos producto de ISOPS VIII 2014 se destacó la necesidad de mejorar la comunicación entre quienes planifican medidas de control vectorial y las intervenciones veterinarias. Muchos de los recursos se han aplicado a

---

<sup>5</sup> Perro infectado: con serología o parasitología positiva en municipio con transmisión confirmada o procedente de área endémica sin síntomas de LVC.

<sup>6</sup> Confirmado por laboratorio: con manifestaciones clínicas compatibles con LV que presente serología o parasitología positiva. Confirmado por criterio epidemiológico y clínico: todo perro proveniente de áreas endémicas o donde esté ocurriendo un brote que presente cuadro clínico compatible con LV canina sin confirmación de laboratorio

interrumpir el ciclo doméstico de *L. infantum* en el sur de Europa y América Latina, pero todavía es necesario que haya una distinción más clara entre las medidas para la protección individual de los perros y las intervenciones para la protección de la comunidad y de las poblaciones de perros domésticos como reservorios de la leishmaniasis visceral humana (Bates et al. 2015).

## 2.8 JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

La OMS remarca el papel fundamental de identificar la especie del parásito/s en cada foco por sus implicancias en la comprensión epidemiológica, de control y tratamiento de las leishmaniasis, siendo que la identificación de rutina puede ser particularmente necesaria, por ejemplo, en la leishmaniasis cutánea del Nuevo Mundo que ocurre en focos con múltiples especies circulantes (WHO 2010). También menciona que fluctuaciones estacionales e interanuales en la incidencia son características principales de la epidemiología de leishmaniasis, y que si bien se debe a varios factores, el que predomina en la fluctuación de transmisión de leishmaniasis es el ciclo anual de flebótomos. Aunque los flebótomos están presentes durante todo el año en los climas tropicales, cada especie tiende a tener su propio ciclo anual (WHO 2010). Finalmente, destaca que el pico en la tasa de infección por *Leishmania* en vectores suele ocurrir cuando está presente el número máximo de hembras de *Phlebotominae* que ya hayan realizado la ovipostura. El pico en la tasa de transmisión es el producto de la abundancia del vector y la tasa de infección de vectores, así como el grado de contacto humano-vector. Estos ciclos anuales son importantes para la predicción de las estaciones de transmisión, para el diseño de las estrategias de control y el momento en que deberían ser aplicadas (WHO 2010).

Las manifestaciones de leishmaniasis presentes en Misiones constituyen problemáticas diferentes dado que son clínicamente distintas, son causadas por distintos agentes etiológicos y transmitidas por distintas especies de vectores (Salomon et al. 2001, 2006, 2008, 2009; Acardi 2010, Fernandez et al. 2012, 2013; Santini et al. 2010, 2012, 2013) incluso habiéndose encontrado presencia de vectores característicos de LC con *L.(L.)*

*infantum* (Moya et al. 2015). Los aportes de esta tesis surgen en este contexto como necesidad de desarrollar, adaptar y optimizar diferentes metodologías de biología molecular para la tipificación de cepas locales de *Leishmania*, aportar datos sobre la dinámica y actividad de *Lu. longipalpis* y así aplicar el conocimiento y la experiencia adquirida a la problemática en el país en general y en Misiones en particular.

Por lo antes expuesto esta tesis comenzó con la optimización de técnicas de extracción de ADN y protocolos de detección/tipificación del parásito, comparando sus sensibilidades y si existen diferencias cuando son aplicadas a diferentes muestras para poder aplicarlos a la búsqueda de infección en los distintos actores del ciclo de transmisión en la provincia de Misiones.

Como ejemplo de aplicación de las técnicas desarrolladas a la investigación eco-epidemiológicas de leishmaniasis, se estudió si existen diferencias en la tasa de infección en canes y flebótomos provenientes de áreas de alta abundancia del vector respecto de aquellos provenientes de áreas sin la presencia del mismo y la dinámica de *Lutzomyia longipalpis* en la ciudad de Posadas así como su actividad horaria.

Finalmente, se describen las tendencias preliminares encontradas que pueden servir para el diseño de estudios subsecuentes, que aporten para el diseño de estrategias de control adecuadas al escenario local.

### 3 HIPÓTESIS DE TRABAJO

- Si en la provincia de Misiones el agente causal de Leishmaniasis Cutánea es *Leishmania (Viannia) braziliensis* y el de la Leishmaniasis Visceral es *Leishmania (Leishmania) infantum* la identificación de estas especies de parásitos debería estar asociada a la eco-epidemiología observada de cada una de estas enfermedades.
- Si la tasa de infección por *Leishmania* sp. en vectores *Phlebotominae* y reservorios caninos está sujeta principalmente al mecanismo de transmisión vectorial de la enfermedad, en áreas de alta abundancia del vector (AAV) la misma debería ser mayor que en áreas de abundancia media (AMV) y sin captura de vector (ASV).
- Si la dinámica anual de *Lutzomyia longipalpis* en la ciudad de Posadas es dependiente de la temperatura y humedad relativa, la abundancia de la misma debería fluctuar durante los meses del año, y afectar el patrón de actividad horaria diferencial de machos y hembras adultos.

## 4 OBJETIVO GENERAL

Desarrollar métodos para la caracterización de la especie de parásito interviniente en la LT y LV en la provincia de Misiones a fin de contribuir al conocimiento e integración de estos métodos con estudios eco-epidemiológicos y generar resultados preliminares que contribuyan al desarrollo de medidas de control locales.

### 4.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Optimizar protocolos de Biología Molecular que permitan detectar y tipificar a especies del parásito *Leishmania* en la cadena de transmisión epidemiológica de la LT y LV en la provincia de Misiones.
2. Analizar la tasa de infección de vectores y reservorios caninos de “áreas de alta abundancia del vector” (AAV) y “áreas sin captura del vector” (ASV) de la ciudad de Posadas.
3. Explorar el uso de protocolos no invasivos de obtención de material biológico en casos de LVC locales mediante la evaluación preliminar de su sensibilidad y especificidad.
4. Describir la abundancia de *Lutzomyia longipalpis* en el tiempo, anual y actividad diaria, y su asociación con variables climáticas en la ciudad de Posadas.

# 5 MATERIALES Y MÉTODOS

## 5.1 ADAPTACIÓN DE PROTOCOLOS DE EXTRACCIÓN DE ADN Y OPTIMIZACIÓN DE PROTOCOLOS DE PCR–RFLP PARA DETECCIÓN Y TIPIFICACIÓN DE ESPECIES DE *LEISHMANIA*

### 5.1.1 ADAPTACIÓN DE PROTOCOLOS DE EXTRACCIÓN DE ADN

Los protocolos de extracción de ADN sugeridos por Belli y col. y Pita-Pereira y col. se adaptaron para cultivos de *Leishmania*, biopsias/raspados de úlceras cutáneas y flebotomos agrupados en lotes (Belli et al. 1998; Pita-Pereira et al. 2005) previo a este trabajo. Se requería la extracción de ADN del parásito a partir de otros tipos de muestras diferentes por lo que en base al protocolo estándar de extracción (digestión con Proteinasa K, purificación fenólica y precipitación etanólica), se realizaron ajustes para otros protocolos de extracción sobre muestras de hisopado de conjuntiva (H) (de Almeida Ferreira et al. 2008), capa enriquecida de glóbulos blancos (GB) obtenida a partir de muestras de sangre entera y para aspirado de ganglios linfáticos provenientes de canes (Reithinger & Dujardin 2007). Las principales diferencias entre todos los protocolos utilizados radican en el tratamiento previo a la extracción (lavados, tiempo y velocidad de centrifugación, disgregado del material), tiempo/concentración de Proteinasa K y volumen final de resuspensión del ADN (Anexo I).

Las diferentes muestras consisten en biopsias de 1mm x1mm, 500 ul de cultivo, 300 ul de hisopado, 2 ml de sangre entera, y entre 500 y 1000 ul de aspirado de ganglio linfático y lotes de flebotomos de entre 1 a 10 ejemplares.

Se cuantificó el ADN de las muestras mediante el uso de fluorómetro Qubit™(Invitrogen™). El valor promedio de concentración de cada muestra se obtuvo a partir de 20 mediciones realizadas en 20 muestras de cada tipo (excepto muestras de

aspirado de ganglios). Se evaluó la integridad del ADN por electroforesis en gel de agarosa; y se consideró el tropismo diferencial que presentan las diferentes especies de *Leishmania* por diferentes tejidos, función que afecta la cantidad relativa de parásitos por tejido/muestra. Estos datos en conjunto se utilizaron para establecer las concentraciones de ADN óptimas a utilizar en las reacciones de detección y tipificación de *Leishmania* por PCR para cada tipo de muestra y considerar si eran necesarias diluciones.

---

#### 5.1.2 OPTIMIZACIÓN DE PROTOCOLOS DE PCR-RFLP

Se optimizaron tres protocolos de PCR-RFLP denominados Mini-exón, ITS-1 y *hsp70* desarrollados por Marfurt y colaboradores, Schönian y col., y Garcia y col., respectivamente (Marfurt et al. 2003; Schönian et al. 2003; Garcia et al. 2004; Decuypere et al. 2008).

Los ensayos de optimización de los tres protocolos se realizaron a partir de cepas de referencia OMS de *Leishmania (Viannia) braziliensis* (MHOM/BR/75/2903), *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (IFLA/BR67/PH8) y una cepa local de *Leishmania (Leishmania) infantum* aislada de un can positivo por frotis e inmunocromatografía (rk39) para leishmaniasis visceral canina. Las cepas de referencia fueron gentilmente cedidas por el Centro Nacional de Referencia “Dr. Fátala Chabén”.

El ajuste de las condiciones óptimas para los tres protocolos de PCR se realizó considerando parámetros como concentración de ADN de cepas de referencia, titulación del cocatión MgCl<sub>2</sub>, concentración de dimetil-sulfóxido (DMSO) y temperaturas de hibridación. Para los tres protocolos se adaptó lo propuesto en los trabajos de cada autor a un perfil de ciclado estándar del laboratorio.

Los ensayos de PCR se efectuaron en un termociclador MiniCycler PTC-0150™ (MJ Research Inc., Waltham, USA) y los productos fueron resueltos mediante electroforesis en gel horizontal de agarosa al 2% a 5V/cm visualizados con Bromuro de Etidio (0,5µg/ml) en un transiluminador UV. La estimación del peso molecular del producto obtenido se realizó

por comparación visual con un marcador de peso molecular comercial (CienMarker, Biodynamics®).

Los productos esperados a partir de las cepas de referencia por cada protocolo fueron sujetos a los ensayos de RFLP sugeridos por los autores y los patrones de restricción enzimática obtenidos verificados en electroforesis horizontal de agarosa al 2,5% a 5V/cm visualizados con Bromuro de Etidio (0,5µg/ml) en un transiluminador UV.

Los productos de PCR se confirmaron a través de secuenciación automática, en ambos sentidos, mediante el sistema de ddNTPs fluorescentes terminadores de cadena (Macrogen Inc.). Las bandas esperadas destinadas a restricción como a secuenciación se purificaron con el Kit Wizard SV Gel and PCR Clean-up System de Promega (Anexo I).

El protocolo de Marfurt y col. amplifica regiones conservadas y variables de genes Mini-exón presentes en tándem de 100 a 200 copias en todas las especies de *Leishmania*; éste permite determinar el subgénero por diferencia de tamaño entre los fragmentos de PCR siendo los tamaños esperados para el subgénero *Viannia* 220-226 bp y para el subgénero *Leishmania* del nuevo mundo 378-435 bp (*primers* en Tabla 1) para realizar una posterior tipificación de la especie por ensayo de RFLP (Marfurt et al. 2003). Para la optimización de este protocolo se testearon concentraciones entre 10 ng a 60 ng finales a reacción de cepas de referencia, concentraciones de Dimetil-sulfóxido de 5, 7,5 y 10 % y temperaturas hibridación de 53°C y 54°C.

Los ensayos de restricción se realizaron con las enzimas Hae III (5'-GG▼CC-3') (Promega™) y Eae I (5'-Py▼GGCCPu-3') (New England Biolabs™) mediante digestión de 10 µl de producto de PCR a 37°C.

El segundo protocolo optimizado fue el propuesto por García y col. que amplifica el gen *hsp70* con 5 a 7 repeticiones según especie de *Leishmania*. Este protocolo genera un producto de 1300 bp, y las especies de *Leishmania* se tipifican por RFLP (*primers* en Tabla 1) (García et al. 2004).

Tabla 1: *Primers* utilizados en los tres protocolos de detección y tipificación de *Leishmania*

<i>Primers</i>	Secuencia	Fragmento esperado
Fme	TAT TGGTAT GCG AAA CTT CCG	223-443 pb
Rme	ACA GAA ACT GAT ACT TAT ATA GCG	
<i>hsp70</i> sen	GAC GGT GCC TGC CTA CTT CAA	1300 pb
<i>hsp70</i> ant	CCG CCC ATG CTC TGG TAC ATC	
LITSR	CTG GAT CAT TTT CCG ATG	300-350 pb
L5.8S	TGA TACC ACT TAT CGC ACT T	

Para la optimización de este protocolo se testaron concentraciones de 22,4; 56,8 y 121,1 ng finales a reacción de cepas de referencia, concentraciones de MgCl<sub>2</sub> 1, 1,5, 2 y 2,5 mM y dos temperaturas hibridación, 60°C y 61°C de temperatura.

Los ensayos de restricción se realizaron con la enzima Hae III (5'-GG▼CC-3') (Promega™) mediante digestión de 10 µl de producto de PCR en baño termostático a 37°C.

El tercer protocolo optimizado fue el de Schönian y col. que amplifica una de las regiones espaciadoras transcriptas (ITS-1) presente en el operón ribosomal de *Leishmania*. Este protocolo genera un producto de 300 a 350 bp dependiendo de la especie de *Leishmania* (*primers* en Tabla 1), que requiere de ensayo de RFLP complementario para su tipificación (Schönian et al. 2003).

Para la optimización de este protocolo se testaron concentraciones de 60 y 104 nanogramos totales a reacción y concentraciones de MgCl<sub>2</sub> 1,5, 2, 2,5 y 3 mM.

Los ensayos de restricción se realizaron con las enzimas Hae III (5'-GG▼CC-3') (Promega™) y RsaI (GT▼AC CA▲TG) (Promega™) mediante digestión de 10 µl de producto de PCR en baño termostático a 37° C.

### 5.1.3 ENSAYOS DE LÍMITE TEÓRICO DE DETECCIÓN (LTD) DE PARÁSITOS

Se realizaron extracciones de ADN a partir de las cepas de referencia *L. (V.) braziliensis* (MHOM/BR/75/2903) y *L. (L.) amazonensis* (IFLA/BR67/PH8). Se cuantificó el ADN de las mismas mediante el uso de fluorómetro Qubit™ (Invitrogen™) realizándose diluciones seriadas de 1/5, 1/10, 1/50, 1/100, 1/1.000, 1/ 10.000 y 1/100.000 V/V con agua destilada libre de DNAsas y RNAsas (Gibco™). Para cada una de estas diluciones se calculó la concentración teórica en ng/ul como así también los nanogramos totales que se analizaría por PCR a partir de la utilización de 5 ul.

El ADN extraído de la cepa de *L. (L.) amazonensis* registró por fluorometría una concentración de 23,3 ng/μl, llegándose a una concentración final teórica de 0,00023 ng/ul (o 0,001 nanogramos totales equivalentes a 1100 fg cada 5 ul a PCR) en la máxima dilución. El ADN extraído de *L. (V.) braziliensis* presentó una concentración de 45,1 ng/ul llegándose a una concentración final teórica de 0,00045 ng/ul (o 0,002 ng totales equivalentes a 2200 fg cada 5 ul a PCR) en la máxima dilución (Ilustración 8).

La masa del genoma de *Leishmania* varía según lo descrito por distintos autores, presentando valores de 83,4 femtogramos (fg) (Ranasinghe et al. 2008), 100 fg (Myler & Stuart 2000; Gontijo 2003) y 300 fg de ADN por parásito (Quaresma et al. 2009). Ante esta discrepancia, se tomó como valor de referencia el rango comprendido entre 100 y 300 fg de masa del genoma de un parásito del género *Leishmania* para estimar el LTD aproximado de cada protocolo. Para esto se dividió por 100 y 300 la masa total de ADN de la mayor dilución a la que se obtuvo banda esperada para los protocolos.

*Leishmania (L.) amazonensis**Leishmania (V.) braziliensis*

Dilución	ng/ $\mu$ l	ng totales a PCR	Dilución	ng/ $\mu$ l	ng totales a PCR
1/5	4,66	23,3	1/5	9,02	45,1
1/10	2,33	11,65	1/10	4,5	22,55
1/50	0,466	2,33	1/50	0,902	4,51
1/100	0,23	1,16	1/100	0,45	2,25
1/1.000	0,023	0,116	1/1.000	0,045	0,225
1/10.000	0,0023	0,011	1/10.000	0,0045	0,022
1/100.000	0,00023	0,0011 ng = 1100 fg	1/100.000	0,00045	0,0022 ng = 2200 fg

Ilustración 8: Concentración de ADN diluciones seriadas de cultivo

Las concentraciones están expresadas en ng/ $\mu$ l de cada dilución y la masa total de ADN presente en cada muestra calculada a partir de 5  $\mu$ l de muestra. ng: nanogramos; fg: femtogramos

Se ensayaron los tres protocolos de PCR-RFLP descritos para todas las diluciones seriadas de ambas cepas de referencia. La evaluación de los protocolos de Mini-exón e ITS-1 se realizaron en colaboración con una Tesis de Grado<sup>7</sup>. La evaluación de protocolos se completó incluyendo el análisis de sensibilidad teórica de *hsp70* en este trabajo de Tesis de Doctorado.

## 5.2 ESTUDIO REGIONAL: ANÁLISIS DE INFECCIÓN A PARTIR DE MUESTRAS DE ZONA ENDÉMICA DE LT Y DE ZONA EPIDÉMICA EMERGENTE DE LV DE LA PROVINCIA DE MISIONES

<sup>7</sup> “Ciclo de transmisión emergente selvático de Leishmaniasis Tegumentaria (LT): Evaluación de protocolos de tipificación de *Leishmania* en el vector *Nyssomyia whitmani* (Psychodidae: Phlebotominae”. Lic. Magalí Giuliani (2011).

*Casos humanos.* Las biopsias humanas se obtuvieron de pacientes con úlceras cutáneas que asistieron al Hospital de Área Nivel 1 de Puerto Esperanza (Misiones, Argentina) durante el período 2005-2009. Las muestras fueron derivadas con el correspondiente consentimiento informado de los pacientes acorde a lo expresado por el Consejo de Organizaciones Internacionales de las Ciencias Médicas (CIOMS-WHO, 1996) (Anexo II). En el presente trabajo se incluyeron 16 biopsias de 16 pacientes con diagnóstico clínico compatible con leishmaniasis y diagnóstico confirmatorios de frotis e histopatología positivo para *Leishmania*; la toma de muestras fue realizada por profesionales autorizados dentro del sistema de salud pública quienes realizaron el envío refrigerado para su posterior análisis. Todas las muestras fueron analizadas por los protocolos de Mini-exón e ITS-1 y solamente cinco por de *hsp70*.

*Muestras de Phlebotominae.* Las muestras de vector se obtuvieron mediante capturas realizadas con trampas de luz tipo mini CDC sin dióxido de carbono, colocadas a 1,5 m del suelo de 5:00 pm a 09:00 am. Los sitios de muestreo para la ciudad de Puerto Iguazú (Misiones) se predefinieron en base a localización de casos clínicos de LC ocurridos durante 2004 y 2005 (Salomón et al. 2009) y los mismos se llevaron a cabo durante los meses de octubre y noviembre de 2006 y Marzo de 2008. La asistencia logística de traslado estuvo a cargo de la Fundación Mundo Sano.

Los sitios de muestreo seleccionados en la ciudad de Posadas (Misiones) coincidieron con el monitoreo de presencia de *Lu. longipalpis* realizado de enero a marzo de 2009 a cargo del Laboratorio de control de Vectores de la Municipalidad de dicha localidad y por el Centro Nacional de Diagnóstico e Investigación en Endemoepidemias CeNDIE-ANLIS “Dr. C. G. Malbrán”.

Se consideraron para el análisis únicamente las hembras y se reunieron en lotes de 4 a 12 ejemplares de la misma especie pertenecientes a la misma trampa para luego proceder con la disección de los últimos terguitos abdominales bajo lupa estereoscópica (Ilustración 9), seguido de un squash para la posterior visualización de espermatecas en microscopio óptico y determinación de especies (Ilustración 10) de acuerdo a la clave de Galati (Galati

2003). Se analizaron 186 hembras, distribuidas en 20 lotes de *Nyssomyia whitmani* (19 lotes) y 4 hembras de *Mygonemyia migonei* (1 lote) correspondientes a las capturas realizadas en Puerto Iguazú, y 504 hembras de *Lu. longipalpis* distribuidas en 57 lotes provenientes de la ciudad de Posadas, para extracción de ADN (Anexo I). Cada individuo se analizó de manera individual para la determinación de especie.

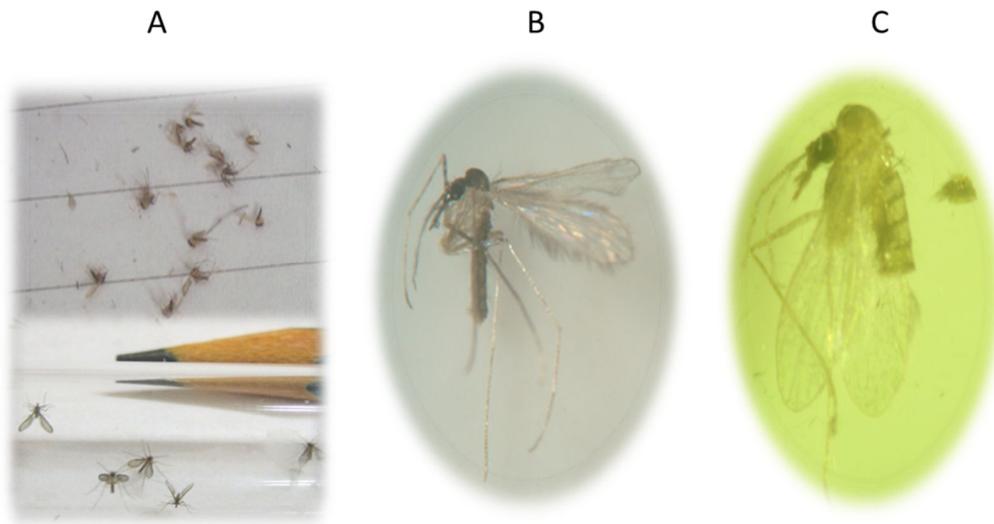


Ilustración 9: Disección de hembras *Phlebotominae*

A: flebótomos tamaño real; B: hembra a 100X; C: hembra a 400X (ampliado por zoom 4x de cámara fotográfica) con últimos terguitos cortados para visualización de espermotecas en Microscopio Óptico.

Todos los lotes provenientes de ambas ciudades se analizaron por los protocolos de Mini-exón e ITS-1 y solamente se testearon por el de *hsp70* algunos de los que resultaron positivos por alguno de los realizados previamente.

*Casos caninos.* Para la detección del parásito en canes se utilizaron 11 muestras de aspirado de ganglio correspondientes a 11 canes obtenidas por veterinarios del Instituto Municipal de Sanidad animal de la Municipalidad de Posadas, con diagnóstico confirmado de *Leishmania* sp al MO.

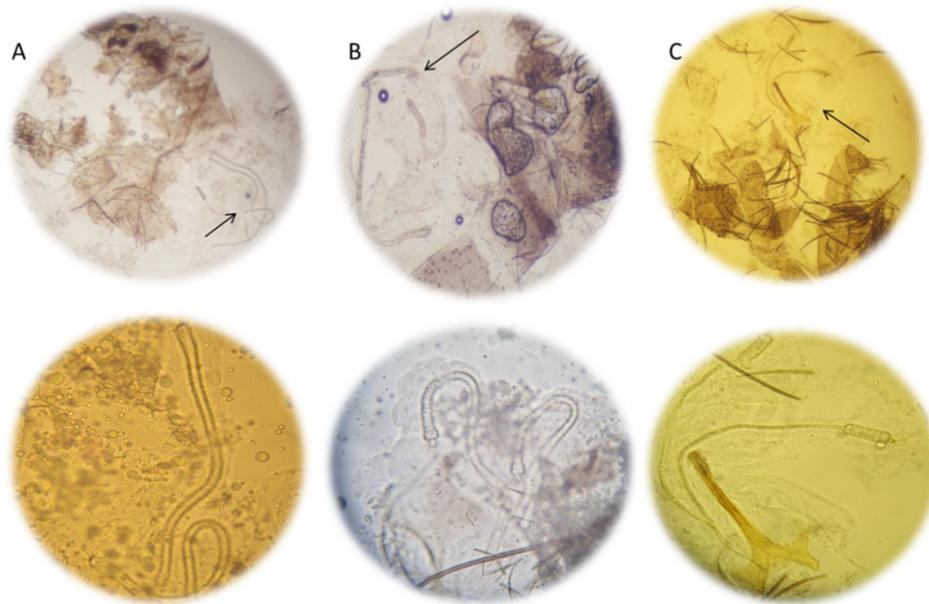


Ilustración 10: Espermatecas de hembras *Phlebotominae*

A: *My. migonei*; B: *Ny. whitmani*; C: *Lu. longipalpis*. 100X (primera línea de figuras) y 400X (segunda línea).

## 5.2.1 ENSAYOS MOLECULARES

*Extracción de ADN.* Se realizó mediante digestión enzimática con proteinasa K, seguida de purificación con fenol-cloroformo y precipitación etanólica. El ADN extraído se resuspendió en agua libre de nucleasas (Anexo I, 10.1.1).

*Control de inhibición.* La ausencia de inhibidores en muestras clínicas humanas se evaluó mediante PCR con blanco en el gen de la  $\beta$ -globina humana, que genera un fragmento de 268pb (*primers* PC04 CAACTTCATCCACGTTCCACC y GH20 AAGAGCCAAGGACAGGTAC) (Saiki et al. 1992); la positividad de la reacción determinó la inclusión del material biológico en el estudio. Las muestras de vector también se evaluaron por ausencia de inhibidores mediante PCR con blanco en la región IVS6 del gen *cacophony* (*primers* 5Llac GGGCCACTATTACACCAACCCC y 3Llac GGGGTAGGGGCGTTCTGCGAA) (Lins et al. 2002); la positividad de cada reacción

también determinó la inclusión del material biológico en el estudio. No se evaluó la inhibición en muestras de perros.

*Ensayos de detección y caracterización del parásito por PCR-RFLP.* Las muestras fueron analizadas mediante PCR–RFLP con los protocolos de Marfurt y col. 2003, García y col. 2004y Schönian y col. 2003 con blanco en diferentes regiones del ADN del parásito al efecto de verificar su sensibilidad y especificidad con cepas locales. Los fragmentos completos obtenidos por cada protocolo se confirmaron por secuenciación automática, en ambos sentidos, mediante el sistema de ddNTPs fluorescentes terminadores de cadena (Macrogen) los *primers* utilizados son los descritos en la sección 5.1.2 Tabla1 secuenciándose los productos completos, excepto en aquellos casos con baja intensidad de banda de PCR, lo que imposibilitó la secuenciación por no alcanzar la concentración mínima requerida; las secuencias fueron analizadas mediante el alineamiento con secuencias de referencia de Genbank mediante los programas Clustal X (Larkin et al. 2007) y Codón Code Aligner™.

---

#### 5.2.2 ANÁLISIS DE CONCORDANCIA ENTRE PROTOCOLOS DE PCR-RFLP PARA DETECCIÓN DE INFECCIÓN CON *LEISHMANIA* SP.

Los análisis de concordancia de pruebas diagnósticas se realizaron por cálculo de índice kappa:

$$K = \frac{Po - Pe}{1 - Pe}$$

Donde: Po= Proporción de concordancia observada

Pe= proporción de concordancia esperada por azar

Si hay coincidencia perfecta entre las pruebas la proporción de concordancia será 1; entonces 1-Pe representa el margen de acuerdo no atribuible al azar (Norman & Streiner 1999). Los análisis se llevaron a cabo con el programa Epidat 4.0. Para la interpretación del valor Kappa se utilizó la escala propuesta por Landis y Koch (Landis & Koch 1977).

Valor de $k$	Fuerza de concordancia
< 0.20	Pobre
0.21 - 0.40	Débil
0.41 - 0.60	Moderada
0.61 - 0.80	Buena
0.81 - 1.00	Muy buena

## 5.3 ESTUDIO MICROFOCAL: ANÁLISIS DE TASA DE INFECCIÓN EN FLEBÓTOMOS Y CANES CAPTURADOS EN AAV Y ASV

### 5.3.1 SELECCIÓN DE ÁREAS DE ALTA ABUNDANCIA DEL VECTOR (AAV) Y ÁREAS SIN CAPTURA DEL VECTOR (ASV)

En un estudio de abundancia del vector realizado en la ciudad de Posadas en 2007 se observó presencia de *Lu. longipalpis* en toda la ciudad, con una distribución espacial heterogénea con “áreas de alta abundancia del vector” ( $\geq 60$  flebótomos por trampa) inmersa en una matriz de áreas de baja abundancia o sin presencia de vector (Fernández et al. 2010); en base a este conocimiento, desde el CeNDIE y la Secretaría de Calidad de Vida de la Municipalidad de Posadas se planteó un estudio de Abundancia a Diferentes Escalas Espaciales (ADEE), cuyo objetivo fue describir la variabilidad de la abundancia de *Lu. longipalpis* en dos categorías de abundancia segregadas espacialmente y la relación a su vez de estas abundancias con múltiples variables ambientales tomadas para cada manzana (área) estudiada. Para evaluar el desempeño en campo de diferentes metodologías para la tipificación molecular de *Leishmania*, como objetivo de esta tesis, y contribuir al proyecto de distribución espacial de riesgo de LV en la ciudad de Posadas, mencionado anteriormente, se seleccionaron al azar 6 áreas que formaron parte también del estudio de

ADEE siendo estas 5 manzanas urbanas y un asentamiento con el trazado de una sola cuadra convencional: 2 áreas sin captura del vector (ASV) y 4 con presencia de  $\geq 60$  flebótomos; como el número de flebótomos en dos de ellas era tres veces mayor de lo encontrado en las dos restantes se decidió incorporar la subdivisión arbitraria de abundancia moderada de vector (AMV), quedando así dos áreas clasificadas como AMV y dos como de alta abundancia del vector (AAV).

En cada área de muestreo se seleccionaron al azar de 3 a 10 viviendas, de acuerdo a oportunidad tanto logística como demográfica y que presentaron características de “peores escenarios” (Feliciangeli et al. 2006; Correa Antonialli et al. 2007) (Ilustración 11). En estos sitios, donde hay mayor probabilidad de encontrar flebótomos, se registraron variables ambientales para cada casa en el marco del proyecto del estudio ADEE. Además de las muestras de vectores se tomaron muestras de sangre entera de todos los canes de la manzana contando con el consentimiento de los dueños. Las muestras de vectores se obtuvieron trabajando conjuntamente con profesionales del Instituto Municipal de Vigilancia y Control de Vectores y el LaBiMAp-FCEQyN en el marco del convenio de colaboración entre el LaBiMAp-UNaM y la Secretaría de Calidad de Vida de la Municipalidad de Posadas. Las muestras de sangre entera e hisopado de conjuntiva de los animales, los análisis serológicos y las encuestas sobre datos del animal fueron tomadas y realizadas por profesionales veterinarios en el Instituto Municipal de Sanidad Animal.



**Ilustración 11: Imagen satelital de la ciudad de Posadas**

Los sitios señalados en rojo corresponden a las 2 áreas de alta abundancia (AAV); los sitios señalados en amarillo a las áreas de abundancia moderada (AMV) y los verdes a áreas sin captura del vector (ASV) incluidas en el estudio.

### 5.3.2 MUESTREO BASE DE VECTORES Y AL AÑO

Para el muestreo realizado como parte del estudio ADEE y de particular interés de esta tesis se colocaron 38 trampas de luz tipo mini CDC sin dióxido de carbono en 38 viviendas, 10 en áreas AAV, 20 en áreas AMV y 8 en ASV. Se colocaron durante toda la noche, de 17:00 a 07:00 por dos noches consecutivas, dos veces por unidad doméstica (38 viviendas) la primera vez, de noviembre a enero de 2009 para muestreo base y la segunda de noviembre a diciembre de 2010 para muestreo al año. El material colectado se rotuló por fecha y sitio, para ser trasladado al laboratorio donde se realizó la determinación de especies de *Phlebotominae*. Se estimó la abundancia promedio de *Lu. longipalpis* por trampa/noche. Se realizaron análisis de infección por *Leishmania* mediante PCR-RFLP a todos los ejemplares

agrupados por sitio de captura (vivienda) y especie con los protocolos de amplificación de regiones genómicas de Mini-exón e ITS-1 descritos anteriormente.

---

### 5.3.3 MUESTREO BASE DE CANES Y AL AÑO

Se obtuvieron muestras a partir de los 74 canes fueron todos de raza mestiza, con un rango de edad entre 3 meses a 20 años estimado en base a la entrevista realizada a los dueños. Las muestras obtenidas de canes consistieron en 3 ml de sangre entera, 1 ml para el análisis de serología usando el test rk39 (72/74) (KalazarDetect ®, InBios, Seattle, WA) llevado a cabo por el IMUSA, y 2 ml refrigerada en campo para su procesamiento en el LaBiMAP – FCEQyN (73/74) (Ilustración 12). El tratamiento en laboratorio consistió en centrifugación a 3000 r.p.m. durante 15 minutos seguido de la recuperación de capa de glóbulos blancos y preservación en freezer a -20°C hasta la extracción de ADN. Una vez realizada la toma de muestra de sangre se procedió a la toma de muestra de hisopado de conjuntiva ocular (H) en 41/73; los procedimientos sobre animales fueron hechos por los veterinarios responsables según el protocolo de programa municipal que implicaba realizar en primer lugar la toma estandarizada de sangre y luego, por evaluación del profesional sobre la conveniencia de manipulación múltiple de cada can, la toma experimental de conjuntivas, por lo que se tomó una submuestra de aproximadamente el 50% de los 73 canes. Cabe destacar que tampoco se autorizó el regreso a los sitios para recuperar a los animales sin muestra completa. Una vez colectadas las muestras fueron refrigeradas y procesadas de manera similar a la descrita para muestra de sangre entera.

El muestreo de canes al término de un año, se había planificado junto al de vectores para ver la incidencia de casos canino en las áreas de alta abundancia del vector y en áreas sin presencia del vector y luego compararlas, pero no se pudo realizar por inconvenientes logísticos de fuerza mayor.



Ilustración 12: Toma de muestra de sangre entera e hisopado de conjuntiva de canes

---

#### 5.3.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Para la caracterización de las 6 áreas o manzanas se trabajó con 1 variable indicativa de infección por *Leishmania* de los canes y 4 variables ambientales; para la caracterización de las 38 viviendas dentro de esas manzanas (27 viviendas en área de alta abundancia y 11 de área sin vector) se trabajó con 14 variables ambientales. La selección de las variables ambientales utilizadas se basó en los resultados del estudio de Santini y col. (Santini et al. 2012) (Tabla 2).

Se caracterizaron las manzanas y viviendas a partir de estadística descriptiva univariada comparando las diferencias entre medias por una prueba T para muestras independientes, en el caso de que las varianzas de ambos grupos no sean homogéneas InfoStat™ utiliza la corrección Satterwait del estadístico para calcular el valor de p en caso que sean heterogéneas.

Tabla 2: Variables ambientales analizadas en cada una de las áreas de alta abundancia y área sin presencia del vector y en cada vivienda.

Variables	Nombres de las variables
<b>Viviendas <i>a</i></b>	
Superficie de suelo desnudo o cubierto de hierba (metros <sup>2</sup> )	t_p
Área en el patio cubierta por piso de cemento (metros <sup>2</sup> )	ali
Distancia desde la vivienda a cursos de agua (metros)	D_agua
Superficie de suelo descubierto (metros <sup>2</sup> )	tierra
Número de macetas	macetas
Número de canes	canes
Número de gallinas	gallinas
Superficie cubierta por vegetación (metros <sup>2</sup> )	veg_m2
Número de especies de árboles	sp árbol
Número de especies de arbustos	sp arb
Número de especies de plantas	sp pl
Número de árboles	arboles
Diámetro del tronco del árbol más grande (metros)	d_tronco
Diámetro de la copa del árbol más grande (metros)	d_copa
<b>Manzanas</b>	
Superficie cubierta por vegetación (metros) <i>b</i>	densidad_veg
Número de calles no pavimentadas por manzana <i>b</i>	calles_tierra
Distancia al cuerpo de agua medida desde el centro de la manzana (metros) <i>b</i>	Dist_agua_mzn
Número de perros en la manzana <i>a</i>	Canes_mzn
Proporción de perros infectados (rk39+) <i>a</i>	Prop_rk39

*a*: registros de campo tomados simultáneamente con las capturas de vector. *b*: datos calculados en Google Earth™ imagen satelital (13 Septiembre 2009) (altitud 1.62 km). (Modificado a partir de Santini *et al* 2012).

También se utilizó la técnica de ordenación Análisis de Componentes Principales (ACP) para ordenar las áreas trabajadas al efecto de evaluar si en esta submuestra eran determinantes las mismas variables que explicaron las diferencias entre las manzanas/viviendas agrupadas en AAV y ASV en el trabajo de Santini y col (Santini *et al*. 2012). Se utilizaron para los análisis matrices de correlación y datos estandarizados, excluyendo del análisis a las variables que aportasen el menor y mismo peso en cada uno de

los componentes por lo que finalmente se trabajó con 12 variables (excluyendo la variables “Área en el patio cubierta por piso de cemento” y “Diámetro del tronco del árbol más grande”) y se retuvieron componentes principales con valores mayores a 1 dado que se trabajó a partir de matrices de correlaciones (dicho valor indica que son más informativos que la variable original) (Quinn & Keough 2002; Balzarini et al. 2008).

A partir de los 73 canes se analizaron las diferencias entre proporciones de perros positivos para *Leishmania* por al menos un protocolo de PCR y para al menos un tipo de muestra correspondiente a las diferentes áreas AAV, AMV, ASV. El análisis se llevó a cabo con el módulo inferencia basada en dos muestras, diferencias de proporciones de InfoStat/E versión estudiantil 2013.

A partir de datos provenientes de 38/41 canes se analizó la existencia de asociación significativa entre resultados positivos de rk39 frente a ambos tipos de muestras analizados por los protocolos de Mini-exón e ITS-1 mediante tablas de contingencia 2x2 y prueba exacta de Fisher al efecto de corregir frecuencias esperadas bajo independencias menores a 5, considerándolos significativos cuando el valor de p fue menor a 0,05; también se analizó la existencia de asociación entre los resultados obtenidos por estos dos protocolos (a partir de muestras de GB y/o H) y para cada tipo de muestra por ITS.1 y/o Mini-exón. Considerándolos significativos cuando el valor de p fue menor a 0,05.

Se realizó un análisis de regresión logística para evaluar si el porcentaje de positividad de canes por serología o por PCR, estaba relacionado con la edad canina. En total 36 canes reunieron el criterio de inclusión descrito para este análisis.

Respecto a la variable edad, se la trabajó como variable continua, y también se la categorizó tomando como referencia diferentes trabajos, resultando tres tipos de variables categóricas: edad categórica 1 ( $\leq 1$  año = 0;  $>1$  año = 1), edad categórica 2 ( $\leq 2$  años = 0;  $>2$  años =1) y por último edad categórica 3 ( $\leq 7$  años =0;  $>7$  años =1). Todos los análisis mencionados se realizaron con InfoStat/E versión estudiantil 2013.

La valoración del desempeño de cada técnica se realizó por comparación de porcentajes de muestras positivas de rk39 y de los protocolos de PCR-RFLP Mini-exón e ITS-1 a partir de los diferentes tipos de muestras, al no contar con datos de estatus clínico de los canes se los consideró como infectados asintomáticos<sup>8</sup> en el caso de ser positivo por una u otra técnica.

Los análisis de concordancia de las pruebas diagnósticas Mini-exón e ITS-1 obtenidos del análisis de los flebotomos, muestras de glóbulos blancos e hisopados de conjuntiva se realizaron por cálculo de índice kappa como se describió anteriormente.

## 5.4 DESCRIPCIÓN DE DINÁMICA ANUAL Y ACTIVIDAD HORARIA DE *LUTZOMYIA LONGIPALPIS*

### 5.4.1 MUESTREOS

El diseño del estudio fue observacional descriptivo, realizado en la ciudad de Posadas, Misiones; para el muestreo longitudinal de dinámica anual por razones éticas se seleccionaron al azar solamente dos sitios de captura que en muestreos previos (enero de 2009) habían presentado abundancia moderada del vector (<60 flebotomos/noche) (Fernández et al. 2010), dado que para sitios con una abundancia  $\geq 60$ , la recomendación del Programa Nacional de Leishmaniasis es la intervención inmediata con insecticidas. En este mismo contexto ético la OPS sugiere hacer el muestreo longitudinal en pocos domicilios por localidad con abundancias moderadas; a pesar del desmedro en la representatividad del número de sitios de captura, la misma permite estimar la tendencia (OPS/OMS, 2013).

---

<sup>8</sup>Todo can asintomático captado en estudios poblacionales en municipios con transmisión activa confirmada, o procedente de área endémica, con serología o parasitología positiva para leishmaniasis (Ministerio de Salud de la Nación, 2013).



**Ilustración 13: Imagen satelital de la ciudad de Posadas**

Marcas de color amarillo: sitios de muestreo longitudinal (Gallinero y Árbol de gallinas); marcas de color fucsia: sitios de muestreos actividad horaria. (A, B y C).

El primero de los sitios de muestreo denominado “gallinero”  $27^{\circ}24'23.34''S$ ;  $55^{\circ}54'36.18''O$  (Ilustración 13), estaba ubicado en el patio de un domicilio particular a 5 mts de la vivienda de material; al inicio del muestreo se registró en el lugar la presencia de 15 gallinas en el gallinero mayor y de 8 pollos en un gallinero adyacente ubicado a 1,7 mts del primero dentro del mismo predio (en noviembre de 2009 quedó solo 1 pollo en el gallinero adyacente) y tres canes. El segundo sitio denominado “árbol de gallinas”  $27^{\circ}22'22.26''S$ ;  $55^{\circ}55'40.85''O$  (Ilustración 13) también se encontraba ubicado en el patio de un domicilio particular a 7 mts de la vivienda de material, en donde al inicio del muestreo se registró la presencia de 3 gallinas y dos canes. Los muestreos de los dos sitios fueron simultáneos y en cada uno de ellos se colocó una trampa de luz tipo mini CDC sin dióxido de carbono de 17:00 a 07:00 hs, dos noches consecutivas cada 30 días, de marzo de 2009 a febrero de 2010, entre los días 11 y 25 de cada mes. No se prosiguió con el muestreo por un año más según se tenía programado, dado que una de las familias decidió

modificar su espacio habitacional cortando el árbol donde se colocaba la trampa; esta decisión se debió a la recomendación efectuada por el grupo de trabajo en el marco del Programa Nacional de Leishmaniasis referida al alejamiento de los gallineros del área de dormitorios, y fundamentada por el incremento de casos caninos y humanos en la ciudad. Cabe destacar además que debido a la sensibilidad social que generó el tema en el ámbito urbano de Posadas, se restringieron las metodologías de captura a las de menor intromisión posible en el ámbito doméstico, utilizando sólo trampas CDC y sólo en peridomicilio, sin otras complementarias que implicasen captura manual.

Los datos de las variables meteorológicas, temperatura máxima, media y mínima (°C promedio mensual), humedad relativa máxima, media y mínima (porcentaje promedio mensual), además de precipitación mensual (milímetros mensuales totales) para el período en estudio, fueron tomados en la estación meteorológica del aeropuerto Libertador Gral. San Martín de la ciudad de Posadas, cedidos por el Centro de Información Meteorológica del Sistema Meteorológico Nacional. También se registraron las especies arbóreas presentes en cada sitio y se tomó registro de cambios en el número inicial de animales domésticos a medida que transcurría el muestreo.

El muestreo de actividad horaria nocturna (incluyendo crepúsculo vespertino y matutino) se realizó en tres sitios con gallinero (A, B y C) de la ciudad de Posadas durante los meses de febrero, marzo y abril de 2011 (Ilustración 13) elegidos al azar entre otros sitios previamente muestreados en 2010, con una cantidad menor a 30 flebotomos considerada de baja abundancia (Fernández et al. 2010). En el sitio A (27°21'49.63"S;55°56'4.23"O) el gallinero contaba con 50 gallinas, estaba ubicado a 10 mts de la vivienda en un patio con piso de material, donde se registró además la presencia de dos canes; el sitio B (27°22'37.28"S; 55°55'15.34"O) se trató de un gallinero de 8 gallinas ubicado a 6 mts de la vivienda sobre piso de tierra y sin presencia de canes y finalmente el sitio C (27°24'17.14"S; 55°55'17.35"O), un gallinero de 11 gallinas ubicado a 19 mts De la vivienda sobre piso de tierra y con presencia en el terreno de tres canes. Para el muestreo de actividad horaria de *Lu. longipalpis* se utilizó el adaptador multi-muestreos para mini trampas de luz tipo CDC (M&G producciones tipo “Collection bottletraps”, John W. Hock



Ilustración 14: Muestreo de dinámica y actividad horaria de *Lu. longipalpis*

A: Trampa de luz tipo mini CDC en árbol de gallinas B: imagen del sitio gallinero ; C, D y E: muestreo de actividad horaria; trampa de luz tipo mini CDC con adaptador multi-muestreo en gallineros.

Company: [www.JohnWHock.com](http://www.JohnWHock.com)) que permite separar las capturas por períodos determinados mediante un temporizador programable; éste regula un plato giratorio que consta de ocho recipientes colectores.

La trampa se colocó una vez al mes durante los meses de febrero, marzo y abril de 2011 por dos noches consecutivas en los tres domicilios; los muestreos se realizaron entre los días 10 a 24 de cada mes con el objeto de hacer coincidir la fase lunar (luna menguante y creciente) y en función de mantener una intensidad lumínica equivalente (Ilustración 14 C, D y E). El adaptador multi-muestreo se programó para cambio de bolsa-recipiente cada 2 horas cubriendo el horario de 17:00 a 07:00 hs. Se registraron variables de humedad y temperatura con *data logger* para cada noche en cada sitio, programándose el registro de las

mediciones para que abarcase el segmento de 17:00 a 07:00 efectuando registros cada 15 minutos; los datos obtenidos se promediaron durante los 6 días de muestreo.

La asistencia logística de traslado y provisión de baterías, estuvo a cargo del Instituto Municipal de Vigilancia y Control de Vectores, Secretaria de Calidad de Vida, Municipalidad de Posadas.

Los insectos capturados para ambos muestreos se rotularon por fecha y sitio; la determinación de especies se realizó según las claves de Galati (Galati 2003).

---

#### 5.4.2 ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

*Dinámica anual.* Se realizó búsqueda de datos anómalos (*outlayers*) mediante gráficos de boxplot. Para evaluar si la abundancia de flebótomos observada y las variables climáticas estaban relacionadas se estudió la asociación de la abundancia promedio mensual de flebótomos con las variables de temperatura, humedad relativa y precipitación mediante correlaciones simples de Spearman. También se analizó mediante este tipo de correlación si la abundancia promedio estuvo asociada a datos climáticos promedio de 30 y 60 días previos a los muestreos de cada mes. Para los análisis se utilizó el programa InfoStat/E versión estudiantil 2011, considerándolos significativos cuando el valor de  $p$  fue menor a 0,05.

*Actividad horaria.* Se hizo búsqueda de datos anómalos por gráficos de boxplot. Para evaluar si la abundancia de flebótomos observada cada dos horas y las variables meteorológicas estaban relacionadas se estudió la asociación de la abundancia promediotrampa/noche con las variables de temperatura y humedad relativa mediante correlaciones de Spearman simples. Para evaluar si existieron diferencias significativas entre abundancia promedio de machos y hembras de 17:00 a 23:00 hs y de 01:00 a 07:00 hs se realizaron pruebas  $t$  pareados considerando la abundancia promedio total de las tres casas para cada mes; también se analizó si la diferencia de abundancia promedio de machos

y hembras después de las 3:00 hs fue significativa para cada mes. Dado que la prueba *t* implica que se realice más de una prueba (6 en total en ambos casos) se corrigió el valor de *p* según el método de Bonferroni utilizando como punto de corte  $\alpha/k$ , donde  $\alpha$  es el valor de significación de  $p=0,05$  y  $k$  es el número de contrastes (Martínez-Cambler 2012). Se trabajó entonces con el valor de *p* corregido de 0,008 ( $p=0,05 \div 6$  pruebas *t* pareadas). Para analizar si existieron diferencias significativas entre abundancia de machos y hembras por período para cada mes se utilizó el valor corregido de *p* de 0,01 ( $p= 0,05 \div 3$  pruebas *t* pareadas).

## 6 RESULTADOS

## 6.1 ADAPTACIÓN DE PROTOCOLOS DE EXTRACCIÓN DE ADN Y OPTIMIZACIÓN DE PROTOCOLOS PCR–RFLP PARA DETECCIÓN Y TIPIFICACIÓN DE ESPECIES DE LEISHMANIA

### 6.1.1 ADAPTACIÓN DE PROTOCOLOS DE EXTRACCIÓN DE ADN

Se trabajó con 6 protocolos de extracción de ADN para el posterior análisis de las diferentes muestras, las cuales consistieron en biopsias de 1mm x1mm aproximadamente, 500 ul de cultivo, 300 ul aproximados de hisopado, 2 ml de sangre entera, y entre 500 y 1000 ul de aspirado de ganglio linfático. Las características de cada uno se resumen en la Tabla 3.

Tabla 3: Protocolos de extracción de ADN a partir de diferentes tipos de muestras

Tipo de Muestra	Proceso previo a la extracción	Digestión con Proteinasa K	Vol. Final	Valores Mín-Máx [ADN ng/μl]	χ/ DE± [ADN ng/μl]	Dilución de trabajo
<b>Biopsias</b>	Disgregado con bisturí	200μg Prot K /muestra 8 hs	50μl	60,3-816	273,9/222	1/5
<b>Cultivos</b>	-	100μg Prot K /muestra 3 hs	50μl	0,14-45,1	17,3/13,1	Sin dilución
<b>Hisopados</b>	Centrifugación a 8000 rpm por 1'	75μg Prot K /muestra 3 hs	30μl	4,61-47,6	27,7/10,3	Sin dilución
<b>Sangre entera (GB)</b>	Centrifugación a 3000 rpm por 15'	100μg Prot K /muestra 12 hs	50μl	41,4-918	292,4/278,3	1/5
<b>Aspirado ganglios*</b>	Lavados con Sodio Citrato	100μg Prot K /muestra 12 hs	50μl	10 -815	282,4/321,9	1/10
<b>Flebótomos</b>	Maceración con micromortero	200μg Prot K /muestra 8 hs	50μl	0,45-48,6	15/12,4	sin dilución

Valores calculados a partir en 20 muestras de cada tipo, \*excepto para aspirado de ganglios que son 11 muestras; ng/ul: nanogramos por microlitros; DE±: Desvió estándar; χ: media

---

### 6.1.2 OPTIMIZACIÓN DE PROTOCOLOS DE PCR-RFLP

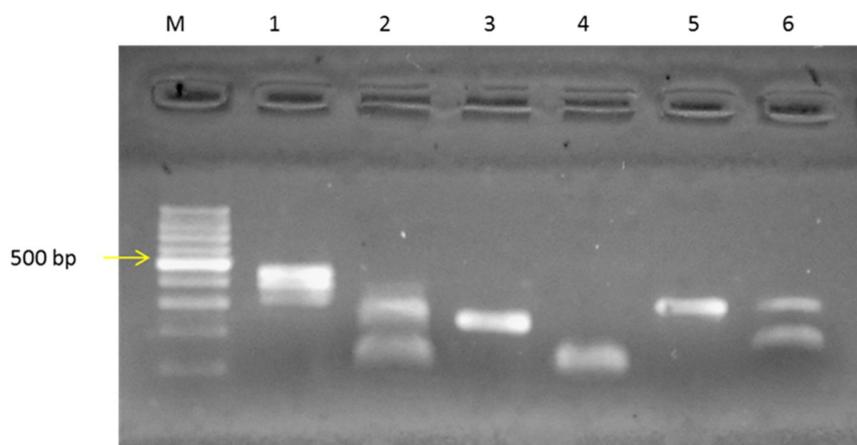
Para la optimización del protocolo de Marfurt y col. se inició con la concentración de  $MgCl_2$  sugerida por el autor 1,5Mm y 53°C de temperatura de hibridación, testeando en un primer ensayo diferentes concentraciones de cepas de referencia (de 10 ng a reacción a 60 ng finales por reacción) y DMSO al 5%, no obteniéndose bandas (Ilustración a ANEXO I), posteriormente se elevó la concentración de DMSO a 7,5% testeando el mismo rango de concentración y manteniendo los 53°C (Ilustración b ANEXO I), obteniéndose bandas dentro de los valores esperados pero algunas de ellas con bandas inespecíficas por encima de las esperadas por lo que se procedió a aumentar a 54°C la temperatura de hibridación y a aumentar 10% la concentración de DMSO (Ilustración c ANEXO I).

*Condiciones de reacción y perfil de ciclado establecidas.* Volumen final de reacción de 50µl, buffer de PCR 1X [Tris-HCl pH 8 200mM; EDTA 0,1mM; DTT 1mM; glicerol 50% (v/v)] (Invitrogen™),  $MgCl_2$  1,5 mM (Invitrogen™), DMSO 10% (Sigma™), 200µM de cada dNTP, primer sentido Fme 0,5µM, primer antisentido Rme 0,5µM (Tabla 1) y enzima Taq polimerasa 1,4 UI (Invitrogen™). El perfil de ciclado fue: desnaturalización inicial 94°C 4 min, 40 ciclos de 94°C 30 seg, 54°C 45 seg, 72°C 1 min y extensión final 72°C 10 min (Modificado a partir de Marfurt et al., 2003 ).

Se obtuvo para las diferentes cepas testeadas productos de PCR de tamaños aproximados a los esperados de 434 pb para *L. (L.) infantum*, 285 pb para *L.(L.) amazonensi* y *L.(V.) braziliensis* 226 pb (Ilustraciones b y c Anexo 10.1.3.1) aunque no hubo correspondencia completa entre patrones de restricción por RFLP propuestos por los autores con nuestros resultados, atribuibles a ajustes metodológicos por lo cual se decidió confirmarlos por secuencia (Ilustración 15).

Para la optimización del protocolo de Garcia y col. se inició testeando cepas de *Leishmania (L.) amazonensis* y *Leishmania (L.) infantum* a 56,8 y 121,8 ng finales respectivamente; a 1; 1,5; 2 y 2,5 Mm de  $MgCl_2$  y 60°C de temperatura de hibridación (Ilustración d Anexo I). Posteriormente se testeó una concentración menor (22,4 ng) de ADN, se repitieron las

cuatro concentraciones de  $MgCl_2$  (1; 1,5; 2 y 2,5 Mm) además de 3 Mm y se elevó a 61°C la temperatura de temperatura de hibridación (Ilustración e Anexo I).



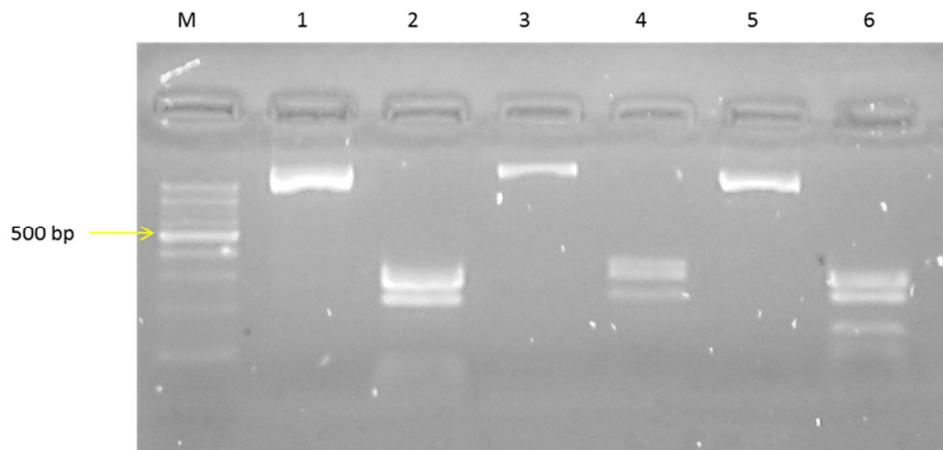
**Ilustración 15: Electroforesis en gel de Agarosa 2.5 % del producto de PCR-RFLP obtenido por el protocolo de Mini-exón**

Calles 1 y 2: bandas electroforéticas esperadas sin digerir de 434 pb y digerida de aproximadamente 337 y 108 pb de la especie *L. infantum* con enzima *Eae I*; calles 3 y 4: bandas electroforéticas esperadas sin digerir de aproximadamente 226 pb y digerida de 118 pb de la especie *L. braziliensis* con enzima *Hae III*; calles 5 y 6: bandas electroforéticas esperadas sin digerir de aproximadamente 285 pb y digeridas de aproximadamente 155 y 130 pb de la especie *L. amazonensis* con enzima *Eae I*. M: Marcador de Peso Molecular.

*Condiciones de reacción y perfil de ciclado establecidas.* Volumen final de reacción de 50 $\mu$ l, buffer de PCR 1X [Tris-HCl pH 8 200 mM; EDTA 0,1 mM; DTT 1mM; glicerol 50% (v/v)] (Invitrogen™),  $MgCl_2$  1 mM (Invitrogen™), DMSO 5% (Sigma™), dNTPmix 0,2mM (200 $\mu$ M de cada dNTP), primer sentido *hsp70*sen 0,5 $\mu$ M, primer antisentido *hsp70*ant 0,5 $\mu$ M (Tabla 1) y enzima Taq polimerasa 2 UI (Invitrogen™). El perfil de ciclado fue: desnaturalización inicial 94°C 4 min, 40 ciclos 94°C 35 seg, 61°C 1 min, 72°C 2 min y extensión final 72°C 10 min (Modificado a partir de Garcia et al. 2004).

Se obtuvo para las diferentes cepas un producto de aproximadamente 1600 pb mayor al esperado de 1300 pb que describen los autores (Garcia y col.2003), en cuanto a los patrones de restricción de cada especie se lograron bandas digeridas de tamaños aproximados sobre todo de los fragmentos mayores, que rondan entre 300 y 200pb aproximadamente; para los esperados de 100pb se obtuvo poca definición con una mala

resolución en general. Se secuenciaron los productos obtenidos para confirmación estas secuencias se analizaron por BLAST contra la base de datos de Genbank obteniéndose máxima identidad con cepas *L. (L.) infantum*, y *L. (L.) amazonensis* (Ilustración 16).



**Ilustración 16: Electroforesis en gel de Agarosa 2.5 % del producto de PCR-RFLP obtenido por el protocolo de *hsp70***

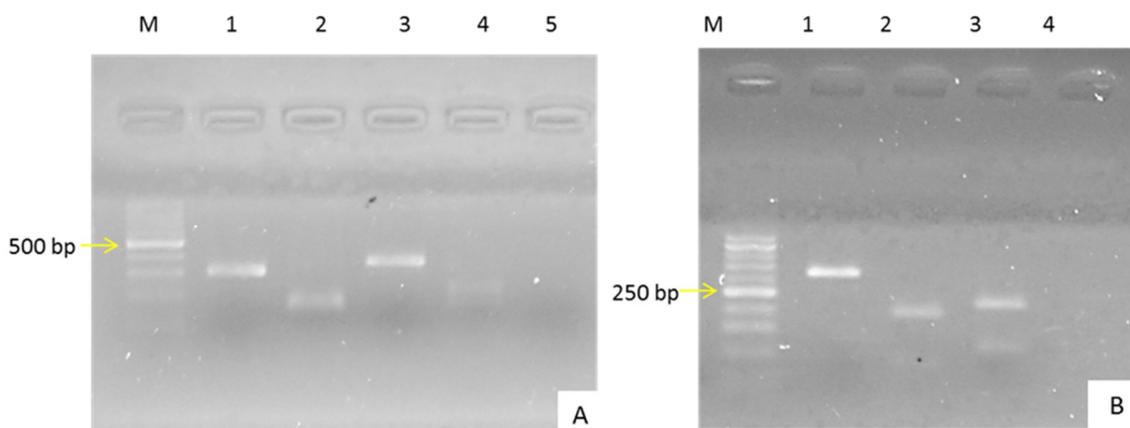
Calles 1 y 2: bandas electroforéticas esperadas sin digerir de aproximadamente 1300 pb y digeridas de la especie *L. (L.) amazonensis*; calles 3 y 4: bandas electroforéticas esperadas sin digerir aproximadamente 1300 pb y digeridas de la especie *L. (V.) braziliensis*; calles 5 y 6: bandas electroforéticas esperadas sin digerir de aproximadamente 1300 pb y digerida de la especie *L. (L.) infantum*. La enzima utilizada es *Hae III* M: Marcador de Peso Molecular

Para la optimización del protocolo de Schonian y col. se inició con la temperatura de hibridación sugerida por el autor, 53°C y se testaron concentraciones de 1, 1,5, 2 y 2,5 mM de MgCl<sub>2</sub> con 60 ng finales a reacción de *L. (L.) infantum* (Ilustración f Anexo). Se obtuvieron bandas esperadas, de buena intensidad y sin bandeos inespecíficos para todas las concentraciones de MgCl<sub>2</sub> excepto para la de 1Mm, por lo que se mantuvieron las condiciones de reacción y de ciclado testeándose la cepa de *L. (L.) amazonensis* con 100 ng totales de ADN blanco de reacción e inició la titulación de MgCl<sub>2</sub> en 1,5 Mm llegando a 3mM (Ilustración g Anexo).

*Condiciones de reacción y perfil de ciclado.* Volumen final de 50µl, buffer de PCR 1X [Tris-HCl pH8 200 mM; EDTA 0,1 mM; DTT 1mM; glicerol 50% (v/v)] (Invitrogen),

MgCl<sub>2</sub> 2,5 mM (Invitrogen), DMSO 2,5% (Sigma™), dNTPmix 0,2 mM (200µM de cada dNTP), primer sentido LITSR 0,5 µM, primer antisentido L5.8S 0,5 µM y enzima Taq polimerasa 1,4 UI (Invitrogen™). El perfil de ciclado fue: desnaturalización inicial 94°C 4 min, 35 ciclos 94°C 25 seg, 54°C 3 seg, 72°C 1 min y extensión final 72°C 10 min (modificado a partir de Schönian et al 2003).

Se obtuvo para las diferentes cepas un producto de un poco más de 300 pb de acuerdo con lo que describen los autores (Schönian y col.2003), en cuanto a los patrones de restricción de cada especie para *L. (V.) braziliensis* se logró solo una banda entre 200 y 100 pb que podría ser la esperada de 156 pb pero no se logra visualizar la banda esperada de 143 pb; para *L.(L.) amazonensis* se obtuvo una banda muy tenue en aproximadamente 200 pb y no se obtuvo o no alcanza a distinguirse la banda esperada de 142 pb, situación similar a lo observado con la especie anterior; para *L.(L.) infantum* se obtuvo para ambas enzimas un patrón de bandas de tamaños aproximados a las esperadas. Se secuenciaron los productos obtenidos para confirmación estas secuencias se analizaron por BLAST contra la base de datos de Genbank obteniéndose máxima identidad con cepas *L.(L.) infantum*, y *L.(L.) amazonensis* (Ilustración 17).



**Ilustración 17: Electroforesis en gel de Agarosa 2.5 % del producto de PCR-RFLP obtenido por el protocolo de ITS-1 a partir de cepas de referencia.**

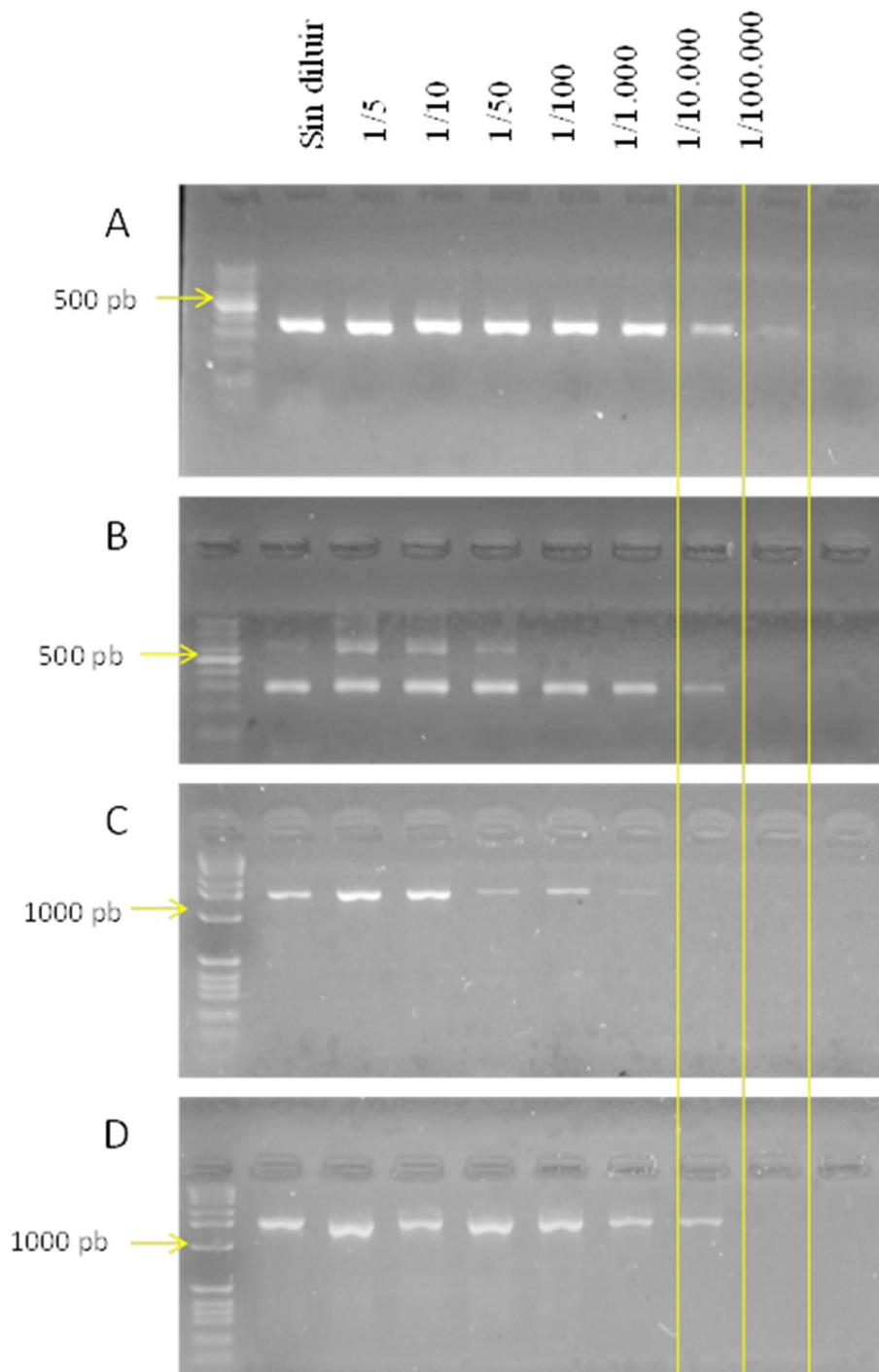
A: Calles 1 y 2: bandas electroforéticas sin digerir de 300 pb y digeridas de aproximadamente 156 y pb de la especie *L. (V.) braziliensis* con la enzima *HaeIII*; calles 3 y 4: bandas electroforéticas sin digerir de 328 pb y digeridas de aproximadamente 186 pb de la especie *L.(L.) amazonensis* con la enzima *HaeIII*. B: calle 1: banda electroforética sin digerir de 310 pb la especie *L.(L.) infantum*; calle 2: banda electroforética digerida de 184 pb con enzima *Hae III*; calle 3: bandas electroforéticas digeridas de 201 y 101 pb con la enzima *Rsa I*. M: Marcador de Peso Molecular.

---

### 6.1.3 ENSAYO DE LÍMITE TEÓRICO DE DETECCIÓN (LTD) DE PARÁSITOS

En el protocolo de amplificación de la región ITS-1 (Ilustración 18 A) se obtuvo el producto esperado para ambas especies de *Leishmania* hasta la dilución de 1/100.000, (0,00023 ng/ul para *L. (L.) amazonensis* y 0,00045 ng/ul *L.(V.) braziliensis*, mientras que en el protocolo de amplificación de la región de Mini-exón se obtuvo hasta la dilución 1/10.000 (0,0023 ng/ul y 0,0045 ng/ul para *L. amazonensis* y *L.braziliensis* respectivamente) (Ilustración 18 B); en el protocolo de *hsp70* se generó una amplificación diferencial que estuvo sujeta a la cepa testada: para *L. amazonensis* se obtuvo el producto esperado hasta la dilución de 1/1.000 (0,023 ng/ul), mientras que para *L. braziliensis* se obtuvo hasta la dilución 1/10.000 (0,0045ng/ul) (Ilustración 18 C y D).

Los productos de PCR obtenidos a partir de los tres protocolos con cepas de referencia se confirmaron por secuenciación validándose la especificidad para las especies de *Leishmania* descritas por los respectivos autores.



**Ilustración 18:** Comparación del límite teórico de detección de los protocolos de PCR a partir de diluciones seriadas de ADN de *Leishmania*.

A: bandas electroforéticas esperadas para *Leishmania (L.) amazonensis* de aproximadamente 328 pb a partir de la amplificación con el protocolo de ITS-1; B: bandas electroforéticas esperadas para *Leishmania (L.) amazonensis* de aproximadamente 285 pb a partir de la amplificación con el protocolo de Mini-exón; C y D: bandas electroforéticas esperadas de aproximadamente 1300 pb a partir de la amplificación con el protocolo de *hsp70*; C: *L. (L.) amazonensis*; D: *L. (V.) braziliensis*.

## 6.2 ESTUDIO REGIONAL: ANÁLISIS DE INFECCIÓN A PARTIR DE MUESTRAS DE ZONA ENDÉMICA DE LT Y DE ZONA EPIDÉMICA EMERGENTE DE LV DE LA PROVINCIA DE MISIONES

### 6.2.1 ENSAYOS DE DETECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DEL PARÁSITO POR PCR-RFLP

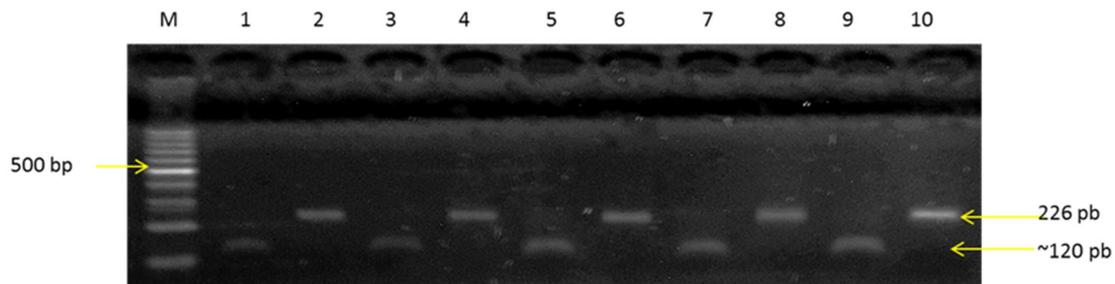
Las muestras se analizaron concomitantemente en el tiempo a medida que se optimizaron los protocolos de biología molecular. Como ya se describió en las consideraciones metodológicas, de manera cronológica en primera instancia se ajustó el protocolo de Mini-exón seguido por el protocolo de *hsp70* y por último el de ITS-1; al observarse que este último posee mayor sensibilidad en la detección/tipificación de *Leishmania*, se tomó la decisión de centrar el análisis de concordancia de pruebas diagnósticas a partir del cálculo del índice kappa entre los protocolos de Mini-exón e ITS-1, mediante el programa Epidat 4.0 (OPS) (Tabla 4).

Tabla 4: Resultados obtenidos por protocolos de Mini exón, ITS-1 y *hsp70* en muestras clínicas, clínico veterinarias y flebótomos e índices de concordancia entre resultados de Mini- exón e ITS-1.

<b>Procedencia</b>	<b>Positivos <i>Leishmania</i> Mini-exón</b>	<b>Positivos <i>Leishmania</i> ITS-1</b>	<b>Análisis de concordancia <math>k=</math> (IC 95%)</b>
Casos LC Norte de Misiones	16/16	15/16	0,8571 (0,53-1,13)
Flebótomos Posadas	2/57	4/57	0,6503 (0,20-1,163)
Flebótomos Iguazú	0/20	0/20	-
Casos LVC Posadas	9/11	10/11	0,6250 (-0,03-1,28)

Casos clínicos: Las 16 muestras de casos de LTA confirmados por frotis y/o histopatología resultaron positivas para *Leishmania* por el protocolo de Mini-exón y de la especie *L. (V.) braziliensis* por el ensayo de restricción sobre el producto de PCR con la enzima *Hae III* (Ilustración 19).

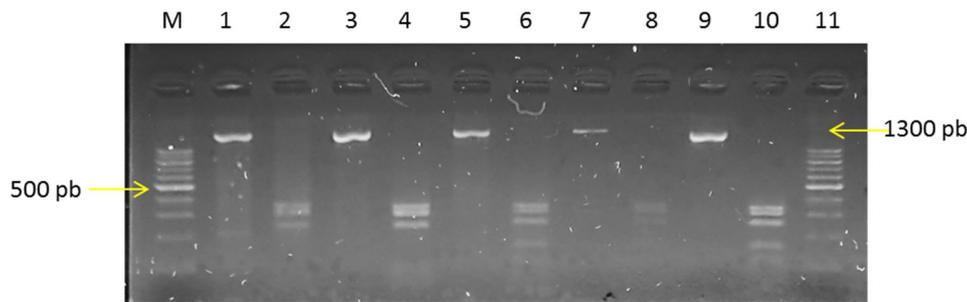
A fin de confirmar los productos obtenidos, tres de ellas fueron secuenciadas (números de acceso Genbank: JF720019, JF720020, JF720021); estas secuencias se analizaron por BLAST contra la base de datos de Genbank obteniéndose una homología de secuencia entre 97-99% con las secuencias de las cepas de referencia de *L. (V.) braziliensis* MHOM/BR/75/M2903 (X69441) y MHOM/BR/75/M2904 (FR798976).



**Ilustración 19: Electroforesis en gel de Agarosa 2.5 % del producto de PCR-RFLP obtenido por el protocolo de Mini-exón a partir de biopsias cutáneas.**

Calles 1-10 impares: Bandas electroforéticas digeridas con *Hae III* de 120 pb aproximadamente; calles 1-10 pares: bandas electroforéticas sin digerir de 226 pb. M: Marcador de Peso Molecular de 100 pb.

También se analizaron 5/16 muestras por el protocolo de *hsp70* resultando positivas para *Leishmania* y con un patrón de corte que presenta bandas de tamaño aproximado a los esperados a la especie *L.(V.) braziliensis* por restricción con la enzima *Hae III*; tres de estas 5 muestras son las positivas por PCR Mini-exón y confirmadas por secuenciación (Ilustración 20, calles 1-4).

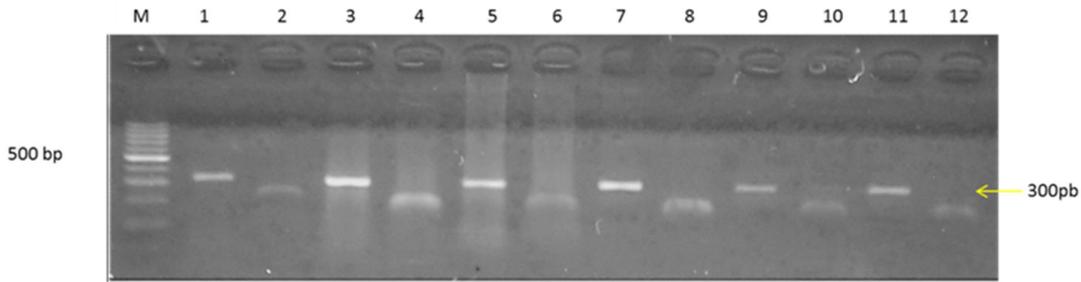


**Ilustración 20: Electroforesis en gel de Agarosa 2.5 % del producto de PCR-RFLP obtenido por el protocolo de *hsp70* a partir de diferentes tipos de muestras.**

Calles 1-4: bandas electroforéticas sin digerir y digeridas por HaeIII obtenidos a partir de biopsia de LC. El patrón de corte observado presenta bandas de tamaño aproximado a los esperados para la especie *L. (V.) braziliensis* (340, 300 y 220 pb); calles 5 y 6: bandas electroforéticas sin digerir y digeridas por HaeIII obtenidos a partir de muestra de LVC. El patrón de corte observado presenta bandas de tamaño aproximado a los esperados para la especie *Leishmania infantum* (320, 300, 270 y 150 bp); calles 7 y 8: bandas electroforéticas sin digerir y digeridas por HaeIII obtenido a partir de lote de *Lu. longipalpis* el patrón obtenido no es claro por la poca resolución y lo débil de las bandas); 9 y 10: Banda sin digerir y digerida de cultivo de *L. (L.) infantum*. El patrón de corte observado corresponde a la especie *L.(L.) infantum*. M: Marcador de peso molecular de 100 pb.

Con el protocolo de ITS-1 15/16 muestras resultaron positivas para *Leishmania* y por restricción con HaeIII se obtuvo una de las bandas de tamaño esperado para la especie *L. (V.) braziliensis* (Ilustración 21, calles 3-12). Se secuenciaron doce muestras (números de acceso Genbank: JX448547, JX448548, JX448549, KU550586, KU550587, KU550588, KU550589, KU550590, KU550591, KU550592, KU550593, KU550594), de tres de las cuales también cuentan con secuencia para Mini-exón y fueron a su vez positivas para *hsp70*; obteniéndose en todas una homología de secuencia del 100% con secuencias de diferentes cepas de *L. (V.) braziliensis* depositadas en Genbank (FN398336, JQ061322, FJ753385).

*Análisis de infección en Phlebotominae*: todos los lotes de flebótomos provenientes de la ciudad de Puerto Iguazú resultaron negativos para infección por el protocolo de Mini-exón; de los 57 lotes *Lu. longipalpis* provenientes de la ciudad de Posadas 2 analizados resultaron positivos para *Leishmania* mediante PCR de Mini Exón y corresponderían a la especie *L.(L.)infantum* por patrones de restricción obtenidos de la digestión de ese fragmento con la enzima *EaeI* (Ilustración 22, calles 5 y 6); uno de los lotes fue además confirmado por secuenciación (número de acceso Genbank GU565337) obteniéndose una identidad de 100% con diferentes aislados de *L. (L.)infantum*.



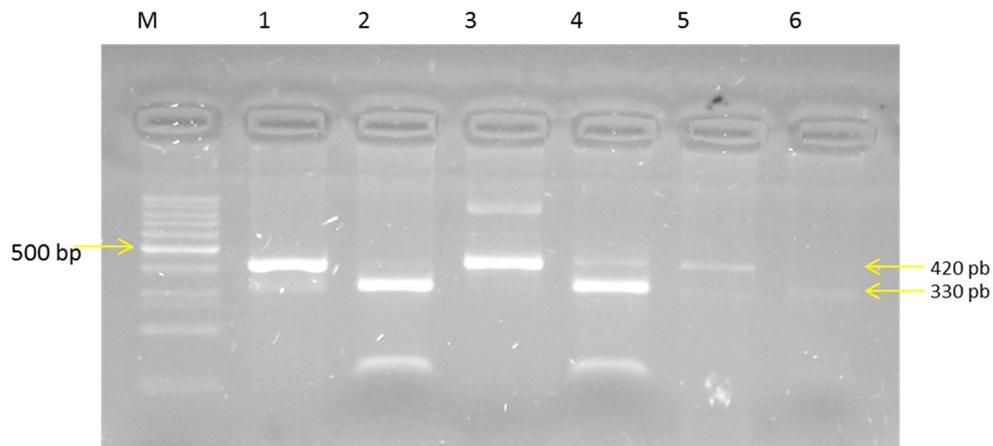
**Ilustración 21:** Electroforesis en gel de Agarosa 2.5 % del producto de PCR-RFLP obtenido por el protocolo de ITS-1 a partir de diferentes muestras.

Calles 1 y 2: bandas electroforéticas sin digerir (311 pb) y digeridas con HaeIII de aproximadamente 184 pb obtenidos a partir de un lote de *Lu. longipalpis*. El patrón de corte observado correspondería a la especie *Leishmania (L.) infantum*. Calles 3 a 12: bandas electroforéticas sin digerir y digerida con HaeIII de aproximadamente 156 pb obtenidas a partir de biopsias cutáneas. El patrón de corte observado correspondería a la especie *Leishmania (V.) braziliensis*; M: Marcador de peso molecular de 100 pb.

El índice de infección obtenido fue de 3,5% y el índice mínimo de infección de 0,39% (considerando al menos un flebótomo infectado en cada lote). Estos dos lotes positivos se analizaron por el protocolo de *hsp70* resultando positivos uno de ellos para la especie *L. (L.) infantum* siendo el mismo lote confirmado por secuencia para Mini-exón (Ilustración 20, calles 7 y 8).

Los lotes de flebótomos provenientes de Iguazú analizados con ITS-1 resultaron todos negativos para infección por *Leishmania*; cuando se repitió el análisis de los 57 lotes de la ciudad de Posadas por este protocolo, 4/57 resultaron positivos para *Leishmania*, los dos previamente positivos por Mini-exón y dos en los cuales no se había detectado la presencia de ADN del parásito (Ilustración, 21 calles 1 y 2). Si bien se obtuvo para ellos solo una banda de tamaño aproximado al esperado por restricción con *Hae III* para *L. infantum*, tres de estos lotes se confirmaron por secuencia (números de acceso Genbank JX448544JX448545, JX448546) obteniéndose identidades de 99 y 100% con diferentes cepas de *L.(L.) infantum* alojadas en Genbank. El índice de infección fue de 7,01% y el índice mínimo de infección de 0,79%.

Casos caninos de LVC: Nueve de las 11 muestras de canes resultaron positivas por el protocolo de Mini-exón para *Leishmania* y de la especie *L. (L.) infantum* por restricción con la enzima *EaeI* (Ilustración 22, calles 1-4).



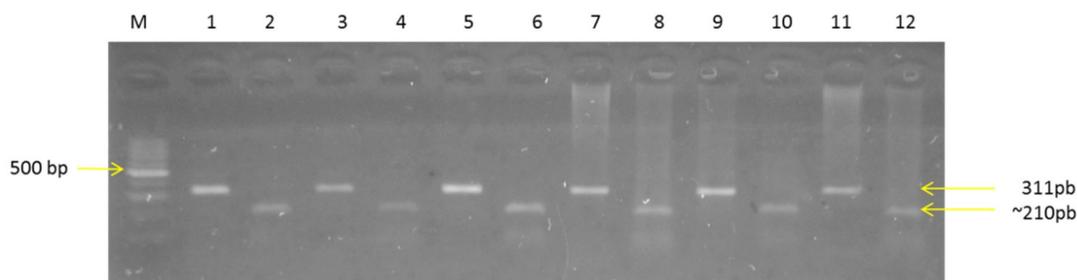
**Ilustración 22: Electroforesis en gel de Agarosa 2.5 % del producto de PCR-RFLP obtenido por el protocolo de Mini-exón a partir de muestras caninas y de vector.**

Calles 1 a 4: bandas electroforéticas sin digerir y digeridas con *EaeI* (330 y 108 pb) obtenidos a partir de casos de LVC; Calles 5 y 6: bandas electroforéticas tenues sin digerir y digeridas con *EaeI* obtenidas a partir de un lote de *Lu. longipalpis*. MW: Marcador de peso molecular de 100 pb. El patrón de corte observado corresponde a la especie *L(L.) infantum*.

Se eligieron las dos muestras positivas de mayor intensidad y se confirmó el producto obtenido por secuencia (números de acceso Genbank GU565338; GU565339) obteniéndose identidad de 100% cuando se analizaron por BLAST contra secuencias alojadas en Genbank. Tres de las muestras positivas fueron analizadas con el protocolo *hsp70* obteniéndose dos muestras positivas para la especie antes mencionada (Ilustración 20 calles 5 y 6). Cuando se realizaron los análisis de las 11 muestras por el protocolo de ITS-1, 10/11 resultaron positivas para *Leishmania sp* (9 de ellas positivas por ME) y corresponderían a *L.(L.) infantum* por restricción con la enzima *RsaI* (Ilustración 23), en este caso se secuenciaron todas las muestras positivas para confirmar el producto obtenido (números de acceso Genbank JX448535, JX448536, JX448537, KU550595, KU550596, KU550597, KU550598, KU550599, KU550600, KU550601) a partir de todas las secuencias se obtuvo 100% de identidad con diferentes cepas de *L.(L.) infantum*.

La concordancia entre los protocolos de Mini-exón e ITS-1 según la tabla de valoración de Landis y Koch para muestras de casos de LC es muy buena, mientras que la obtenida para lotes de flebotomos y muestras de LVC es buena. En lo particular el protocolo ITS-1 no fue

capaz de detectar/tipificar una muestra clínica, pero generó resultados positivos nóveles (no detectados por Mini-exón) para dos lotes de flebótomos y un caso de LVC (Tabla 4).



**Ilustración 23:** Electroforesis en gel de Agarosa 2.5 % del producto de PCR-RFLP obtenido por el protocolo de ITS-1 a partir de muestras caninas.

Calles 1 a 12: bandas electroforéticas sin digerir y una de las digeridas esperadas (210 pb) con la enzima *Rsa I*. El patrón de corte observado corresponde a la especie *L. (L.) infantum*. MW: Marcador de peso molecular de 100 pb.

## 6.3 ESTUDIO MICROFOCAL: ANÁLISIS DE TASA DE INFECCIÓN EN FLEBÓTOMOS Y CANES CAPTURADOS EN AAV Y SVC

### 6.3.1 CARACTERIZACIÓN DEL MACROHABITAT: ÁREAS.

Se encontraron diferencias entre los valores de medias obtenidos para las 5 variables de cada área (Anexo III.1), solamente resultaron significativas las diferencias entre medias correspondientes a la variable “proporción de canes positivos por rk39” (Proprk39) que resultó mayor en áreas AAV. La variable “densidad de vegetación” (Densidad\_veg) no se incluyó en el análisis por presentar una media de 0,00 en áreas ASV (Tabla 5).

Las variables contempladas se encuentran relacionadas entre sí, dado que en el ordenamiento producido por el ACP los dos primeros autovalores o componentes principales explican el 81% de la variabilidad total.

Tabla 5. Resultados de Prueba T de diferencias entre medias de variables de áreas AAV Y ASV

Variable	Grupo 1	Grupo 2	n=1	n=2	Media 1	Media 2	T*	P valor
Calles_ tierra	AAV	ASV	4	2	1,75	2,00	-0,13	0,9053
Canes_mzn	AAV	ASV	4	2	15,25	6,50	1,42	0,2293
Dist_agua_mzn	AAV	ASV	4	2	1641,00	469,50	2,13	0,1004
Prop_rkP39	AAV	ASV	4	2	0,33	0,08	3,00	0,0398**

Las referencias correspondientes de las variables se encuentran en la tabla 2 de Materiales y Métodos y en texto.\* Estadístico corregido por no presentarse homogeneidad de varianzas para esas variables. \*\* Diferencias significativas entre medias.

El primer componente puede describirse como la capacidad de las áreas para mantener los diferentes estadios del ciclo biológico del vector ya que se asocia positivamente con las variables “densidad de vegetación” y “mayor número de canes” que contribuyen positivamente con mayor peso al autovector, seguidas por “distancia a cuerpos de agua”. En el segundo componente la variable que contribuye con la mayor carga positiva al autovector es “calles de tierra” seguida de “proporción de canes positivos por rk” (Tabla 6) este componente separa al área AAV 229 de 409 (ASV) y 281 (AAV), aunque no parece haber un ordenamiento claro de las manzanas estudiadas en áreas sin vector y áreas sin captura del vector respecto a las variables (Gráfico 1).

Tabla 6. Análisis de Componentes Principales sobre variables ambientales de áreas AAV y ASV.

Variables	<i>Autovectores</i>		<i>Correlaciones con variables originales</i>	
	e1	e2	CP 1	CP 2
Densidad_veg	0,53	0,30	0,85	0,38
calles_tierra	-0,27	0,68	-0,42	0,85
canes_mzn	0,54	-0,02	0,86	-0,03
Dist_agua_mzn	0,47	-0,36	0,75	-0,45
[Prop_rk39]	0,36	0,56	0,58	0,69

La correlación cofenética obtenida fue de 0,942.

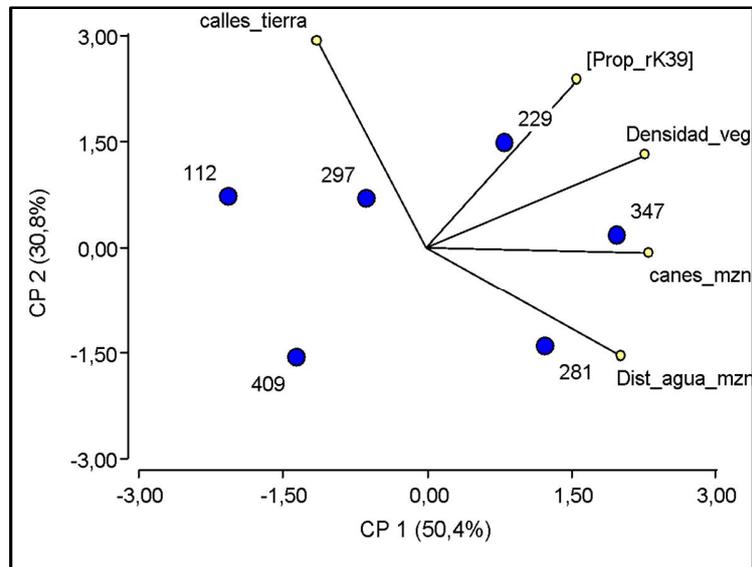


Gráfico 1: Ordenamiento de las áreas alta abundancia y sin presencia del vector. Biplot.

Las variables están descritas en Materiales y Métodos, la asociación entre ellas descritas en texto. Los porcentajes de varianza explicada se indican entre paréntesis. 297, 281, 347 y 229 son AAV; 409 y 112 son ASV.

### 6.3.2 CARACTERIZACIÓN DEL MICROHABITAT. VIVIENDAS

Se encontraron diferencias entre los valores de medias obtenidos para las 12 variables tomadas en viviendas de alta abundancia y sin presencia del vector (Anexo III.2). Solo resultaron significativas las correspondientes a las variables “Distancia a cuerpo de agua” (D\_agua) y “Número de especies de plantas” (sp pla) siendo ambas medias mayores en viviendas provenientes de áreas AAV; las variables “número de macetas”(macetas) y “superficie cubierta de tierra” (tierra) no se incluyeron en el análisis por presentar una media de 0,00 en ASV (Tabla 7).

**Tabla 7. Resultados de Prueba T para ver diferencias entre medias de variables tomadas en viviendas provenientes de áreas AAV y ASV**

Variable	Grupo 1	Grupo 2	n=1	n=2	Media1	Media2	T*	p valor
d_copa	AAV	ASV	27	11	5,33	9,45	0,91	0,3833
d_agua	AAV	ASV	27	11	1593,00	589,45	4,87	0,0000(**)
Canes	AAV	ASV	27	11	2,00	2,73	-1,30	0,2022
gallinas	AAV	ASV	27	11	1,93	2,91	-0,47	0,6427
sp_arbol	AAV	ASV	27	11	3,48	3,00	0,59	0,5582
sp_arb	AAV	ASV	27	11	0,37	0,27	0,43	0,6694
arboles	AAV	ASV	27	11	4,04	3,00	0,41	0,6826
t_p	AAV	ASV	27	11	163,26	262,55	-1,61	0,1351
veg_m2	AAV	ASV	27	11	29,19	64,38	-0,96	0,3677
sp pl	AAV	ASV	27	11	1,30	0,36	2,45	0,0197(**)

Las referencias correspondientes de las variables se encuentran en la tabla 2 de materiales y métodos y en texto.\*Estadístico corregido por no presentarse homogeneidad de varianzas para esas variables. \*\* Diferencias significativas entre medias.

Las doce variables se encuentran relacionadas entre sí dado que en el ordenamiento producido por el ACP, los tres primeros autovalores de los componentes principales explican 67% de la variabilidad total. La Correlación cofenética obtenida fue 0,963.

El primer componente está relacionado principalmente con diferentes características de la vegetación presente en las viviendas ya que se asocia positivamente con las variables “número de árboles” (árboles) y “superficie cubierta por vegetación” (veg\_m2) que contribuyen positivamente con mayor peso al autovector. Otras variables de vegetación pero que contribuyen con menor carga son “números de especies de árboles” (sp arb), “diámetros de copa de árboles” (d\_copa), también este componente está asociado positivamente con la variable “números de gallinas” (gallinas) y con menos carga con “superficie de suelo descubierto” (tierra) ambas relacionada con la caracterización del domicilio o peridomicilio” (Tabla 8).

Tabla 8 Análisis de Componentes Principales sobre variables ambientales de viviendas correspondientes a AAV y ASV.

<i>Variables</i>	<i>Autovectores</i>			<i>Correlaciones con las variables originales</i>		
	e1	e2	e3	<u>CP 1</u>	CP 2	CP 3
t_p	0,20	-0,35	-0,02	0,38	-0,54	-0,02
D_agua	-0,16	0,38	0,01	-0,31	0,58	0,01
macetas	-0,03	0,27	0,43	-0,05	0,41	0,59
Canes	0,08	-0,34	0,33	0,15	-0,53	0,45
gallinas	0,42	0,12	-0,28	0,81	0,18	-0,38
veg_m2	0,45	-0,13	0,18	0,88	-0,20	0,25
sp_arbol	0,35	0,17	0,28	0,69	0,26	0,38
sp_arb	1,1E-03	0,27	0,41	2,2E-03	0,41	0,56
sp_pl	0,07	0,38	0,34	0,13	0,58	0,47
arboles	0,45	0,19	-0,16	0,89	0,29	-0,22
tierra	0,33	0,34	-0,35	0,64	0,52	-0,47
d_copa	0,33	-0,34	0,28	0,66	-0,52	0,38

Se consideraron cargas al autovector mayores a 0.30 con coeficientes de correlación con variables originales mayores a 0,40.

El segundo componente puede describirse como características de domicilio y peridomicilio ya que está asociado positivamente a las variables “distancia a cuerpos de agua” (D\_agua), “superficie cubierta de tierra/pasto” (t\_p), “números de canes por vivienda” (canes) y “superficie de suelo descubierto” (tierra). Variables de vegetación

como número de especies de plantas (sp pl) y diámetro de copa (d\_copa) también aportan a este componente. Igualmente cabe destacar que los pesos aportados por todas las variables en el componente 2 van de moderados a bajos (Tabla 8). En el tercer componente las variables con asociación positiva más fuerte son “número de macetas” (macetas) y “número especies de arbustos” (sp arb) en peridomicilio, seguida de “número de especies de plantas” (sp pl) y “número de canes” (Tabla 8).

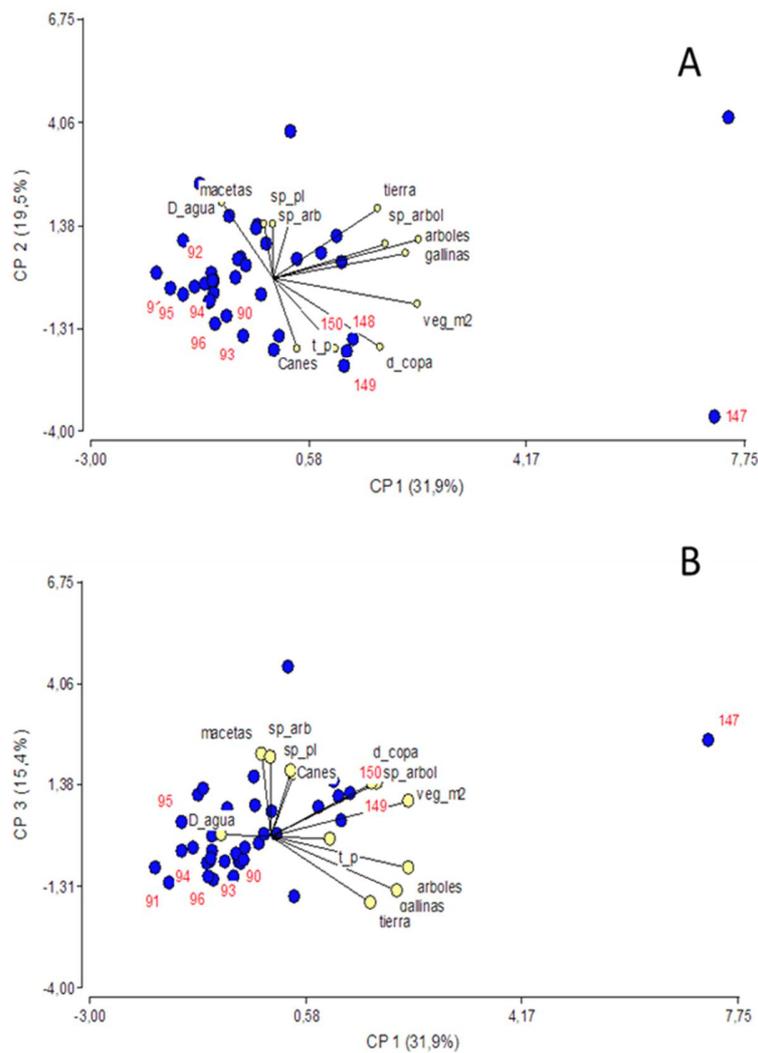


Gráfico 2: Ordenamiento de viviendas de áreas de alta abundancia y sin presencia del vector. Biplot.

A: CP1 vs CP2; B: CP1 vs CP3 Las variables están descriptas en Materiales y Métodos, la asociación entre ellas descriptas en texto. Los porcentajes de varianza explicada se indican entre paréntesis. Las viviendas correspondientes a ASV (de 90 -96 pertenecientes a manzana 409 y de 147 a 150 a manzana 112) están resaltadas en rojo

A partir del gráfico Biplot 2.A se observa que el primer componente agrupa a las viviendas pertenecientes a ASV que se caracterizan en general por valores bajos de “superficie de suelo descubierto” (tierra), “números de especies de árboles” (sp arboles), “número de árboles” (arboles) , “número de gallinas” (gallinas) y “superficie cubierta por vegetación” (veg\_m2). La excepción a esto se observa en tres viviendas de ASV ya que se encuentran asociadas a mayores superficies de tierra pasto y con menor “número de macetas” y “distancias a cuerpos de agua” y la vivienda 147 (perteneciente al ASV 409) para la cual no se observa relación alguna con las variables bajo análisis.

En el gráfico de Biplot 2.B se observa que en general viviendas de ASV se caracterizan por menores valores de las variables “diámetros de copa”, “números de especies de árboles” y “superficies cubiertas por vegetación” mientras que algunas viviendas de una de las áreas ASV (150 y 149) presentan valores más altos de esas mismas variables, el resto de la nube de puntos mantienen un arreglo similar.

---

### 6.3.3 MUESTREO BASE Y AL AÑO DE VECTOR

En el muestreo base se encontró presencia de flebótomos en tres de las seis áreas estudiadas (dos AAV y una AMV); se capturaron un total de 844 *Lu. longipalpis*, 149 resultaron hembras, de las cuales 137 fueron destinadas a análisis moleculares organizadas en 15 lotes de trabajo. La relación de sexo M:H fue de 5,66:1. La abundancia promedio y desvío estándar de las 2 AAV y de la AMV fueron de AAV<sub>1</sub>  $\bar{x}$ = 101,67 DE=±223,62; AAV<sub>2</sub>  $\bar{x}$ = 5,07 DE=±17,27 y AMV<sub>1</sub>  $\bar{x}$ = 8,15 DE=± 25,32.

Se repitieron los muestreos en los sitios un año después y se registró presencia de flebótomos en cuatro áreas, tres de ellas coincidentes con lo observado en el muestreo base y además en el AMV en el cual no se había registrado presencia en el muestreo base. En este muestreo se capturaron 171 flebótomos de la especie *Lu. longipalpis*, 59 hembras todas ellas destinadas a análisis de infección, obteniéndose 12 lotes de trabajo. Cabe destacar que

después de la descripción inicial del brote se llevaron a cabo varias acciones en la ciudad de Posadas y la abundancia de viviendas con *Lu. Longipalpis*, y a su vez su abundancia por vivienda, tendió a disminuir. La relación de sexos M:H fue de 5,89:1 y las abundancias promedio y desvíos estándar de áreas resultaron  $AAV_1 \chi^2 = 22$   $DE = \pm 46,9$ ;  $AAV_2 \chi^2 = 2,79$   $DE = \pm 7,5$  y  $AMV_1 \chi^2 = 1,1$   $DE = \pm 3,4$ ;  $AMV_2 \chi^2 = 0,25$   $DE = \pm 0,55$ , respectivamente.

Los resultados positivos de PCR con blanco en el gen *cacophony* (control de inhibición de reacción) justificaron la inclusión de todas las muestras de vector correspondientes al muestreo base y al año. Sin embargo, los análisis de infección por PCR-RFLP de *Lu. longipalpis*, resultaron negativos para *Leishmania* por ambos protocolos empleados, ME e ITS-1 (Tabla 9).

Tabla 9. Hembras de *Lu. longipalpis* capturadas en muestreo base diciembre 2009 enero de 2010 y muestreo al año en diciembre de 2010 en la ciudad de Posadas y lotes destinados a análisis de infección

Área	Muestreo base	Muestreo al año
	Total hembras/ n°lotes a PCR	Total hembras/ n°lotes a PCR
AAV <sub>1</sub>	92/10	48/5
AAV <sub>2</sub>	16/2	10/2
AMV <sub>1</sub>	29/3	6/2
AMV <sub>2</sub>	0/-	4/3
ASV <sub>1</sub>	0/-	0/-
ASV <sub>2</sub>	0/-	0/-

AAV: Alta Abundancia del vector (AAV<sub>1</sub>: 297; AAV<sub>2</sub>: 281); AMV: Abundancia Moderada del Vector (AMV<sub>1</sub>:347; AMV<sub>2</sub>:229); ASV: Áreas Sin Captura del vector (ASV<sub>1</sub>:409 ASV<sub>2</sub>:112).

---

#### 6.3.4 MUESTREO BASE DE CANES

Se tomaron muestras de sangre entera de 74 canes, en dos de ellas por el poco volumen recuperado no se pudieron realizar análisis serológicos y se decidió que sean destinadas solamente a análisis moleculares, de esas 72 muestras 22 resultaron positivas (22/72) por el ensayo de Inmunocromatografía rk39, representando el 30,5 % del total (Tabla 10 y Gráfico 3); la edad promedio de los canes reactivos fue de 6,2 años, mientras que para los negativos fue de 4,4 años.

Partiendo de las 74 muestras de sangre para una de ellas el volumen recuperado de capa enriquecida de glóbulos blancos no permitió llevar a cabo el análisis de PCR. Los resultados de infección obtenidos a partir de capa de glóbulos blancos (GB) mediante PCR fueron 3/73 positivos (4,1%) por el protocolo de Mini-exón (dos canes de 8 meses y uno de 9 años) y de 4/73 positivos (5,5%) por el protocolo de ITS-1 (dos canes de 8 meses, uno de 3 y uno de 9 años). Fueron tres los canes positivos por ambos protocolos, dos seropositivos por rk39 y un seronegativo confirmado por secuencia (números de acceso Genbank JX448538), el can que fue únicamente positivo por ITS-1 fue seronegativo para rk39 (Tabla 10).

El índice kappa obtenido para evaluar la concordancia entre ambas técnicas de detección/tipificación para este tipo de muestras fue de  $k= 0,85$ ; IC95% (0,5616-1,1386), correspondiendo a una fuerza de concordancia muy buena.

Tabla 10. Resultados de análisis de rk 39 y PCR-RFLP a partir de muestras caninas de sangre entera discriminados por área.

Área	rk(+)*/n total	ME GB** (+)/ n total	ITS-1 GB** (+)/n total
AAV <sub>1</sub>	3/3	0/3	0/3
AAV <sub>2</sub>	4/19	0/19	0/19
AMV <sub>1</sub>	7/18	0/18	0/18
AMV <sub>2</sub>	7/20	3/20	4/20
ASV <sub>1</sub>	0/7	0/7	0/7
ASV <sub>2</sub>	1/6	0/6	0/6
	22/72*** (30,5%)	3/73 (4,1%)	4/73 (5,5%)

\*a partir de sangre entera.\*\* GB: capa enriquecida de glóbulos blancos generada a partir de muestras de sangre entera.

ME: Mini-exón; ITS-1 internal transcribed spacer. En una de las 74 muestras de sangre tomadas a partir de 74 canes no se pudo obtener la fracción de glóbulos blancos por escasez de volumen obtenido.

\*\*\* no hay datos de resultado por rk39 para dos muestras

A partir de los 41 canes para los que se obtuvo muestras de hisopado ocular (H), se realizó también examen serológico mediante rk39 en 39 de ellos, de los cuales nueve resultaron positivos representando el 23,1% del total . En dos muestras no se realizaron los análisis de serología. Los resultados de infección por PCR-RFLP fueron de 1 muestra positiva (2,4%) (can de 8 meses) por el protocolo de ME y 12 positivas (29,3%) por el protocolo de ITS-1 (Tabla 11).

**Tabla 11 Resultados de infección detectados mediante PCR-RFLP en muestras de hisopado de conjuntiva discriminados por área.**

Área	rk(+)*/n total	ME h** (+)/ n total	ITS-1 h** (+)/n total
AAV <sub>2</sub>	3/17	0/17	1/17
AMV <sub>1</sub>	3/9	0/10	4/10
AMV <sub>2</sub>	3/10	1/11	4/11
ASV <sub>1</sub>	0/3	0/3	3/3
	9/39 (23,1%)	1/41(2,4%)	12/41(29,3%)

\*A partir de sangre entera, para dos canes no se tiene el dato. \*\* A partir de hisopado del can al que previamente se le tomo muestra de sangre entera.

El can positivo por ambos protocolos fue también seropositivo por rk39. De los 11 positivos por ITS-1 restantes, cuatro fueron reactivos por rk39 de los cuales tres confirmados por secuencia (números de acceso Genbank JX448540, JX448541JX448542)6 seronegativos de los cuales 2 confirmados por secuencia (números de acceso Genbank JX448539, JX4485343) y el can restante para el cual no se cuenta con resultado de rk39. En el contexto de este análisis la edad promedio de los infectados fue de 4,7 años, mientras que para los no infectados fue de 5,6 años. El índice kappa obtenido para evaluar la concordancia entre ambas técnicas de detección/tipificación para este tipo de muestras fue de  $k= 0,11$ ; IC95% (-0,0937-0,3216), lo que corresponde a una fuerza de concordancia pobre.

Las proporciones de canes totales infectados y detectados por PCR por ambos protocolos y tipos de muestra en AAV fue de 0,05 IC95% (0,0001-0,23), en AMV de 0,26 (0,13-0,43) y ASV 0,23 (0,05- 0,53).Se encontraron diferencias significativas entre las proporciones de infectados obtenidas entre AAV y AMV ( $p=0,04$ ). Si no se considera la subclasificación

arbitraria de AMV incorporada en este trabajo, y se tratan los datos como AAV en su totalidad, la proporción de positivos es de 0,21 y la diferencia no es significativa ( $p=1$ ) respecto a lo encontrado en perros positivos de ASV (0,23).

#### 6.3.5 ANÁLISIS DE ASOCIACIÓN ENTRE TÉCNICAS DE DETECCIÓN Y TIPOS DE MUESTRAS DE CANES

Se analizaron los datos obtenidos (rk39, Mini-exón e ITS-1) a partir de 38 canes (muestras de GB y H) mediante tablas de contingencia 2x2 y prueba exacta de Fisher. No se encontró asociación significativa entre canes positivos por rk39 y positivos por Mini-exón e ITS-1 para ambos tipos de muestras (GB y H). En relación al protocolo de ITS-1 a partir de H, cabe destacar que se encontró una asociación marginal entre este y rk39 ya que se hubiese observado asociación estadística si el nivel de confianza hubiese sido fijado en 90% con un  $p=0,1$  dado que se obtuvo  $p=0,08$  (Tabla 12).

Cuando se estudió la asociación entre positivos de ambos protocolos de PCR y los diferentes tipos de muestras se encontró asociación entre positivos obtenidos a partir de glóbulos blancos por ambos protocolos de PCR Mini-exón e ITS-1 ( $p=0,004$ ); en cuanto a positivos obtenidos a partir de glóbulos blancos por Mini-exón frente a lo obtenido por ITS-1 en hisopado se observó una asociación marginal ( $p=0,07$ ), ocurriendo lo mismo para el caso inverso.

En cuanto a asociación de positivos obtenido por Mini-exón en muestras de hisopados *versus* positivos obtenidos por ITS-1 en glóbulos blancos podría considerarse asociación solamente con nivel de confianza de 90% ( $p=0,07$ ); no se encontró asociación entre positivos obtenidos a partir de hisopados por ambas técnicas de PCR (Tabla 12).

Finalmente, no se encontró asociación entre resultados positivos por ITS-1 a partir de las dos muestras caninas provenientes de cada individuo, en cambio sí se vieron asociados los resultados positivos a partir de H y GB cuando el protocolo de PCR empleado fue el de Mini-exón ( $p=0,05$ ) (Tabla 13).

Tabla 12. Análisis de asociación de la técnica de rk39 *versus* los protocolos de PCR ME e ITS-1 para ambos tipos de muestras

Positivos/muestras	
Positivos /muestras	rk
	9/38
ME GB 2/38	p=0,42
ME H 1/38	p=0,23
ITS-1 GB 3/38	p=0,99
ITS-1 H 11/38	p=0,08

Tabla 13. Análisis de asociación entre los protocolos de PCR ME e ITS-1 y para ambos tipos de muestras

Positivos/muestras			
Positivos /muestras	ITS-1 GB	ITS-1 H	ME H
	3/38	11/38	1/38
ME GB 2/38	p=0,004	p= 0,07	0,05
ME H 1/38	p=0,07*	p=0,28	-
ITS-1 H 11/38	p=0,19	-	

### 6.3.6 ANÁLISIS DE REGRESIÓN LOGÍSTICA

Los valores que surgen de analizar la asociación entre positividad por rk39 respecto de edad canina y la positividad por ITS-1H, se realizaron a partir de información de 36 canes y se detallan en Tabla 14.

Tabla 14. Análisis de asociación entre canes seroreactivos o positivos por PCR con la edad Canina

Parámetros	Est.	O.R.	LI (95%)	LS(95%)	p-valor
Constante	-3,25	0,04	0,01	0,28	0,0014
ITS-1 <sub>H</sub>	2,00	7,41	1,00	55,05	0,0502
edad	0,22	1,25	1,02	1,53	0,0306

En el caso de la edad, la probabilidad de que una muestra sea positiva por rk39 aumenta a medida que se incrementa la edad del perro (p valor=0,030), y si la diferencia entre canes es de 1 año la chance de positividad de rk39 es 1,25 veces más en el can mayor (OR=1,25; LI 1,02-1,53 LS).

El valor de 2,00 del parámetro  $\beta_1$  para ITS-1<sub>H</sub> indicaría que la probabilidad de que una muestra sea positiva por serología aumenta significativamente (p valor=0,050) si la muestra de hisopado de conjuntiva es positiva, y esto ocurre con una chance de al menos 1 vez (OR=7,41; LI 1,00-55,05 LS).

## 6.4 DESCRIPCIÓN DE DINÁMICA ANUAL Y ACTIVIDAD HORARIA DE *LUTZOMYIA LONGIPALPIS*

### 6.4.1 DINÁMICA ANUAL

El esfuerzo de captura total fue de 48 trampas/noche considerando los dos sitios, ambas noches de muestreo y los 12 meses de captura. Se capturaron en total 698 flebótomos pertenecientes a la especie *Lu. longipalpis*, de los cuales 604 fueron machos (86,5%) y 94 hembras (13,5%), con una relación macho/hembra de 5,49/1.

Se observó un patrón bimodal durante el año de muestreo, con una disminución de la abundancia promedio durante el trimestre invernal y también en los meses más cálidos del verano de 2010, con dos picos de actividad uno en marzo de 2009 y el otro en diciembre del mismo año (Gráfico 3).

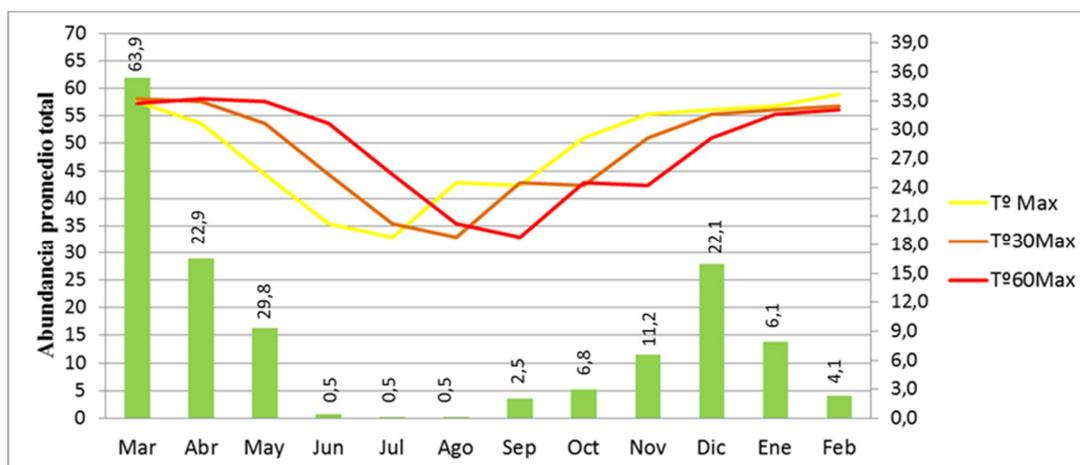


Gráfico 3: Abundancia promedio trampa/noche de *Lu. longipalpis* en Posadas, Misiones 2009-2010.

Las líneas representan la temperatura máxima promedio (°C) durante el muestreo y 30 y 60 días previos al mismo. Los valores sobre las barras corresponden al Desvío estándar.

No se prosiguió con el muestreo por un año más por las razones descriptas en materiales y métodos. También, debido a la presencia de vector en el peridomicilio y al incremento de casos caninos y humanos en la ciudad, en coordinación con el Programa Nacional se decidió interrumpir la captura para permitir una intervención antivectorial por razones éticas.

Las medidas resumen de las doce abundancias promedio con las que se trabajó se encuentran detalladas en Tabla 15.

Tabla 15. Medidas de estadística descriptiva a partir de las abundancias promedio trampa/noche de *Lutzomyia longipalpis* correspondientes a los doce meses de muestreo(N).

Variable	N	Media	D.E.	Mín	Máx	Mediana
A prom t/n	12	14,58	18,02	0	62	8,5
H t/n	12	1,98	2,26	0,25	7,75	1
M t/n	12	12,58	16,69	0	58,75	7,25

A prom t/n: Abundancia promedio de flebótomos trampa/noche; H t/n: Abundancia promedio de hembras trampa/ noche; M t/n: Abundancia promedio de machos trampa/ noche. Min: valores mínimos de las abundancias promedio; Max: valores máximos de las abundancias promedio.

El análisis de las variables (de abundancia y meteorológicas) mediante gráficos de boxplot permitió observar que tanto las abundancias promedio total, de hembras y machos, como así también la variable meteorológica precipitación, presentaban valores extremos atípicos en función del registro histórico. Se tuvo en cuenta este dato al momento de realizar los análisis de correlación.

Como se observó una fuerte asociación entre la abundancia promedio total y la abundancia promedio de machos y hembras ( $r_s=1$  y de  $r_s=0,9$   $p= <0,001$  respectivamente) se hará referencia en todo momento a los resultados obtenidos para abundancia promedio total. Se encontró correlación positiva significativa de la abundancia con Temperaturas máxima, mínima y promedio correspondientes al mes de muestreo ( $r_s=0,66$   $p=0,019$ ;  $r_s=0,60$   $p=0,038$  y  $r_s=0,64$   $p=0,026$ , respectivamente). Cuando se utilizaron los valores promedio de variables climáticas de 30 días previos también se observó una asociación positiva con Temperaturas máxima, mínima y promedio pero con coeficientes de correlación mayores ( $r_s= 0,83$   $p=0,001$ ;  $r_s=0,73$   $p=0,008$  y  $r_s=0,73$   $p=0,007$ , respectivamente) y una asociación negativa con la humedad relativa promedio ( $r_s=-0,59$   $p=0,044$ ); sin embargo, cuando se realizó el análisis de correlación simple parcial de esta variable fijando las variables de temperatura esta asociación desapareció. Con respecto a los datos climáticos promedio de 60 días previos se observó una asociación positiva únicamente con Temperatura máxima ( $r_s= 0,65$   $p=0,021$ ) (Gráficos 4).

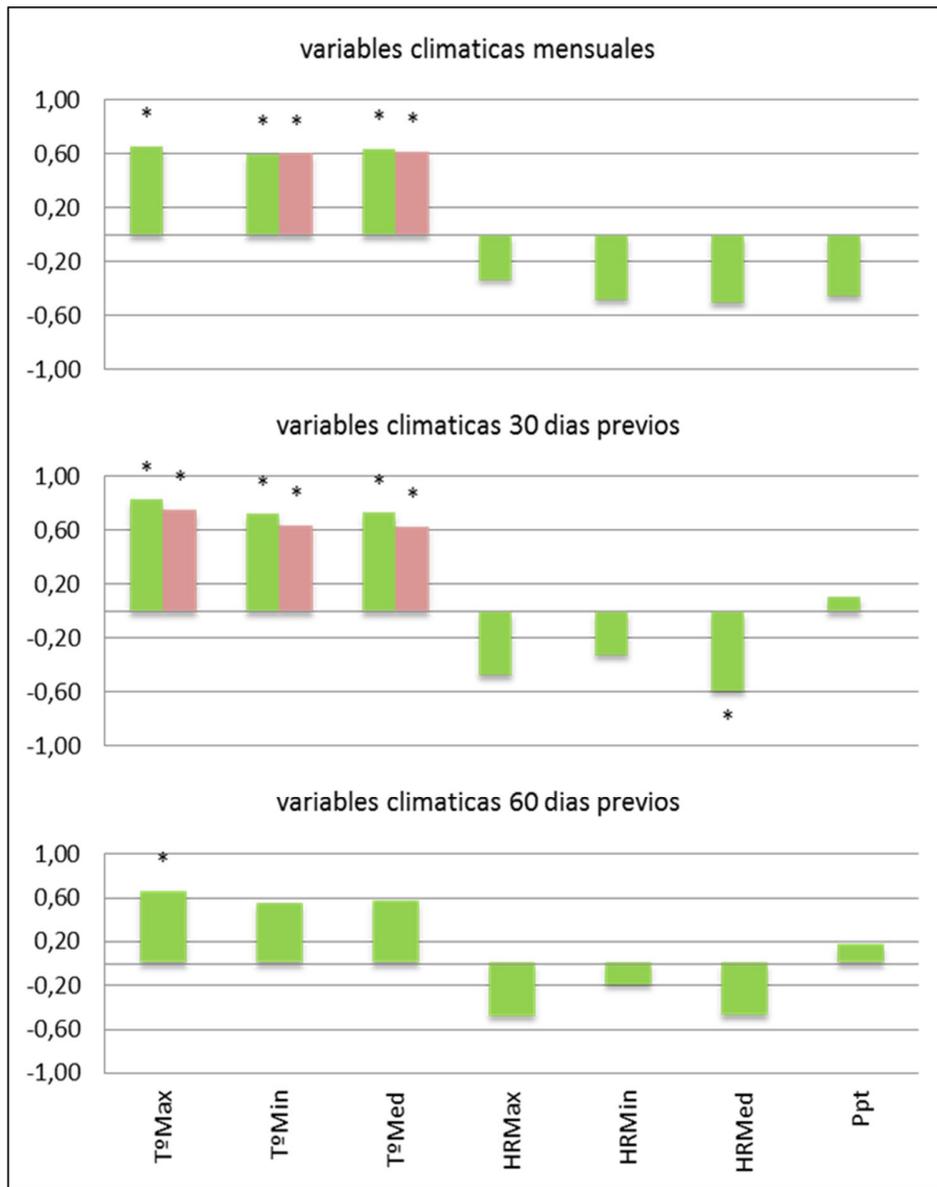


Gráfico 4. Coeficientes de correlación de Spearman entre abundancias en función de variables climática del mes de muestreo, de 30 días y 60 días previos al muestreo Abundancia total promedio trampa/noche (barras verdes) y abundancia promedio trampa/noche de hembras (barras rosas)(\*) Asociación significativa  $p \leq 0,05$ .

El mes con la mayor temperatura máxima promedio en este año de estudio fue febrero de 2010 con 33,7°C para el cual la abundancia promedio trampa/noche fue de 4 flebótomos (D.E.=4,1; por otra parte julio de 2009 fue el mes con menor temperatura máxima promedio con 18,8°C en el cual la abundancia fue de 0,25 (D.E.=0,5). Se observó un valor extremo en la variable precipitación mensual acumulada correspondiente al mes de

noviembre de 2009, aunque está dentro de valores límites registrados para el mencionado mes considerando datos desde 1961 para la ciudad de Posadas (datos proporcionados por el Servicio Meteorológico Nacional) (<http://www.smn.gov.ar/> 2012). El mes de noviembre es también uno de los que presentan mayor variación de la precipitación a lo largo de los años, por lo que se decidió incluir el dato de este mes en el análisis.

Las especies de árboles registradas en el sitio “gallinero” fueron 2 árboles de Pitanga (*Eugeniauniflora*), 1 naranjo (*Citrus sinensis*), 1 chivato (*Delonix regia*) y 1 árbol de mango (*Mangifera indica*); en este domicilio los animales domésticos presentes durante los 12 meses de muestreo consistieron en tres canes (*Canis familiaris*) y 15 gallinas (*Gallusgallus*), en gallinero donde se ubicó la trampa, de marzo de 2009 a noviembre del mismo año estuvieron presentes también 8 pollos de los cuales quedó solo uno durante los tres meses finales del muestreo. En el sitio “árbol de gallinas” las especies de árboles registradas resultaron 1 naranjo, 1 banano (*Musa sp*), 1 parra (*Vitis vinífera*), 1 árbol de palta (*Persea americana*), 1 ibiscus (*Hibiscus rosa-sinensis*), 1 duraznero (*Prunus pérsica*), 1 limonero (*Citrus limonum*) y 1 árbol de pitanga. En este último sitio de marzo a septiembre los animales domésticos fueron tres gallinas; incorporándose en octubre 2 canes y dos pollos.

---

#### 6.4.2 ACTIVIDAD HORARIA.

Se colectaron 250 flebotomos de la especie *Lu. longipalpis* siendo 213 machos y 37 hembras, con una relación macho/ hembra de 5,75/1. La abundancia promedio total (A), de machos (B) y de hembras (C) observada por noche, en periodos de dos horas para los meses de febrero, marzo y abril se detalla en el Gráfico 5.

La abundancia promedio total de febrero y abril presenta un primer pico de actividad en el período de 19:00-21:00 hs y un segundo en el periodo de 01:00-03:00 hs. En el mes de marzo se registró la misma abundancia en los períodos de 17:00-19:00 hs y 19:00-21:00 hs coincidiendo con los demás meses con el pico de actividad en el período de 01:00-03:00 hs,

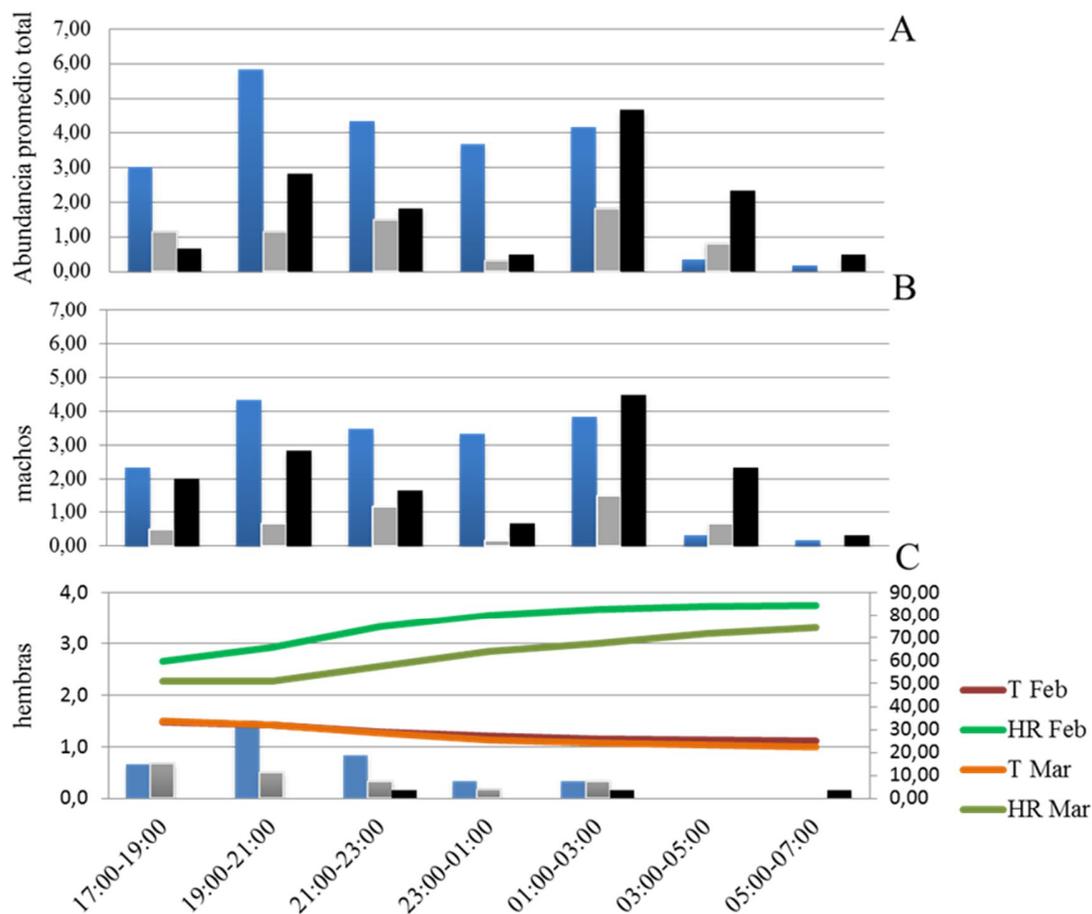


Gráfico 5: Actividad horaria de *Lu. longipalpis* capturados en períodos cada dos hora

A: Abundancia promedio total, B: abundancia de machos trampa/noche, C: abundancia de hembras trampa/noche; febrero (azul), marzo (gris) y abril (negro). T Feb y T Mar: temperatura promedio por periodos de dos horas para febrero y marzo respectivamente; HR Feb y Mar: humedad relativa promedio por periodos de dos horas para febrero y marzo respectivamente

destacándose en este mes abundancias menores en todos los periodos respecto a los otros dos meses estudiados. El período 23:00-01:00 hs registra para los tres meses una disminución de la abundancia, luego de la cual la misma vuelve a aumentar. Cuando se analizó la actividad horaria discriminada por sexos se observó que los machos están presentes durante todos los períodos presentando un patrón muy similar al que se observa cuando se considera la abundancia promedio total.

En el caso de las hembras, se hacen presentes desde las primeras horas de la tarde registrándose un pico de actividad en el período de 19:00-21:00 hs en febrero y continúan ingresando a la trampa hasta el periodo de 01:00-03.00 hs; no se registran capturas con posterioridad a este período excepto por un único ejemplar en el periodo de 05:00-07:00 hs en el mes de abril. Para evaluar la importancia epidemiológica de este resultado se tomó al período 23:00-01:00 hs como bisagra para ver si la diferencia que se observa de presencia de machos antes y después de este periodo y de hembras antes y después del mismo, en cada mes, es estadísticamente significativa.

No se observaron diferencias significativas entre la abundancia promedio trampa/noche de machos y hembras registradas antes y después del periodo 23:00 a 01:00 hs. Si bien no se observó diferencia significativa entre el número de machos y hembras registrados después de las 3:00 hs, para el mes de marzo se obtuvo un valor de p marginal de 0,02. Finalmente, se observó diferencia significativa entre la abundancia promedio trampa/ noche de machos y hembras por períodos para los meses de febrero y abril ( $p= 0,007$  y  $0,009$  respectivamente).

En cuanto a los registros de temperatura realizados durante los 6 días de cada mes que abarcó el estudio en los tres sitios se puede observar que las diferencias son leves tanto en los registros de temperatura como humedad relativa. El mes de febrero registró temperaturas máxima y mínima promedio mayores respecto a marzo y abril con  $37,3^{\circ}\text{C}$  a las 20:15 hs y  $23,7^{\circ}\text{C}$  a las 06:30 hs ; en marzo la temperatura máxima registrada fue de  $36,3^{\circ}\text{C}$  a las 19:00 hs y una mínima de  $18,4^{\circ}\text{C}$  registrada a las 06:00 hs; en abril la máxima se registró a las 19:30 hs con  $31,2^{\circ}\text{C}$  mientras que la mínima fue de  $18^{\circ}\text{C}$  a las 07:00 hs (Gráfico 6).

Las humedades relativas máximas registradas en los días de muestreo para febrero, marzo y abril fueron 86,2% a las 04:30 hs, 81,7 % y 89,07% a las 07:00 hs, respectivamente; las mínimas fueron de 50,4% a las 20:15 hs, 38,5% a las 19:15 hs y 55,86% a las 19:00 hs,

respectivamente para cada mes siendo marzo el mes que se presentó más variable respecto a los registros de humedad relativa (Gráfico 6).

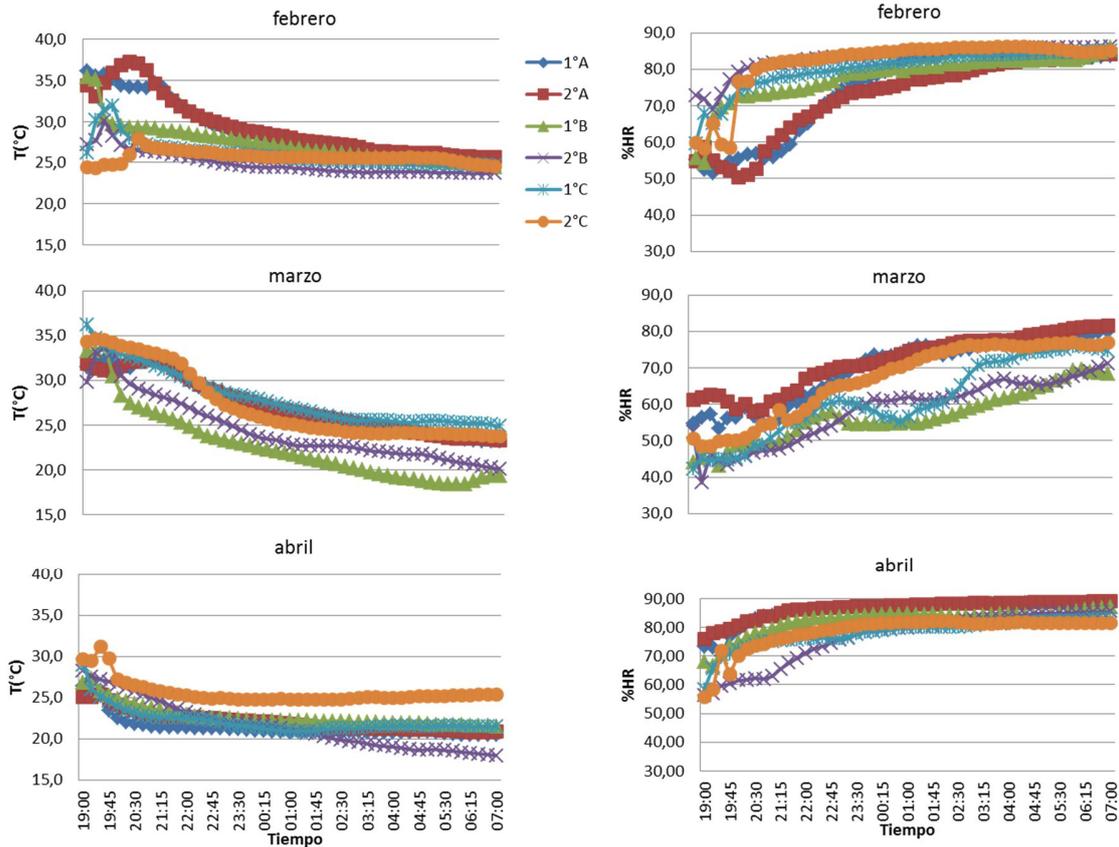


Gráfico 6. Registros de Temperatura y Humedad Relativa para las 6 noches de muestreo

Temperatura en grados centígrados T (°C) y humedad relativa expresada en porcentaje %HR (ejes Y) en función del tiempo tomadas cada 15 minutos por data logger cubriendo el rango horario de 17:00 a 07:00. Líneas bordo y azul 1° y 2° noche sitio A; líneas verde y violeta 1° y 2° noche sitio B; líneas turquesa y naranja 1° y 2° noche sitio C).

En los tres meses se encontró una fuerte asociación de la abundancia promedio total con la abundancia promedio de machos ( $r_s$ : 0,96  $p=0,01$ ;  $r_s$ : 0,92  $p=0,004$ ;  $r_s$ : 0,95  $p=0,001$  febrero, marzo y abril respectivamente); en el caso de abundancia promedio de hembras solo se vio correlación con la abundancia total en el mes de febrero ( $r_s$ : 0,87  $p=0,01$ ), pero no así durante los demás meses. Por esta razón los análisis de correlación con variables meteorológicas se hicieron para abundancia promedio total y para la abundancia de

hembras por separado; cabe destacar que durante los muestreos del mes de abril solamente en 2 casas y 2 de las cuatro noches se capturaron 3 hembras, una en el período de 21:00 a 23:00 hs, otra en el de 01:00 a 03:00 hs y una tercera de 05:00 a 07:00 hs.

No se encontró correlación de variables meteorológicas con la abundancia promedio total para ninguno de los tres meses en estudio, en cambio para la abundancia promedio de hembras por período de febrero se observó una correlación positiva con la temperatura promedio de cada período ( $r_s: 0,87$   $p=0,01$ ) y una correlación negativa con la humedad relativa promedio de cada período ( $r_s: -0,87$   $p=0,01$ ). La mayor captura de hembras en febrero (y de todo el muestreo) fue registrada en el período de 19:00 a 21:00 hs con una temperatura promedio del período de  $32^\circ$  y 65,9% de HR.

En el mes de marzo se encontró correlación positiva para la abundancia de hembras por periodo con temperatura promedio del periodo ( $r_s: 0,93$   $p=0,003$ ) y correlación negativa con humedad relativa promedio del periodo ( $r_s: -0,89$   $p=0,007$ ). La mayor captura de marzo fue en el período de 17:00-19:00 hs con una temperatura promedio de  $32,9^\circ\text{C}$  y una HR de 50,9%. Para el mes de abril no se observó asociación de la abundancia de hembras con las variables climáticas por periodos.

## 7 DISCUSIÓN

## 7.1 ADAPTACIÓN DE PROTOCOLOS DE EXTRACCIÓN DE ADN Y OPTIMIZACIÓN DE PCR-RFLP PARA DETECCIÓN Y TIPIFICACIÓN DE ESPECIES DE *LEISHMANIA*

Las diferencias entre las adaptaciones de los diferentes protocolos de extracción radicaron en los pretratamientos necesarios para cada tipo de muestra sujeta a análisis (tipo de solución de lavado, número de lavados, tiempo y velocidad de centrifugación) y ajustes en la concentración y tiempo de digestión con proteinasa K.

Los pretratamientos por centrifugación se establecieron para muestras de hisopado y capa de glóbulos blancos a 8000 rpm por un minuto y 3000 rpm por 15 minutos, respectivamente; para biopsias y flebotomos es necesario disgregar la muestra previo a la extracción, en el primer caso con bisturí y en el caso de flebotomos con micromortero y para aspirados de ganglio realizar lavados con Sodio citrato.

Se determinó una concentración de proteinasa k de 75ug/muestra para hisopados (H) de conjuntiva durante tres horas en baño termostático; 100 ug/muestra para cultivos por tres horas, utilizando esta misma concentración para capa de glóbulos blancos (GB) y aspirados de ganglio linfático dejándolos por 12 horas y 200 ug/muestra en el caso de las biopsias y flebotomos llevándolos a baño por 8 horas en estos casos.

Asimismo, dependiendo de la naturaleza del material biológico extraído y las concentraciones diferentes obtenidas de las diferentes muestras se ajustó el volumen de elución pos-extracción. El rendimiento de la extracción, expresado en términos de masa total de ADN, fue diferente para cada tipo de muestra; en las biopsias, aspirado de ganglio linfático y GB esta variabilidad podría asociarse a diferencias en la cantidad de material biológico recolectado, ya que si bien se emplearon protocolos estandarizados (biopsias de 1x1mm, aspirados de ganglio de al menos 300 ul y muestras de sangre entera de 1,5 ml), el proceso estuvo sujeto a diferentes profesionales a lo largo del tiempo.

En las muestras de cultivo de *Leishmania* el volumen de extracción fue fijo (500  $\mu$ l), sin embargo la cantidad de genoma total recuperado depende de la concentración de parásitos, la cual fluctúa entre cultivos debido a que es función del inóculo inicial, del tiempo de crecimiento y características fisiológicas de cada cepa, entre otros diversos factores inherentes a este tipo de cultivos.

La concentración de ADN en muestras de H registró la menor variación observada (4,6-47,6 ng/ $\mu$ l, SD $\pm$ = 10,3), pudiendo atribuirse a la limitante en la capacidad de porte del hisopo utilizado para la toma. En cuanto a los lotes de flebotomos la diferencia en el rendimiento de ADN podría asociarse al manejo de los especímenes durante la determinación de especie y constitución de los lotes de extracción, en donde éstos se dañan por la manipulación y pierden piezas corporales (alas, patas y/o cabeza).

Para definir la dilución óptima de ADN a utilizar en la PCR se tuvieron en cuenta dos variables: 1) la cantidad de ADN total estimada a partir de la concentración expresada en ng/ $\mu$ l y 2) el tropismo diferencial que presentan las diferentes especies de *Leishmania* y análisis de sensibilidad obtenidos por otros autores a partir de diferentes muestras analizadas por PCR (Harris et al. 1998; Reithinger et al. 2000; Manna et al. 2004; Pita-Pereira et al. 2005; Lombardo et al. 2012). La variable cantidad total de ADN en una PCR debe situarse en el rango de 100-200 ng totales, ya que el exceso de la misma puede generar inhibición de la reacción. Al efecto de evitar la inhibición se realizaron diluciones de trabajo V/V, a excepción de las muestras de cultivo y de muestras cuya concentración fue menor a 10 ng/ $\mu$ l.

En base a lo expuesto los lotes de flebotomos e hisopados de conjuntiva no estuvieron sujetos a dilución, mientras que para las biopsias y capa de glóbulos blancos se trabajó con diluciones 1/5; un caso particular se planteó con muestras de aspirados de ganglio, ya que si bien se obtuvieron valores mínimos de concentración de ADN, se trabajó a dilución 1/10 en función a que otros autores han descrito una mayor sensibilidad en la detección de *Leishmania* para este tipo de muestra (Reithinger et al. 2000; Lombardo et al. 2012).

En cuanto a la optimización de los protocolos de PCR-RFLP, por Mini-exón se obtuvieron para las tres cepas de referencia productos de PCR de los tamaños esperados, en el caso de *L. (L.) amazonensis* con bandeo inespecífico hacia arriba en algunos casos (Ilustraciones b y c Anexo I). Esto podría ser debido a que el gen de Mini-exón está presente en copias repetidas en tándem por lo que los productos de amplificación teóricamente pueden corresponder tanto a la unidad del gen (exón-intrón-región no transcrita), como a formas multiméricas de mayor peso molecular. Fernandes y col mencionan que el “efecto escalera” es más evidente con repeticiones más pequeñas, como ser el caso de aquellas especies pertenecientes al subgénero *Viannia* u otras especies con tamaños esperados de 300 pb aproximadamente (Fernandes et al., 1994). Respecto al ensayo de RFLP, si bien los productos de PCR obtenidos fueron confirmados por secuenciación, para *L. (V.) braziliensis* no se logró la resolución adecuada para la visualización de una de las bandas esperadas (de 108 pb) correspondiente al patrón de corte descrito por el autor. El poder de resolución de la agarosa es de 10 a 20 pb (Luque Cabrera & Herráez Sanchez 2002; Lodish et al. 2004) por lo que es posible que al utilizarse agarosa de grado molecular pero no de alta resolución observamos como una sola banda de aproximadamente 120 lo que correspondería 118 y 108 juntas. Para *L. (L.) amazonensis* se obtienen dos bandas, como lo esperado, pero una de ellas tiene el mismo tamaño del producto de PCR sin digerir. Para *L. (L.) infantum* se obtuvo el patrón de bandas esperadas descrito por el autor.

Respecto del protocolo de *hsp70*, se obtuvo para las cepas testeadas un producto de PCR de aproximadamente 1600 pb a diferencia del esperado de 1300. Respecto al ensayo de RFLP nuevamente, si bien los productos de PCR obtenidos fueron confirmados por secuenciación, se lograron bandas digeridas de tamaños aproximados a los fragmentos esperados de entre 300 y 200 pb para las tres cepas de referencia pero no así para aquellos fragmentos esperados de 100 pb o menos para los que no se logró el patrón esperado. Por este motivo los patrones no fueron tan claros en la determinación de especies como los presentados por el autor, si bien este protocolo se presentó asociado a la utilización de electroforesis capilar (García et al. 2004) y agarosa de alto poder de resolución (Decuypere et al. 2008) a diferencia de lo utilizado en este trabajo.

Para el protocolos de ITS-1 se obtuvieron los productos de PCR esperados (entre 300 y 350 pb para las cepas testeadas y se confirmaron los mismos por secuenciación. En el patrón de RFLP obtenido para las especies *L. (V.) braziliensis* se logró solo una banda entre 200 y 100 pb que podría ser la esperada de 156 bp pero no se logra visualizar la banda esperada de 143pb, mientras que para *L.(L.) amazonensis* se obtuvo una en aproximadamente 200 pb (que correspondería a la esperada descrita por el autor de 186 pb) pero no se logra resolución para la banda esperada de 142 pb, nuevamente en estos casos podría deberse a que el poder de resolución de la agarosa utilizada no es el óptimo para resolver diferencias de entre 10 y 20 pb; para *L.(L.)infantum* se obtuvo para ambas enzimas un patrón de tamaños aproximados a las esperadas.

De lo expuesto a partir de protocolos de PCR-RFLP empleados en el marco de esta tesis, se concluye que *L. (L.) infantum* pudo detectarse y tipificarse con la obtención del producto de PCR (confirmado por secuencia posterior) y patrón de RFLP esperado descrito por el protocolo de Mini-exón, pero la tipificación por patrón de RFLP no ha coincidido en su totalidad con el esperado para Hae III, ITS-1; una situación similar se ha observado para *L. (L.) amazonensis* y *L. (V.) braziliensis* para ambos protocolos, en donde también se obtuvieron los productos de PCR esperados con reproducciones parciales de los patrones RFLP, inconveniente asociado a la escasa diferencia de tamaño de algunos productos esperados y a las condiciones de trabajo estándar de la electroforesis empleada. Para el caso del protocolo de hsp70, y de manera similar a lo descrito para los otros protocolos, se dificulta la tipificación por RFLP, pero a complejada en este caso por la necesidad de utilizar electroforesis capilar. Si bien la confirmación de producto de PCR se ha llevado a cabo por secuenciación, en la práctica de rutina se requiere disponer de un protocolo de tipificación que permita identificar las especies de *Leishmania* de circulación local.

El genoma de *Leishmania* varía según lo descrito por distintos autores, presentando valores de 83,4 fentogramos (fg) (Ranasinghe et al. 2008), 100 fg (Myler & Stuart 2000; Gontijo 2003) y 300 fg de ADN por parásito (Quaresma et al. 2009). Por ello y ante esta discrepancia, se aceptó como valor de referencia de un genoma de un parásito del género

*Leishmania* el rango comprendido entre 100 y 300 fg para estimar el LTD de cada protocolo.

Con el protocolo de ITS-1, se obtuvo producto amplificado hasta la dilución de 1/100.000 para *L.(L.) amazonensis* y *L.(V.) braziliensis*, en función de lo cual se determinó una masa de ADN detectable de 0,0011ng (1.100 fg) y 0,0022 ng (2.200 fg) para ambas cepas respectivamente, y se estableció para este protocolo un límite teórico de detección (LTD) de 3,7 a 11 parásitos de *L.(L.) amazonensis* y 7,3 a 22 parásitos *L. (V.) braziliensis*.

Para el protocolo Mini-exón, se obtuvo producto amplificado hasta la dilución de 1/10.000, para *L. (L.) amazonensis* y *L. (V.) braziliensis* en función de lo cual se determinó una masa de 0,011ng (11.000 fg) y 0,022 ng (22.000 fg) para cada cepa respectivamente, y se estableció para este protocolo un LTD de 36,7 a 110 parásitos *L.(L.) amazonensis* y de 73,3 a 220 parásitos de *L.(V.) braziliensis*.

Finalmente con el protocolo de *hsp70* se obtuvo una amplificación diferencial dependiendo de la cepa interviniente, obteniéndose el fragmento esperado para *L.(L.) amazonensis* hasta la dilución de 1/1.000 para lo cual se determinó una concentración final de 0,11 ng (220.000 fg) mientras que para *L.(V.) braziliensis* se obtuvo producto hasta la dilución 1/10.000 determinándose una concentración final de 0,022 ng (22.000 fg), estableciéndose así un LTD de 220 a 733,3 parásitos y de 73,3 a 220 parásitos para cada cepa, respectivamente. Esta sensibilidad diferencial dependiente del subgénero *Leishmania* a partir de este protocolo fue observada por otros autores (Fraga et al. 2012; Montalvo et al. 2012). Por otra parte cuando Roelfsema y col. compararon las sensibilidades teóricas a partir de diluciones seriadas de *L. donovani* utilizando los protocolos de Marfurt y col. y Schonian y col., observaron que el protocolo de ITS-1 es dos órdenes de magnitud más sensible que Mini-exón, obteniéndose con el primero una amplificación con 100 fg, mientras que con Mini-exón el límite fue de 10000 fg (Roelfsema et al. 2011). Estos resultados son coincidentes con lo obtenido en el presente trabajo para ambas cepas.

Schönian y col. describen que el protocolo de amplificación con blanco en la región ITS-1 tiene la potencialidad de detectar la masa de 0,2 parásitos; Marfurt y col. destacan que el protocolo de Mini-exón detecta una masa mínima de 10 parásitos y Garcia y col. hacen referencia a que la sensibilidad del protocolo de PCR-RFLP con blanco en *hsp70* posee un rango de detección comprendido entre 3 a 30 parásitos/ul dependiendo del poder discriminatorio del método de electroforesis utilizado para el análisis (electroforesis capilar o en gel de agarosa) (Marfurt et al. 2003; Schönian et al. 2003; Garcia et al. 2004). En este trabajo las sensibilidades teóricas obtenidas a partir de cultivos para los tres protocolos son menores a las descritas por sus autores, de un orden de magnitud respecto a los dos primeros protocolos y de hasta tres órdenes de magnitud en relación al protocolo de Garcia y col. para la cepa de *L. amazonensis*. En trabajos recientes con *hsp70* cuando se comparan los *primers* de Garcia (*hsp70sen*; *hsp702ant*), con otros *primers* diseñados para la misma región que amplifican un fragmento más pequeño se obtienen sensibilidades menores a las descritas para ambos subgéneros hallándose éstas en el orden de magnitud encontrado en el análisis de este trabajo (0,1 a 0,01 ng) (Fraga et al. 2012; Montalvo et al. 2012).

A partir de los resultados de los ensayos de sensibilidad teórica llevados a cabo en condiciones estandarizadas en nuestro laboratorio se concluye que el protocolo de Schönian y col. con blanco en la región ITS-1 es el que posee la mayor sensibilidad de detección/tipificación respecto a los otros dos testeados.

## 7.2 DETECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DEL PARÁSITO E ÍNDICES DE CONCORDANCIA ENTRE PROTOCOLOS MOLECULARES

En muestras clínicas se obtuvieron 15/16 positivos por ITS-1 (93,7% sensibilidad) mientras que a partir del análisis de Mini-exón los positivos fueron 16/16 (100%), por ambos protocolos todas las muestras tipificadas resultaron de la especie *L. braziliensis*; estos resultados son diferentes a lo registrado en la bibliografía cuando se utilizaron los mismos *primers*; Roelfsema y col. describe una sensibilidad ligeramente mayor de ITS-1 vs. Mini-

exón, 50/50 (100%) y 49/50 (98%), respectivamente; Bensoussan y col. obtienen una mayor diferencia entre ambos protocolos con 71/78 (91%) muestras positivas por ITS-1 y 42/78 (53,8%) positivas por Mini-exón (Bensoussan et al. 2006; Roelfsema et al. 2011). En nuestro trabajo la concordancia obtenida entre los dos protocolos fue de 0,86; la misma se cataloga como muy buena según la tabla de Landis y Koch (Landis & Koch 1977).

Todas las muestras de flebotomos analizadas generaron el fragmento esperado de 220pb del gen *cacophony* que se utilizó como control de inhibición; este protocolo es también utilizado con la misma finalidad por otros autores previo a la detección de infección por *Leishmania sp.*(Pita-Pereira et al. 2005; Saraiva et al. 2009; Missawa et al. 2010; Lara-Silva et al. 2014).

En muestras de vectores provenientes de Puerto Iguazú no se encontró infección a partir de los lotes analizados, pudiéndose concluir que no estaban infectadas o bien que la carga parasitaria en los mismos estaría por debajo del límite de detección del protocolo de ITS-1. Los índices de infección de *Leishmania* en los vectores flebotomos son generalmente bajos, incluso en áreas endémicas. Los valores medios se mantienen por debajo del 3%, alcanzando hasta valores próximos al 10% en unos pocos casos (Cimerman & Cimerman 2003; Missawa et al. 2010). Estos índices son independientes del ADN blanco utilizado. En estudios previos de infección por *Leishmania sp.*, llevados a cabo mediante PCR con blanco en ADNk, en lotes de *Nyssomyia whitmani* y *Micropygomyia quinquefer* provenientes de Puerto Iguazú se obtuvieron índices mínimos de infección de 2,5 % y 20 % para cada especie, respectivamente (Salomón et al. 2009). Los elevados índices de infección encontrados en muestras de flebotomos del mencionado trabajo podrían atribuirse a que fueron capturados próximos a casos humanos en tiempo de alta circulación parasitaria-brote epidémico y las muestras tomadas como parte de este trabajo de tesis en escenarios inter-epidémicos, sin casos humanos registrados, en ambientes peridoméstico. En lotes de *Lu. longipalpis* de Posadas, 4/57 resultaron positivos por ITS-1 lo que corresponde a un Índice Mínimo de Infección (IMI) de 0.79% y (2/57) positivos por Mini-exón, correspondiente a un IMI de 0.39% (Acardi et al. 2010); el índice de concordancia obtenido para ambos protocolos fue de 0,65, considerada buena según la tabla de Landis y

Koch; ambos protocolos coincidieron en que el ADN presente en los lotes pertenecía a *L. infantum*, lo cual fue a su vez confirmado por secuenciación.

En la bibliografía hay descriptos diferentes índices de infección por *L. infantum* en *Lu. longipalpis* obtenidos a partir de diferentes protocolos de PCR; Freitas Lidani y col. (Santana do Cafezal, Pará, Brasil), comparan tres protocolos de PCR con blanco en ADNk, genes mini exón y genes de la subunidad pequeña ribosomal; el IMI obtenido fue de 8,6% para el protocolo de ADNk, 7,1% para Mini-exón y 5,3% para subunidad pequeña ribosomal; asimismo estos autores, a partir de cantidades conocidas de ADN de cultivos de *Leishmania* evaluaron la sensibilidad teórica de los protocolos; con Mini-exón obtuvieron una sensibilidad de detección de 1.000 parásitos (100.000 femtogramos) coincidente a la que se encontró con los *primers* de Marfurt y col.(2003) utilizados en este trabajo de tesis; mientras que para el protocolo con blanco en la subunidad pequeña ribosomal, obtuvieron una sensibilidad teórica de 100.000 parásitos(Freitas-Lidani et al. 2014). Lara-Silva y colaboradores en un trabajo realizado en Governador Valadares (Minas Gerais, Brasil), obtuvieron un índice mínimo de infección de 2,6% a partir de los *primers* propuestos por Freitas Lidani y col. con blanco en genes de la subunidad pequeña ribosomal (Lara-Silva et al., 2014). En contraposición a estos resultados, Paiva y col., en Antônio Joao (Mato Grosso do Sul, Brasil), obtuvieron un IMI de 10,4% con el protocolo con blanco en genes ribosomales, frente a un 3,9% obtenido con el protocolo de Mini-exón (Paiva et al. 2006).

Respecto a infección por *L.(L.)infantum* en *Lu. longipalpis* a partir de detección de ADNk Silva y col. en la localidad de Campo grande (MS, Brasil), obtuvieron 2/38 lotes positivos que resulta en un índice mínimo de infección 1,9% con *Leishmania sp* (Silva et al. 2008). Casquero da Cunha y colaboradores, reanalizaron las muestras del grupo de Silva incorporando modificaciones al protocolo de PCR y obtuvieron un IMI de 2,9% (3/38 lotes positivos)(Casquero Cunha et al. 2014). Finalmente, Missawa y col. en Varzea Grande (Mato Grosso, Brasil) y Saraiva y col. en Belo Horizonte (MG, Brasil) obtuvieron un IMI de 0,71% y 19%, respectivamente (Missawa et al. 2010; Saraiva et al. 2010).

En otras especies de *Phlebotominae* se encontraron índices de infección por *L. infantum* de 8,33% en *Lu. sallesi*, 0,14% *L. neivai* en Lassance (MG) (Saraiva et al. 2009) y de 0,7 % y 1,5 en *Lu. cruzi* y *Lu. forattini*, respectivamente, en Cristo Redentor (MS) (Pita-Pereira et al. 2008), ambos trabajos con blanco en ADNk. En *Lu. Antunesi* capturadas en Nova Mutum (MT) con blanco en subunidad pequeña ribosomal el IMI fue de 0,07% (Thies et al. 2013).

En cuanto a los índices de infección obtenidos en este trabajo puede observarse que se encuentran dentro de los valores observados por otros autores. Los valores más altos de IMI descritos en la literatura pueden deberse a la distinta intensidad de circulación y oferta parasitaria (fuerza de transmisión, número de reproducción básica) que hay en cada foco; en el caso de Posadas se constituyó en un foco epidémico de casos humanos aislados comparado con los focos de Brasil con cientos de casos humanos y caninos como Campo Grande o Belo Horizonte. También los sitios de captura de flebotomos influyen en los IMI; debido a que las trampas tienen poco rango de atracción, se utilizan asociadas a alguna fuente de alimento; en el caso de nuestros muestreos se utilizaron gallinas como cebo, con la consecuente menor tasa de infección en flebotomos ya que las aves son refractarias a *Leishmania*; por otro lado, cuando se utilizan perros como cebo, la infección en el vector es más alta por el efecto amplificador del animal infectado próximo a la trampa. Sin embargo, los valores bajos asociados a gallinas son mejores indicadores de riesgo pues son posiblemente insectos con segunda ingesta, y por lo tanto realmente infectantes próximos al peridomicilio (Sant'anna et al. 2010).

Respecto a los casos caninos de LVC, sintomáticos y positivos por visualización de amastigotes mediante estudio parasitológico, a partir de muestras de aspirado de ganglio linfático se detectó la presencia de *Leishmania* en 10/11 por el protocolo de ITS-1 y en 9/11 por el protocolo de Mini-exón, con una sensibilidad de 90,9% y 81,8%, respectivamente; en ambos protocolos mediante RFLP se logró tipificar a la especie *L. (L.) infantum*, resultados que se confirmaron por secuencia. El índice de concordancia entre ambos protocolos fue de 0,62, correspondiendo a una concordancia buena.

Strauss-Ayali y colaboradores observaron que en canes sintomáticos seropositivos las muestras de aspirado de ganglio poplíteo presentaban una sensibilidad de 67% con los *primers* descritos por Schönian y col. para amplificar la región ITS-1 (Strauss-Ayali et al. 2004).

Otros autores, a partir de *primers* con blanco en ADNk, obtuvieron para este tipo de muestra 99% de sensibilidad a partir de canes sintomáticos (Manna et al. 2004); 100% de sensibilidad en sintomáticos y asintomáticos (Quinhones Pires et al. 2014); y 24,5% de sensibilidad a partir de canes seropositivos y seronegativos provenientes de zona endémica (Lombardo et al. 2012). En todos los estudios, la sensibilidad obtenida con aspirado de ganglio fue mayor respecto a otros tipos de muestra empleados.

Se considera que el aspirado de ganglio es una muestra óptima en función de la buena sensibilidad observada, manteniendo una elevada carga parasitaria (resultante de su función sistémica) respecto a la muestra de sangre la cual fluctúa en su carga parasitaria en función del tiempo; sin embargo, a pesar de lo expuesto la punción de ganglio es una muestra invasiva, más cruenta que la de sangre y de composición bioquímica más compleja (Manna et al. 2008; Lombardo et al. 2012).

Basados en estos resultados y en su poder discriminatorio ambos protocolos tienen la potencialidad de ser aplicados en la detección y tipificación de especies de *Leishmania* en muestras biológicas de diverso origen. Sin embargo, aun cuando el protocolo de ITS-1 podría ser considerado el de elección por haber detectado dos lotes de flebótomos y un caso canino previamente negativos por Mini-exón, estos resultados deberían ser reforzados con un mayor número y tipo de muestras. De igual manera se destaca la importancia de contar con más de un protocolo de rutina testeado en muestras diferentes de actores locales del ciclo de transmisión, tanto para detección como para tipificación de especies siendo que la tendencia futura de las técnicas moleculares de tipificación es análisis de secuencias multilocus.

## 7.3 ESTUDIO MICROFOCAL: ANÁLISIS DE TASA DE INFECCIÓN EN FLEBÓTOMOS Y CANES CAPTURADOS EN AAV Y ASV DE LA CIUDAD DE POSADAS.

### 7.3.1 CARACTERIZACIÓN DEL MACRO Y MICROHABITAT EN ÁREAS Y VIVIENDAS DE AAV Y ASV.

Se encontraron diferencias significativas entre medias correspondientes a la variable “proporción de canes positivos por rk” que resultó mayor en áreas AAV que en áreas sin vector. En el Análisis de Componentes Principales para las áreas o manzanas se observó que el ordenamiento de las mismas separaría tres áreas AAV de las ASV relacionando a las primeras con valores mayores de variables que tienen que ver con capacidad para mantener el ciclo biológico del vector como “densidad vegetación”, mayor sombra y vegetación en descomposición que favorezca el desarrollo de las larvas y mayor “número de canes” como una mayor fuente de alimento para adultos; otros autores también encontraron asociación de *Lu. longipalpis* con áreas caracterizadas con altos valores de biomasa y densidad de vegetación (Fernández et al. 2010; Falcao de Oliveira et al. 2012; Oliveira de Andrade et al. 2014).

Respecto al segundo componente las variables que contribuyen con la carga positiva mayor son “calles de tierra” y “proporción de canes positivos por rk” pero no parece haber un ordenamiento claro de las manzanas estudiadas respecto a estas variables ya que separaría manzanas de áreas AAV entre sí.

Las variables “calles de tierra” y “proporción de canes positivos por rk” fueron las que contribuyeron mayormente en la separación de grupos en el estudio de ADEE (Santini et al. 2012), la primera fue mayor en ASV y la segunda en áreas AAV, aunque los autores destacan que la presencia del vector en las áreas/manzanas estuvo principalmente determinada por características del ambiente de las viviendas y no por las de mesoescala. Si bien la media de proporción de canes positivos por rk es mayor en áreas de alta abundancia

respecto a las de áreas sin captura del vector no se observó un ordenamiento claro producto de análisis de componentes principales respecto a ésta y a la variable calles de tierra como en el estudio de Santini y col. (2012). Posiblemente debido al menor número de áreas analizadas o a que la abundancia de los vectores se explica a nivel de la escala microfocal o características de domicilio y peridomicilio más que a nivel de áreas y/o ciudades como lo describe también Quintana y col., mencionando que la vegetación primaria, las fuentes de alimentos y otras características ambientales contribuyen a un hábitat “micro heterogéneo” y por lo tanto a una distribución del vector micro heterogénea (Quintana et al. 2012).

A nivel de microescala resultaron significativas las diferencias entre medias correspondientes a las variables “Distancia a cuerpo de agua” y “Número de especies de plantas” siendo ambas mayores en viviendas provenientes de áreas AAV. En el análisis de componentes principales se observó que en general viviendas de ASV se caracterizan por menores valores de las variables “diámetros de copa”, “números de especies de árboles” y “superficies cubiertas por vegetación”, esto se vería reflejado en áreas del peridomicilio con más incidencia de luz solar, menos sitios de sombra, menor materia orgánica en descomposición lo que condicionaría tanto el desarrollo larval como el de los adultos.

A nivel de vivienda el estudio de Santini y col. mostró que de las variables ambientales analizadas en cada vivienda, la que mejor explicó la diferencia entre AAV y ASV fue la variable “superficie cubierta por tierra o pasto, con mayores valores promedio en ambientes del peridomicilio dentro de ASV y las variables “número de especies de árboles”, “número de macetas” y “distancia a cuerpos de agua” que fueron mayores en AAV (Santini et al. 2012). Encontrándose entonces en este trabajo que, incluso a partir de una submuestra con número menor de unidades domiciliarias que las analizadas en el trabajo de Santini y col, se obtiene la misma tendencia donde viviendas pertenecientes a áreas con alta abundancia del vector se caracterizan por mayores distancias a cuerpos de agua y mayor diversidad de vegetación, mientras que viviendas sin presencia para el vector se caracterizan por presentar mayores superficies de suelo de tierra o pasto sin vegetación que provea condiciones adecuadas para mantener los estadios larvales así como los sitios de reposos

de adultos , verificando esto que la submuestra con la que se trabajó fue adecuada y que esta asociación es robusta .

---

### 7.3.2 *LUTZOMYIA LONGIPALPIS*: ABUNDANCIA E INFECCIÓN

Tanto en el muestreo base como en el muestreo al año se capturó *Lu. longipalpis* en tres de las seis áreas estudiadas en el primer muestreo, y en cuatro áreas del segundo. La diferencia de abundancia encontrada en el primer muestreo respecto al realizado un año después, fue una tendencia que se observó en otras capturas en Posadas realizadas con otros objetivos y que podría atribuirse a las actividades de vigilancia conjunta que se realizaron desde el Programa Nacional de Leishmaniasis y la Secretaría de Calidad de Vida de la Municipalidad de Posadas mediante un abordaje multidisciplinario de la LV con la participación de entomólogos, veterinarios, médicos y antropólogos fortaleciendo la concientización respecto al manejo del ambiente, aplicación de medidas de saneamiento ambiental y tenencia responsable de canes (Comunicación personal Dra. Santini y técnicos de la Municipalidad de Posadas, Sandoval y Steinhorst).

Los análisis de infección de lotes de *Lu. longipalpis* con *Leishmania* sp. resultaron negativos por ambos protocolos de PCR-RFLP, por lo cual o no estuvieron infectados o bien presentaron una carga parasitaria menor al límite de detección de estas técnicas. A pesar de ello, en esta especie de flebótomos capturados en la ciudad de Posadas en el marco de otros muestreos realizados para esta tesis (Paginas 72 a 73) (Acardi et al. 2010) se detectó infección por *L. (L.) infantum*, lo cual indica que estos protocolos son útiles para la detección/tipificación de cepas locales de este parásito y que no haber encontrado infección podría deberse a que entre los años 2006-2009, en Posadas ocurrieron 32 casos humanos. La tasa de incidencia creció de 0,7 (2006) a 4,12 (2007) ya partir del año 2008 retrocedió llegando a 2,96 en 2009, lo que señalaría una disminución de la circulación parasitaria entre todos los componentes del ciclo de transmisión. Esta tendencia de disminución se mantiene actualmente (Gould et al. 2013; Comunicación personal Dr. Salomon).

La relación de sexos encontrada en ambas capturas concuerdan con la observada en otros muestreos descritos en esta tesis, y en capturas hechas en la ciudad por otros autores (Fernández et al. 2010; Santini et al. 2010) como así también en otros trabajos llevados a cabo en otras localidades como se desarrollará en la sección 7.4 de esta discusión.

### 7.3.3 CANES: INFECCIÓN POR DIFERENTES PROTOCOLOS DE PCR, A PARTIR DE DIFERENTES MUESTRAS

Como se mencionó previamente, si al eliminar la subclasificación arbitraria de AMV, se evalúa la proporción de perros infectados detectados por PCR en función de las 4 áreas de AAV y las 2 ASV si bien existe diferencia numérica en términos absolutos, la proporción de perros positivos no es significativa; sin embargo, en la sección anterior del presente trabajo cuando se compararon las medias obtenidas para la variable “proporción de canes positivos por rk39” esta resultó con mayores valores en áreas AAV como así también, en el trabajo de Santini y col., fue la variable que explicó mejor la diferencia entre estas áreas (Santini et al. 2012). Esta discordancia entre ambas técnicas cualitativas de punto final no necesariamente se deba a factores metodológicos de cada una de ellas, sino más bien a diferencias de concentración de las biomoléculas blanco a ser detectadas por las mismas; la concentración de ADN de *Leishmania* sp. y de anticuerpos caninos anti-leishmania obtenidos de un mismo individuo es función de muchas variables, entre ellas del tiempo transcurrido desde el inicio de la infección, y tipo de muestra extraída. También debe destacarse que aunque en el contexto de esta tesis se realizaron ensayos del límite de detección por PCR, ésta no es una técnica aún validada; por ello su utilización en diagnóstico se encuentra aún restringida, siendo su principal aplicación la caracterización molecular de la especie de parásito.

A partir de las 73 muestras de glóbulos blancos se encontraron infectados con ADN de *Leishmania* el 5,5% (4/73) y 4,1% (3/73) de los canes por los protocolos de PCR de ITS-1 y Mini-exón, respectivamente. La fuerza de concordancia entre ambas técnicas fue muy buena según tabla de Landis y Koch. Para los 41 hisopados de conjuntiva ocular (H), el porcentaje de positivos por protocolo de ITS-1 fue de 29,3% (12/41) y 2,4% (1/41) por el

protocolo de Mini-exón. La fuerza de concordancia resultante entre ambos protocolos de PCR fue pobre.

Diferentes autores trabajaron sobre muestras de hisopados oculares con los *primers* para ITS-1 pero utilizándolos como PCR *nested*<sup>9</sup>; Pilatti y col sobre muestras de 23 canes positivos por serología ( ELISA, IFAT y reacción de fijación de complemento) en primera ronda obtuvieron 30,4% de positivos (valor similar al obtenido en este trabajo), que ascendió a 74% en segunda ronda de PCR (Pilatti et al. 2009); con la misma modalidad de ITS-1 como *nested*, en otros trabajos se observó un 92% en canes sintomáticos con ELISA positiva y 72% de ellas confirmadas por cultivo (Strauss-Ayali et al. 2004) y 83,3% de positivos, en canes asintomáticos con ELISA, IFAT y MO positivos (Leite et al. 2010). Con blanco en subunidad pequeña ribosomal pero con un par de *primers* diferente, Lombardo y col. obtuvieron 22,1% de positivos, 15,8 de los cuales era a su vez por seropositivos IFAT (Lombardo et al. 2012); finalmente Almeida Ferreira y colaboradores mediante protocolo con blanco en ADNk obtuvieron 73,9% de positivos, que ascendió a 91,3% cuando se lo combinó con hibridación con sonda para *L. infantum* en canes sintomáticos positivos por ELISA, IFAT y fijación del complemento (de Almeida Ferreira et al. 2008).

La sensibilidad diferencial obtenida a partir de los tipos de muestras (GB y H) provenientes del mismo can fue observada por otros autores. Strauss-Ayali y colaboradores con el protocolo de ITS-1 obtuvieron sensibilidades de 92% para H frente al 57% obtenido a partir de capa de glóbulos blancos (Strauss-Ayali et al. 2004); Almeida y colaboradores a partir de un protocolo que amplifica kDNA obtuvieron 73,9% para H y 13% GB (de Almeida Ferreira et al. 2008). En otros trabajos que se compararon muestra de conjuntiva ocular frente a otros tipos de muestras también se encontraron diferencias. Leite y col. obtuvieron a partir de muestras de hisopado 83,3%, sangre total 56,7 % y piel 50% de positivos (Leite et al. 2010). Lombardo y colaboradores en 163 muestras obtuvieron 22,1% para hisopados de conjuntiva, 24,5% para aspirados de ganglio linfático y finalmente 8,7% para muestras

---

<sup>9</sup>Amplicones de una primera ronda de PCR como punto de partida para una nueva amplificación con los mismos *primers*

de hisopado oral (Lombardo et al. 2012). Solano y col. trabajaron con biopsias de conjuntiva ocular que presentaron buena sensibilidad (32%), en comparación con médula ósea (18%) y biopsia de lesión (50%) (Solano-Gallego et al. 2001).

En el trabajo más reciente hecho sobre hisopados de diferentes mucosas comparadas con otros tipos de muestras se obtuvo un 79% de positivos en muestras de médula ósea, 79% para hisopados orales, 75% a partir de hisopados nasales, 68% a partir de biopsias de piel, 54% a partir de hisopados de conjuntiva ocular y (43%) a partir de hisopados de oreja (Ferreira et al. 2013). Estos últimos resultados plantean una nueva necesidad de evaluar la colecta de muestra no invasiva en cada escenario propio de transmisión. Más aún, los autores sugieren como alternativa metodológica practicar una única toma con el mismo hisopo a partir de las tres mucosas oral, nasal y ocular para aumentar la sensibilidad de detección.

Se considera que la diferencia en la capacidad de detección obtenida a partir de diferentes tejidos en general y entre GB y H en particular podría deberse a la carga parasitaria diferencial a causa del tropismo característico de *Leishmania* respecto a cada tejido. Particularmente la muestras de hisopado de conjuntiva ocular en canes es un tejido rico en histiocitos que contienen parásitos (Strauss-Ayali et al. 2004). En la bibliografía está descrito que la muestra de sangre es la de menor carga parasitaria (Quinnell et al. 2001; Strauss-Ayali et al. 2004; Cruz et al. 2010; Leite et al. 2010; Lombardo et al. 2012) mencionándose que la sangre es tejido de paso y a medida que transcurre el tiempo de infección disminuye la carga parasitaria, además de ser una muestra más compleja pudiendo presentar inhibidores varios (Quinnell et al. 2001; Manna et al. 2004,2008; Quaresma et al. 2009; Leite et al. 2010).

La fuerza de concordancia entre ambas técnicas moleculares fue muy buena en función de la muestra capa de glóbulos blancos, por lo cual en base a estos resultados sería indistinto utilizar el protocolo de ITS-1 o Mini-exón en muestras de canes locales en caso de que estas sean las únicas muestras disponibles a analizar. En el caso de muestras de hisopado de conjuntiva, habiéndose obtenido que la fuerza de concordancia entre ambos protocolos de

PCR fue pobre, de presentarse la posibilidad de utilizar este tipo de muestra es aconsejable la utilización del protocolo de ITS-1.

La capacidad de detección obtenida en este trabajo a partir de muestras de glóbulos blancos e hisopado de conjuntiva ocular por ITS-1 ha sido mayor a la obtenida por Mini-exón, hecho que también se describe en la bibliografía (Bensoussan et al. 2006; Roelfsema et al. 2011); como se mencionó previamente con el protocolo de ITS-1 se obtuvo resultados positivos en dos lotes de flebotomos y una muestra canina de punción de ganglio linfático, las cuales fueron muestras negativas por Mini-exón. Si bien los ensayos de sensibilidad teórica llevados a cabo en el marco de esta tesis sugieren que ITS-1 es más sensible comparado con Mini-exón y su aplicación a diferentes tipos de muestras (cultivos, vectores, aspirado de ganglios, GB y H) sigue esa misma tendencia, estos resultados deberían ser convalidados mediante un diseño experimental de validación de pruebas diagnósticas.

---

#### 7.3.4 SEROLOGÍA Y PCR

A partir del análisis de los resultados obtenidos por inmunocromatografía rk39 y PCR ITS-1 y Mini-exón en muestras de GB, el ensayo serológico tuvo la capacidad de detectar de manera indirecta la presencia del parásito en 90,9% de canes con PCR negativas para este tipo de muestra, mientras que el rk39 fue incapaz de detectar el 2% y 4,1% (Mini-exón e ITS-1 respectivamente) en muestras PCR positivas. Por otro lado, cuando se analiza la relación rk39/PCR pero en función de muestras de hisopado ocular, se observa que la capacidad de detectar el parásito de manera directa del protocolo por ITS-1 fue de 50% (6/12) en canes seronegativos, mientras que la de rk39 de manera indirecta fue de 44,4% (4/9) en PCR negativos.

En el trabajo de Cruz y colaboradores se obtuvieron a partir de 76 canes sintomáticos de la ciudad de Posadas 44,7 % (34/76) de positivos por rk39, 25,3% de positivos por PCR a partir de muestra de sangre entera y 52 % a partir de muestra de ganglio linfático. En 34 canes asintomáticos los valores fueron 24,2% positivos por rk39, 11,8% por PCR partir de

sangre entera y 42,8% de positivos a partir de muestras de ganglio linfático (Cruz et al. 2010).

Otros autores en estudios realizados con otras técnicas serológicas y PCR con diferentes blancos genómicos de *Leishmania* también observaron esta situación de resultados positivos por un método y negativo por el otro, proponiendo que esta discrepancia podría deberse al curso de una infección temprana, pudiendo detectarse la misma por PCR, incluso antes de la seroconversión (Carson et al. 2010; Leite et al. 2010). Quinnell y colaboradores observaron que la sensibilidad de PCR *nested* con blanco en subunidad pequeña ribosomal en muestras de médula ósea varía con el curso de la infección, de la los 135 días post-infección se alcanzaron sensibilidades que oscilaron de 78-88% para luego disminuir al 50% a los 300 días. La serología en cambio presentó para los mismos intervalos un porcentaje de sensibilidad bajo de 41-59% al momento de la infección, pero elevándose con posterioridad al 93-100% con el transcurso de los días; para el caso de muestras PCR negativas con serología positiva estos autores proponen la hipótesis de la posible pérdida de parásitos pero no de anticuerpos (Quinnell et al. 2001). Coura-Vital y col. sugirieron la posibilidad que canes PCR positivos y seronegativos podrían encontrarse en una ventana inmunológica que ocurre previo a la seroconversión, en donde los linfocitos B aún no secretan anticuerpos por lo que los métodos serológicos son menos sensibles en este estadio (Coura-Vital et al. 2011). En estudios posteriores realizados por los mismos autores se encontró que el riesgo de seroconversión aumentó en canes con PCR positivas (Coura-Vital et al. 2013). Otra fundamentación que podría explicar esta situación de muestras caninas positivas por PCR y negativas por serología estaría sustentada por el hecho que se trate de animales asintomáticos para LV (Reithinger et al. 2002; da Costa-Val et al. 2007; Quaresma et al. 2009; Carson et al. 2010; Leite et al. 2010; Goncalvez Antonio et al. 2011).

Está descripto que la sensibilidad de la PCR en diferentes tejidos también es fluctuante en el tiempo; en canes infectados experimentalmente a los 45 días post-infección 83% resultaron positivos por PCR con blanco en ITS-1 (con *primers* según Schönian y col 2003, como en este trabajo) a partir de muestras de conjuntiva y sólo 17% a partir de muestras de GB; a los 60 días habían seroconvertido (ELISA) el 100% y se detectó el 50% en capa de

glóbulos blancos; después de los 75 días el 100% de las PCR a partir de hisopados de conjuntiva y serología fueron positivas, y no se obtuvo ningún resultado positivo por PCR con muestras de glóbulos blancos (Strauss-Ayali et al. 2004). Manna y col. realizaron de manera similar el seguimiento de canes durante dos años utilizando como diagnóstico de referencia a la PCR con blanco en ADNk a partir de muestras de ganglios, lesiones cutáneas y sangre entera, observando que las muestras provenientes de ganglios y lesiones cutáneas se mantuvieron positivas a pesar de que las PCR a partir de sangre y serología (IFAT) negativizaron (Manna et al. 2004).

Considerando la proporción de infectados en función de técnicas de detección y/o tipos de muestras, no se encontró asociación entre positivos por rk39 e ITS-1 aunque cabe destacarse que el valor encontrado resulto marginal y ( $p=0,08$ ); Lombardo y col. encontraron asociación significativa a partir de PCR en hisopado de conjuntivas y serología por IFAT (Lombardo et al. 2012).

En vista de estos resultados se concluye que el porcentaje de positivos que la serología por inmunocromatografía directa con rk 39 es capaz de detectar es mayor que el detectado por ambos protocolos de PCR testeados, utilizando muestras de GB, sin embargo con muestras de hisopado el protocolo de ITS-1 tuvo mayor capacidad de detectar el parásito respecto a rk 39 al protocolo de Mini-exón. La asociación marginal encontrada entre PCR ITS-1 en muestras de hisopado frente a rk39 puede deberse al número de solo 38 muestras por cual se considera la necesidad de futuros estudios que incluyan un mayor número de muestras que fortalezcan estas conclusiones.

---

### 7.3.5 REGRESIÓN LOGÍSTICA EDAD, SEROLOGÍA E ITS-1 H

Al evaluar la edad en función de los resultados obtenidos por serología, encontramos que la probabilidad que una muestra sea positiva por rk39 aumenta con la edad ( $p$  valor= $0,030$ ), y si la diferencia entre canes es de un año la chance de positividad es 1,25 veces más en el can de mayor edad ( $OR=1,25$ ;  $LI$  1,02-1,53  $LS$ ). Por otro lado, se considera necesario un

mayor número de muestras que permitan explorar con mayor exactitud la posible asociación entre la edad y resultados de PCR ITS-1 (hisopado ocular).

Moshfe y colaboradores encontraron asociación de la edad y serología positiva canina determinada tanto a partir de métodos cualitativos como cuantitativos. A partir de la técnica de DAT (Direct Agglutination Test) estos autores observaron que la seroprevalencia es significativamente mayor en canes mayores a 8 años (Moshfe et al. 2008); además estos autores proponen que a más edad mayor seroprevalencia por más tiempo de exposición al vector (ya que aumenta la probabilidad de ser picados). Otros autores también encontraron asociación significativa sólo con canes comprendidos entre 3 a 5 años de edad, pero no así con canes de 0 a 3 años y con más de 5 años (Malmasi et al. 2014).

En cuanto a métodos serológicos cuantitativos como IFI (Indirect Immunofluorescence) se observó que la seroprevalencia es mayor en canes mayores a 4 años (Martín-Sánchez et al. 2009); estos autores también aducen la mayor seroprevalencia a una mayor edad por más tiempo de exposición al vector que aumentaría la probabilidad de ser picados. Silva y colaboradores mediante IFAT y ELISA encontraron asociación entre seropositivos en canes de 2 a < 5 años de edad (no así en las otras dos categorías de edad bajo análisis, de 6 meses a < 2 años y > 5 años); la explicación que propusieron estos autores viene dada por el hecho que cachorros y animales adultos mayores permanecen en el interior de los domicilios por brindárseles más cuidados que a adultos jóvenes, quienes usualmente permanece en el peridomicilio (Silva et al. 2013).

También por IFAT otros autores observaron dos picos de edad asociada a seroprevalencia, uno a los 1-2 años y otro a los 7-8 años (Gálvez et al. 2010); Miro y colaboradores observaron dos picos de seroprevalencia, uno asociado a la edad de 0-3 y otro con los mayores de 7 (Miró et al. 2012).

Por otra parte hay autores que no encontraron asociación entre seroprevalencia y edad (França-Silva et al. 2003; Goncalvez Antonio et al. 2011). Coura-Vital y colaboradores tampoco encontraron asociación entre edad y seroprevalencia, pero la edad promedio de

seronegativos que observaron fue de 4,52 años (DE 39,8), mediana de 4 años, edad media de perros infectados por PCR de 4,15 años y de 4,54 años para no infectados (Coura-Vital et al. 2011). En este trabajo se encontró una edad promedio de canes reactivos por rk39 de 6,2 años, mientras que los negativos promediaron los 4,4 años; la edad promedio de los infectados detectados por PCR fue de 4,7 años frente los no infectados con 5,6 años.

En nuestro trabajo no se observó asociación entre edad canina y resultados positivos de infección detectados por PCR. En estudios de prevalencia realizados a partir de PCR *real time* se encontró asociación significativa con canes mayores de 1 año, pero no así con animales menores a dicha edad (Shang et al. 2011).

## 7.4 DINÁMICA ANUAL Y ACTIVIDAD HORARIA DE *LUTZOMYIA LONGIPALPIS* EN LA CIUDAD DE POSADAS

El perfil eco-epidemiológico de la LV es complejo y muestra particularidades en cada área de transmisión, por lo cual es importante desarrollar estudios en cada localidad endémica que generen información sobre las fluctuaciones estacionales de la población de flebótomos locales, conocimiento sobre su biología, para así poder aplicarlo a estrategias de control que se ajusten a las características de cada lugar (Salomón et al. 2012).

Se observó una distribución con patrón bimodal anual para *Lu. longipalpis* en Posadas, con disminución de la abundancia promedio durante el trimestre invernal, presentando un pico de actividad en marzo de 2009 y el otro en diciembre del mismo año. Otros autores también observaron un patrón bimodal en la abundancia de *Lu. longipalpis* en Porteirinha (MG) (França-Silva et al. 2005), y Campo Grande (MS) (Falcao de Oliveira et al. 2013), Brasil. Estos sitios caracterizados por tener clima tropical semihúmedo con estación seca corresponden a una ciudad pequeña y a una ciudad de mayor tamaño respectivamente (40.000 y 800.000 habitantes aproximadamente) a diferencia de Posadas que presenta clima

subtropical húmedo que no presenta una estación seca definida y que con sus 400.000 habitantes aproximadamente se colocaría en medio de éstas en tamaño. Ximenes y col. también observaron un patrón bimodal en Nisia Floresta (RGN) con clima tropical semiárido con estación seca durante tres años, pero únicamente para los machos con picos en mayo y noviembre y para hembras solo un solo un pico de actividad en mayo ( Ximenes et al. 2006) .

La variación de la abundancia promedio total trampa/noche de *Lu. longipalpis* en la ciudad de Posadas en el periodo marzo 2009-febrero 2010 se encuentra en general positivamente asociada a la temperatura y en particular a la temperatura máxima mensual promedio, tanto la coincidente con el mes de captura, sin retraso, como la registrada 30 y 60 días previos al inicio de los muestreos. La mayor asociación positiva se encontró respecto a la temperatura máxima promedio de 30 días previos a la captura (rs: 0,83 p=0,001). La asociación de la abundancia de *Lu. longipalpis* a las variables de temperatura, sin retraso, podría estar relacionada con un aumento del metabolismo de los adultos que podría verse reflejado en mayor actividad de vuelo en busca de comida. La asociación a tiempos de retraso de 30 – 60 días podría deberse al aumento del metabolismo en todos los estadios del ciclo biológico, incrementándose la tasa de desarrollo (eclosión de huevos, el desarrollo larval, pupa, adulto) y reproducción asociado a un aumento del tamaño de población, ya que el retraso observado, de acuerdo a lo estimado por Morrison y col. respecto a la duración del ciclo de adulto de *Lu. longipalpis* en condiciones naturales, es de 35-56 días, y en el laboratorio de 25-42 (35 días promedio), variación sujeta a la fuente de alimento (Morrison et al. 1995; Soares & Turco 2003).

Tiempos de retardos de los factores abióticos sobre poblaciones de flebótomos fueron descriptos para *Lu. longipalpis* en el distrito de Natal (RGN, Brasil) donde se han observado picos de abundancia asociados a la humedad relativa de 15 días previos y a la temperatura de hasta 3 meses previos a las capturas (Ximenes et al. 2006). De manera similar para *Ny. neivai* en una zona subtropical del NO argentino en donde la precipitación es una limitante, se observó asociación entre la abundancia con temperatura promedio comprendida entre 10 y 26 semanas previas a la fecha de muestreo (70 y 180 días

aproximadamente) (Salomón et al., 2004). La correlación de la abundancia de flebótomos con datos climáticos también se observó en Puerto Iguazú (Argentina) para las especies *Ny. whitmani* y *My. migonei* asociadas con temperatura máxima, mínima y promedio al momento de la captura como así también 30 y 45 días previos a la captura, mientras que la asociación encontrada con la precipitación de 30 días previos desapareció cuando se removió el efecto de la temperatura (Fernández et al. 2012). En este trabajo se observó una situación similar a lo observado en Puerto Iguazú, registrándose asociación negativa de la abundancia con la variable humedad relativa promedio de 30 días previos al muestreo, la cual también desapareció cuando se removió el efecto de la temperatura, demostrándose así como en otros trabajos que en áreas donde la precipitación es abundante todo el año la temperatura es la variable crítica. En la bibliografía se ha descrito el aumento de la abundancia de *Lu. Longipalpis* durante los meses lluviosos en trabajos llevados a cabo en Porteirinha (MG, Brasil), cuyo clima es tropical semihúmedo con estación seca de 6 meses. En esa localidad se realizaron dos estudios de relación de abundancia con variables climáticas durante dos años, y en ambas oportunidades esta especie resultó más abundante respecto a otras ( $\geq 71,5\%$ ) siendo la precipitación (França-Silva et al. 2005) y la humedad relativa promedio mensual las que se presentaron como factores asociados al aumento de la abundancia total durante la estación lluviosa (Barata et al. 2004).

Con este esfuerzo de captura no se observó una asociación significativa entre precipitación acumulada mensual y abundancia aunque sí se pudo observar un aumento en la abundancia en diciembre inmediatamente después de la precipitación extrema ocurrida en el mes de noviembre.

Al igual que lo observado en nuestro trabajo, también se describió el aumento de la abundancia posterior a períodos lluviosos en Vazeza Grande (MT, Brasil), región de clima subtropical húmedo como el de la ciudad de Posadas; aunque los autores no encontraron una correlación significativa entre variables climáticas y abundancia relativa de *Lu. longipalpis* (65%) durante los 29 meses de estudio, sí observaron un ligero aumento de la abundancia posterior a la estación lluviosa (Missawa & Dias 2007). En otro estudio llevado a cabo en las localidades de Janúba y Belo horizonte (MG, Brasil) no se registró asociación

significativa entre variables climáticas y abundancia relativa de *Lu. longipalpis* (92% y 68%, respectivamente); sin embargo, en concordancia con nuestros resultados, en la primera localidad durante cuatro meses se registraron números excepcionales de abundancia de flebótomos, los cuales estuvieron precedidos por un mes de lluvia muy intensa (Michalsky Monteiro et al. 2009); de manera similar, en la localidad de Belo Horizonte se observó un aumento de la abundancia vectorial posterior a periodos de dos a tres meses lluviosos (Souza et al. 2004). Las lluvias pueden acumular cohortes de flebótomos que emergen y buscan fuente alimentaria. La factibilidad de esta acumulación de cohortes se sustenta en experimentos de supervivencia *in vitro* de *Lu. longipalpis* sin alimentarse; la misma fue de 100% hasta el día 7, 52% hasta el día 15 y 7,5% hasta el día 25 (Rangel et al. 1986), pudiendo esto explicar los picos de abundancia de vector asociados a la fuente de alimento posterior al cese de las precipitaciones que podría atribuirse a el aumento de la abundancia en Diciembre de 2009 posterior a la inusual lluvia de Noviembre.

Respecto al número de especies de árboles diferentes que se encontraron en uno y otro sitio, el sitio “árbol de gallinas” se encuentra en una vivienda con mayor número de especies de árboles que donde se encuentra el sitio “gallinero”, siendo en este último donde se registraron las mayores abundancias durante 11 meses del muestreo lo que difiere de lo observado por Santini y col. que describen en viviendas con mayor número de especies de árboles diferentes una mayor abundancia de *Lu. Longipalpis* (Santini et al. 2012). Respecto a la presencia de animales domésticos, en el sitio gallinero durante los últimos tres meses de muestreo se pasó de 29 animales (perros, gallinas, pollos) a 19. Mientras que en el sitio Árbol de gallinas en septiembre se sumaron dos canes y dos gallinas; si bien no se observó cambio en la diferencia de abundancias entre ambos sitios se mencionan estos dato solamente de manera descriptiva teniendo en cuenta que solo son dos viviendas incluidas en el estudio.

En conclusión los resultados obtenidos muestran una tendencia-modal anual y una asociación entre la abundancia de *Lu. longipalpis* en ámbito urbano y variables meteorológicas de temperatura máxima promedio mensual, en el día de captura y con los

promedios de 30 y 60 días previos a la captura, encontrándose esto en concordancia con la literatura. Estos resultados, dado el esfuerzo de captura limitado por razones éticas en el mismo momento de aparición del primer brote urbano de LV en el país y siendo una patología sin estrategia de control efectiva comprobada, muestran una tendencia de la dinámica poblacional que necesitará confirmación posterior mediante capturas con mayores réplicas de sitios/días. Sin embargo, al no contar con datos previos de Argentina, la descripción de esta tendencia es necesaria ya que la abundancia del vector y la tasa de infección forman parte de los componentes esenciales en la fluctuación de la transmisión de leishmaniasis y como antecedente para el diseño de protocolos de investigación-intervención de prevención y control.

La relación de sexos 5,49:1 (M/H) desbalanceada, a partir de capturas del estudio de dinámica fue observada también por otros autores en este tipo de trampa (Alexander 2000). En Argentina, en capturas realizadas durante 2007 en la ciudad de Posadas utilizando trampas de luz tipo mini CDC ya se había observado predominio de machos de *Lu. longipalpis*; para un total de 2.428 especímenes la relación M/H observada fue de 3,5:1 (Fernández et al. 2010), mientras que en otro estudio en la misma localidad para un total de 959 flebótomos fue de 4,29:1 (Santini et al. 2010).

En diferentes localidades de Brasil como Campo Grande (MG), De Oliveira y colaboradores describen por primera vez para *Lu. longipalpis* una relación de sexo de 2,8:1 (De Oliveira et al. 2000). Posteriormente, en la misma localidad Silva y colaboradores observaron el mismo patrón de predominancia de machos 3,8:1 (Silva et al. 2007) y 4,8:1, (Silva et al. 2008). En la localidad de Janúba (MG) de 14 distritos muestreados sólo en uno de ellos se observó relación 1:1, obteniéndose para los 13 distritos restantes relaciones macho/hembra que variaron entre 1,3:1 a 3,7:1 (Michalsky et al. 2009 a). Más recientemente en Dracena (SP) Rangel y colaboradores encontraron una relación de machos/hembras de 3,6:1; en todos los estudios las capturas se realizaron utilizando trampas tipo mini CDC sin dióxido de carbono (Rangel et al. 2012).

En 1997, Kelly y colaboradores propusieron una hipótesis que podría explicar este patrón basándose en el hecho de que los machos *Lu. longipalpis* forman agregaciones con el fin de copular en los sitios donde se alimentan las hembras; así los machos llegarían atraídos por mediadores químicos producidos por los vertebrados y por los mismos machos que van llegando al sitio generándose una retroalimentación positiva respecto de la llegada de nuevos machos; una vez que la agregación de machos se ha establecido, llegarían las hembras atraídas por las feromonas que éstos emiten. Esta búsqueda de pareja sexual a través de mediadores químicos podría explicar el mayor número de machos que de hembras que se observa en algunas especies de flebotomos al ser capturados con trampas de luz próximos a una fuente de sangre (Kelly & Dye 1997).

En el análisis de la actividad horaria diferenciada de machos y hembras se consideró el período horario de 23:00-01:00 hs (período en el que registra la menor abundancia promedio luego del primer pico de actividad) para subdividir el ciclo completo de captura en primera etapa (17:00-23:00 hs) y segunda etapa (01:00-07:00 hs). En la primera etapa del ciclo de captura se registró el 75,8 % de las hembras y el 51,5 % de los machos, mientras que en la segunda mitad fue el 16,1 % y el 37,08 % de hembras y machos, respectivamente. La actividad de las hembras se presenta de 17:00 a 23:00 hs (considerando los tres meses) para ir decreciendo hasta casi desaparecer después de las 3:00 hs; hasta el mencionado horario ingresaron a la trampa el 97,3% de las hembras y el 88,73 % de los machos, los cuales sí mostraron actividad hasta el último periodo horario estudiado inclusive. No se observaron diferencias significativas entre la abundancia promedio trampa/noche de machos y de hembras registradas antes y después del periodo de 23:00 a 01:00 hs. No se encontró diferencia significativa entre el número de machos y hembras registrados después de las 3:00 hs para los meses de febrero y abril sin embargo para el mes de marzo se obtuvo una diferencia significativa residual. Finalmente, si se observó diferencia significativa entre la abundancia promedio trampa/ noche de machos y hembras que ingresaron por cada periodo para los meses de febrero y abril de 2011 ( $p= 0,007$  y  $0,009$  respectivamente).

Santini y col. en un estudio de actividad horaria de *Lu. longipalpis* realizado durante 6 noches consecutivas en el mes de febrero de 2007 en la ciudad de Posadas observaron que la abundancia de flebótomos totales fue mayor entre las 21:30 y 0:30 hs que entre las 0:30 y las 07:00 hs, y que a su vez el 90% de las hembras fueron capturadas entre las 20:30 hs y la 01:30 hs, período este último en el que se capturó el 63% de los machos (Santini et al. 2010). En un estudio en Venezuela la actividad de *Lu. Longipalpis* disminuyó después de las 23:00 hs para ambos sexos (Felicangeli et al. 2004). Otro estudio de actividad horaria de *Lu. longipalpis* realizado en Colombia reveló un pico en el anochecer y noche temprana (18:00 a 23:30 hs) para después ir reduciendo su actividad hacia la mañana, aunque en este caso las hembras particularmente aumentaron su presencia después de las 20:30 mientras que los machos se mantuvieron constantes o fueron decreciendo lentamente su actividad hacia el amanecer (Morrison et al. 1995). Si bien no se encontraron diferencias significativas, los resultados obtenidos concuerdan con lo observado por Santini y col. y Morrison y col. y puede entonces describirse la tendencia que indicaría que de 17 a 23 hs. sería el periodo de mayor riesgo de contacto efectivo de transmisión (hembras), y que dicho contacto se podría extender hasta las 3hs.

También en consonancia con los resultados de este trabajo se desprende que la especie es de mayor actividad nocturna y de la primera mitad de la noche lo cual fue observado también por otros autores. En Sao Luis (MA Brasil) se observó mayor actividad en peridomicilio para *Lu. longipalpis* en la primera mitad de la noche (18:00-24:00) en donde el 60,8% de los especímenes fue capturado entre las 18:00 hs y las 22:00 hs, mientras que el 39,2% fue capturado durante la segunda mitad (Rebêlo 2001). Con resultados similares Ximenes y col. en Nisia Floresta RGN observó que la especie es más nocturna que crepuscular con pico de actividad a las 22:00 (de Melo Ximenes et al. 2006).

La presencia de hembras, el sexo con capacidad de infección, en la primera mitad de la noche tiene importantes consecuencias para el control, ya que el riesgo de contacto efectivo puede, según el contexto socio-ambiental no ocurrir en la cama (donde se colocan los mosquiteros impregnados/sin impregnar) o en el intradomicilio (rociado intradomiciliario), sino en la galería en el momento de la cena durante los meses de verano.

Respecto a la correlación de la abundancia de flebótomos/periodo (2 horas) con las variables meteorológicas, se observó que no hay correlación significativa con la abundancia promedio total; cuando se consideró solamente a las hembras se vio una fuerte correlación positiva con la temperatura promedio y negativa con la HR promedio. La mayor abundancia de hembras se dio en febrero entre los 32°C-32,9°C y 50,9%-65,9% de HR en el rango horario de 17:00 hs a 21:00 hs. Para la misma localidad también durante el mes de febrero, Santini y col. describieron una ventana con mayor abundancia de hembras entre 20:30 hs y las 01:30 hs a los 26° y 28° C entre los 63% y 68% HR y una asociación significativa de temperatura media y humedad relativa con la abundancia total de *Lu. longipalpis* la cual se incrementó cuando se consideraron sólo las hembras (Santini et al. 2010). Estas similitud de patrón de asociación con variables abióticas, pero diferencias en los valores límite, señalan la necesidad de un mayor número de réplicas para contrarrestar factores no medidos (viento, proximidad de sitios de cría u otras fuentes de alimento o diversión de vuelo, etc.), y la posibilidad de existencia de ritmos circadianos de actividad.

Sin embargo, al igual que en el estudio de dinámica poblacional, las posibilidad de réplicas son limitadas en una situación de brote y las consideraciones éticas se anteponen a los objetivos de investigación lo cual es fuertemente recomendado por el programa nacional de leishmaniasis con fuerte recomendación programática. Por ello, se realizó el análisis horario de las capturas teniendo presente las limitaciones de tamaño muestral con el objeto de describir una tendencia a partir de la cual fuese factible diseñar protocolos de investigación-intervención sustentados en las condiciones meteorológicas, períodos del año y horarios de mayor abundancia de vectores, y que permitiesen generar un indicador de posible riesgo de transmisión.

## 8 CONCLUSIONES

### Objetivo 1

Se adaptaron de manera satisfactoria protocolos de pretratamiento a la extracción y de extracción de muestras biológicas de diverso origen.

Se establecieron diferentes límites teóricos de detección (LTD) de *L. (L.) amazonensis* y *L. (V.) braziliensis* para los protocolos de PCR de ITS-1, Mini-exón y *hsp70*, concluyéndose que el protocolo de ITS-1 (Schönian *et al*, 2003) es el que posee la mayor capacidad de detección.

En muestras clínicas humanas la capacidad de detección de *Leishmania* por el protocolo ITS-1 fue de 93,7% y de 100% por Mini-exón con un índice de concordancia muy bueno entre ambos protocolos. Se tipificó por secuenciación la especie *L. (V.) braziliensis* en 12 de las 16 muestras positivas (75%).

En lotes de *Lutzomyia longipalpis* se detectó un Índice Mínimo de Infección (IMI) de 0.79% por ITS-1 y un IMI de 0.39% por Mini-exón, siendo el índice de concordancia bueno entre ambos protocolos. Se tipificó por secuenciación la especie *L. (L.) infantum* en la totalidad de las muestras positivas (100%).

En muestras caninas con clínica de LVC la capacidad de detección de *Leishmania* fue de 100% por el protocolo de ITS-1 y 81,8% por Mini-exón, siendo el índice de concordancia bueno entre ambos protocolos. Se tipificó por secuenciación la especie *Leishmania (L.) infantum* en la totalidad de las muestras positivas (100%).

Por lo expuesto, se considera que el protocolo de Schönian *et al* (2003) con blanco en la región ITS-1 posee mayor capacidad de detección, excepto en casos clínicos, sin embargo ambos protocolos tienen la potencialidad de ser aplicados en la detección de *Leishmania* sp. en muestras biológicas de diversos orígenes y estos resultados deberían ser reforzados con un mayor número y tipo de muestras.

### Objetivo 2

No se observó un ordenamiento claro del producto de análisis de componentes principales (ACP) a nivel de las áreas de alta abundancia del vector (AAV); sin embargo a nivel

microfocal sí se observó un ordenamiento de viviendas de áreas sin vector (ASV) relacionado a valores bajos de variables “diámetros de copa”, “números de especies de árboles” y “superficies cubiertas por vegetación”. Las viviendas de AAV se caracterizan por valores altos de las variables “número de especies de árboles”, “numero de macetas” y “distancia a cuerpos de agua”. Los análisis de infección de lotes de *Lu. longipalpis* provenientes de áreas AAV y AMV con *Leishmania* sp. resultaron negativos por ambos protocolos de PCR-RFLP, por no estar infectados o por presentar una carga parasitaria menor al límite de detección de estas técnicas.

En muestras de GB caninas provenientes de AAV y ASV, la capacidad de detección del parásito fue de 5,5% por ITS y 4,1% por Mini-exón con una la fuerza de concordancia muy buena entre ambas técnicas. Se tipificó por secuenciación la especie *Leishmania (L.) infantum* una de las 4 muestras positivas (25%).

En muestras de hisopado de conjuntiva ocular de los mismos canes, la capacidad de detección de *Leishmania* por ITS-1 fue de 29,3% y 2,4% por Mini-exón siendo la concordancia entre ambos protocolos pobre. Se tipificó por secuenciación la especie *Leishmania (L.) infantum* en 5 de las 12 muestras (41,6%).

No se encontró diferencia significativa entre proporciones de canes infectados de áreas AAV y ASV detectados por PCR.

Por lo expuesto, se considera que las viviendas de ASV se caracterizan por presentar incidencia de luz solar, menos sitios de sombra y menor materia orgánica en descomposición mientras que las pertenecientes a AAV se caracterizan por presentar condiciones que propician el desarrollo del ciclo del vector proporcionando mayor biomasa, humedad y diversidad vegetal. Respecto de los análisis de infección en canes, cuando la muestra biológica disponible es GB es indistinto utilizar el protocolo de PCR ITS-1 o Mini-exón.

### Objetivo 3

En muestras de GB de canes, el ensayo de rk39 tuvo la mayor capacidad de detectar la presencia del parásito, de manera indirecta, que ambos protocolos de PCR-RFLP testeados. Por el contrario, en muestras de hisopado de conjuntiva ocular es el

protocolo de ITS-1 el que presentó la mayor capacidad de detectar directamente la presencia del parásito.

Por lo expuesto, se considera que cuando la muestra biológica disponible es GB es indistinto utilizar el protocolo de PCR ITS-1 o Mini-exón. Por el contrario con muestras de hisopado de conjuntiva ocular, el protocolo de elección es ITS-1.

#### Objetivo 4

En este estudio preliminar, durante 2009-2010 y febrero, marzo, abril de 2011, los resultados de *Lutzomyia longipalpis* en la ciudad de Posadas muestran las siguientes tendencias:

Un patrón bi-modal anual y una asociación de su abundancia en ámbito urbano con la temperatura máxima promedio mensual correspondiente al mes de captura, como así también a 30 y 60 días previos a la misma.

Las hembras de *Lutzomyia longipalpis* presentaron una actividad horaria alta de 17:00 a 23:00 hs. al final del otoño y comienzo del verano, para casi desaparecer después de 03:00hs. Los machos manifestaron también esta actividad pero con actividad hasta el último periodo horario inclusive; sin embargo, no se observaron diferencias significativas entre la abundancia promedio trampa/noche de machos y hembras registradas antes y después del periodo de 23:00 a 01:00 hs. a excepción de la abundancia de machos y hembras ingresada por los períodos para los meses de febrero y abril de 2011.

Por lo expuesto, el mayor riesgo de contacto efectivo de transmisión (hembras) ocurriría de 17:00 a 23:00, y dicho contacto se extendería hasta las 3:00 hs.

Con las hembras se vio una fuerte correlación positiva con la temperatura promedio de cada periodo y negativa con la HR promedio de cada periodo. La mayor abundancia de hembras se dio en febrero entre los 32°C-32,9°C y 50,9%-65,9% de HR en el rango horario de 17:00 hs a 21:00 hs. Si bien estos resultados se obtienen a partir de un esfuerzo de captura limitado por razones éticas en el mismo momento de aparición del primer brote urbano de LV en el país y siendo una patología sin estrategia de control efectiva comprobada, se necesitará confirmación posterior mediante

capturas con mayores réplicas de sitios/días; de igual manera se considera importante y necesaria la descripción de estas tendencias ya que no se cuentan con datos previos para que puedan servir como antecedente para el diseño de protocolos de investigación-intervención de prevención y control sustentados en las condiciones meteorológicas, períodos del año y horarios de mayor abundancia de vectores, y que permitiesen generar un indicador de posible riesgo de transmisión.

## 9 BIBLIOGRAFIA

- Acardi, S.A. et al., 2010. Detection of *Leishmania infantum* in naturally infected *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) and *Canis familiaris* in Misiones, Argentina: the first report of a PCR-RFLP and sequencing-based confirmation assay. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 105(6), pp.796–799.
- Alexander, B., 2000. Sampling methods for phlebotomine sandflies. *Medical and Veterinary Entomology*, 14, pp.109–122.
- Alexander, B. et al., 2002. Role of the domestic chicken (*Gallus gallus*) in the epidemiology of urban visceral leishmaniasis in Brazil. *Emerging Infectious Diseases*, 8(12), pp.1480–1485.
- Alexander, B. & Maroli, M., 2003. Control of phlebotomine sandflies. *Medical and Veterinary Entomology*, 17, pp.1–18.
- De Almeida Ferreira, S. et al., 2008. Evaluation of the conjunctival swab for canine visceral leishmaniasis diagnosis by PCR-hybridization in Minas Gerais State, Brazil. *Veterinary Parasitology*, 152(3-4), pp.257–263.
- Alvar Ezquerro, J., 2001. *Las Leishmaniasis: De la Biología al Control*. 2da edición. Madrid: Centro Nacional de Microbiología. Instituto de la Salud Carlos III.
- Alvar, J. et al., 2012. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS one*, 7(5), pp.356-371.
- Aransay, A M. et al., 2000. Detection and identification of *Leishmania* DNA within naturally infected sand flies by seminested PCR on minicircle kinetoplastic DNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(5), pp.1933–1938.
- Azevedo, A.C.R. et al., 2002. Ecology of Sand Flies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) in the North of the State of Mato Grosso, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 97(4) (June), pp.459–464.
- Balzarini, M.G. et al., 2008. InfoStat, Manual del Usuario.
- Barata, R.A. et al., 2004. Phlebotomine sand flies in Porteirinha, an area of American visceral leishmaniasis transmission in the State of Minas Gerais, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 99(5), pp.481–487.

- Baron, E.J. et al., 2013. A guide to utilization of the microbiology laboratory for diagnosis of infectious diseases: 2013 recommendations by the Infectious Diseases Society of America (IDSA) and the American Society for Microbiology (ASM). *Clinical Infectious Diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 57(4), pp.e22–e121.
- Barrio, A. et al., 2009. Identificación por PS-PCR de especies de *Leishmania* y su correlación con características clínicas, epidemiológicas y terapéuticas en Salta, Argentina. *Revista Argentina de Salud Publica*, 1(1), pp.30–33.
- Barrio, A. et al., 2012. *Leishmania infantum* and Human Visceral Leishmaniasis, Argentina. *Emerging Infectious Diseases*, 18(2), pp.3–4.
- Basmadján, Y. et al., 2015. “Abordaje de la emergencia y dispersión de la Leishmaniasis en Uruguay.” En *XXIII Congreso Latinoamericano de Parasitología FLAP*. Bates, P. A. et al., 2015. Recent advances in phlebotomine sand fly research related to leishmaniasis control. *Parasites & Vectors*, 8(1), p.131.
- Belli, A. et al., 1998. Simplified polymerase chain reaction detection of new world *Leishmania* in clinical specimens of cutaneous leishmaniasis. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 58(1), pp.102–109.
- Bensoussan, E. et al., 2006. Comparison of PCR Assays for Diagnosis of Cutaneous Leishmaniasis. *Journal of Clinical Microbiology*, 44(4), pp.1435–1439.
- Bezerra-Vasconcelos, D.R. et al., 2011. Real-time PCR to assess the *Leishmania* load in *Lutzomyia longipalpis* sand flies: screening of target genes and assessment of quantitative methods. *Experimental Parasitology*, 129(3), pp.234–239.
- Botilde, Y. et al., 2006. Comparison of molecular markers for strain typing of *Leishmania infantum*. *Infection, Genetics and Evolution Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases*, 6(6), pp.440–406.
- Bottecchia, M. et al., 2004. Genetic divergence in the cacophony IVS6 intron among five Brazilian populations of *Lutzomyia longipalpis*. *Journal of Molecular Evolution*, 58(6), pp.754–761.
- Bravo, A.G. et al., 2013. The first record of *Lutzomyia longipalpis* in the Argentine northwest. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 108(8), pp.1071–1073.

- Brustoloni, Y.M. et al., 2007. Sensitivity and specificity of polymerase chain reaction in Giemsa-stained slides for diagnosis of visceral leishmaniasis in children. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 102(4), pp.497–500.
- Buitrago, R. et al., 2011. PCR-RFLP of ribosomal internal transcribed spacers highlights inter and intra-species variation among *Leishmania* strains native to La Paz, Bolivia. *Infection, Genetics and Evolution: Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases*, 11(3), pp.557–563.
- Carson, C. et al., 2010. Comparison of *Leishmania* OligoC-Test PCR with conventional and real-time PCR for Diagnosis of canine *Leishmania* infection. *Journal of Clinical Microbiology*, 48(9), pp.3325–3330.
- Casquero Cunha, R. et al., 2014. Detection of *Leishmania infantum* in *Lutzomyia longipalpis* captured in Campo Grande, MS. *The Brazilian Journal of Veterinary Parasitology*, 3, pp.269–273.
- Cimernan, S. & Cimernan, B., 2003. *Medicina tropical* 1<sup>st</sup> ed., São Paulo: Atheneu.
- Cordoba Lanus, E. et al., 2005. Detection of *Leishmania braziliensis* in human paraffin-embedded tissues from Tucuman, Argentina by polymerase chain reaction. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 100(2), pp.187–192.
- Córdoba-Lanús, E. et al., 2006. Natural infection of *Lutzomyia neivai* with *Leishmania* spp. in northwestern Argentina. *Acta Tropica*, 98(1), pp.1–5.
- Correa Antonialli, S.A. et al., 2007. Spatial analysis of American Visceral Leishmaniasis in Mato Grosso do Sul State, Central Brazil. *The Journal of Infection*, 54(5), pp.509–514.
- Costa, D.N.C.C. et al., 2013. Culling dogs in scenarios of imperfect control: realistic impact on the prevalence of canine visceral leishmaniasis. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 7(8), p.e2355.
- Da Costa-Val, A.P. et al., 2007. Canine visceral leishmaniasis: relationships between clinical status, humoral immune response, haematology and *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* infectivity. *Veterinary Journal (London, England: 1997)*, 174(3), pp.636–643.

- Coura-Vital, W. et al., 2011. Prevalence and factors associated with *Leishmania infantum* infection of dogs from an urban area of Brazil as identified by molecular methods. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 5(8), p.e1291.
- Coura-Vital, W. et al., 2013. Risk factors for seroconversion by *Leishmania infantum* in a cohort of dogs from an endemic area of Brazil. *PloS one*, 8(8), p.e71833.
- Cruz, I. et al., 2006. Comparison of new diagnostic tools for management of pediatric Mediterranean visceral leishmaniasis. *Journal of Clinical Microbiology*, 44(7), pp.2343–2347.
- Cruz, I. et al., 2010. A canine leishmaniasis pilot survey in an emerging focus of visceral leishmaniasis: Posadas (Misiones, Argentina). *BMC Infectious Diseases*, 10, p.342.
- Cupolillo, E. et al., 1998. Genetic Data Showing Evolutionary Links between *Leishmania* and *Endotrypanum*. *Memorias Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 93(5), pp 677-683.
- Cupolillo, E. et al., 2003. Genetic Polymorphism and Molecular Epidemiology of *Leishmania (Viannia) braziliensis* from Different Hosts and Geographic Areas in Brazil. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(7), pp.3126–3132.
- Dantas-Torres, F., 2009. Canine leishmaniosis in South America. *Parasites & Vectors*, 2 Suppl 1, p.S1.
- Decuypere, S. et al., 2008. Manual of molecular procedures. Training course molecular epidemiology leishmaniasis. Leishmaniasis Epidemiology Network South America. G. Schönian, ed. pp. 12–18.
- Desjeux, P., 2004. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 27(5), pp.305–318.
- Falcao de Oliveira, E. et al., 2013. Climatic Factors and Population Density of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) in an Urban Endemic Area of Visceral Leishmaniasis in Midwest Brazil. *Journal of Vector Ecology*, 38(2), pp.224–228.
- Feliciangeli, M. et al., 2004. Activity of *Lutzomyia pseudolongipalpis* and *L. longipalpis* s.l. (Diptera: Psychodidae) in Venezuela. *Parasite*, 11(3), pp.273–278.
- Feliciangeli, M.D. et al., 2006. Leishmania and sand flies: proximity to woodland as a risk factor for infection in a rural focus of visceral leishmaniasis in west central Venezuela. *Tropical Medicine & International Health*, 11(12), pp.1785–1791.

- Fernández, M.S. et al., 2010. *Lutzomyia longipalpis* spatial distribution and association with environmental variables in an urban focus of visceral leishmaniasis, Misiones, Argentina. *Acta Tropica*, 114(2), pp.81–87.
- Fernández, M.S. et al., 2012. Phlebotominae fauna in a recent deforested area with American Tegumentary Leishmaniasis transmission (Puerto Iguazú, Misiones, Argentina): Seasonal distribution in domestic and peridomestic environments. *Acta Tropica*, 122(1), pp.16–23.
- Fernández, M.S. et al., 2013. Spatial and temporal changes in *Lutzomyia longipalpis* abundance, a *Leishmania infantum* vector in an urban area in northeastern Argentina. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 108(7), pp.817–824.
- Ferreira, S.D.A. et al., 2013. Nasal, oral and ear swabs for canine visceral leishmaniasis diagnosis: new practical approaches for detection of *Leishmania infantum* DNA. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 7(4), p.e2150.
- Fraga, J. et al., 2012. Accurate and rapid species typing from cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis lesions of the New World. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 74(2), pp.142–150.
- França-Silva, J. et al., 2003. Epidemiology of canine visceral leishmaniosis in the endemic area of Montes Claros Municipality, Minas Gerais State, Brazil. *Veterinary Parasitology*, 111(2-3), pp.161–173.
- França-Silva, J.C. et al., 2005. Importance of *Lutzomyia longipalpis* in the dynamics of transmission of canine visceral leishmaniasis in the endemic area of Porteirinha Municipality, Minas Gerais, Brazil. *Veterinary Parasitology*, 131(3-4), pp.213–220.
- Freitas-Lidani, K.C. et al., 2014. A comparison of molecular markers to detect *Lutzomyia longipalpis* naturally infected with *Leishmania (Leishmania) infantum*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 109(4), pp.442–447.
- Galati, E.A.B., 2003. *Classificação de phlebotominae. Flebotomíneos do Brasil* E. F. Rangel & R. Lainson, Eds., FIOCRUZ.
- Gálvez, R. et al., 2010. Emerging trends in the seroprevalence of canine leishmaniasis in the Madrid region (central Spain). *Veterinary Parasitology*, 169(3-4), pp.327–334.

- Garcia, L. et al., 2004. Culture-Independent Species Typing of Neotropical *Leishmania* for Clinical Validation of a PCR-Based Assay Targeting Heat Shock Protein 70 Genes. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(5), pp.2294–2297.
- Garcia, A.L. et al., 2007. Epidemiological monitoring of American tegumentary leishmaniasis: molecular characterization of a peridomestic transmission cycle in the Amazonian lowlands of Bolivia. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 101(12), pp.1208–1213.
- Gomes, A.H. et al., 2008. *Leishmania (V.) braziliensis*: detection by PCR in biopsies from patients with cutaneous leishmaniasis. *Experimental Parasitology*, 119(3), pp.319–324.
- Goncalvez Antonio, E. et al., 2011. Canine visceral leishmaniasis in the Krenak indigenous community Resplendor, Minas Gerais State, Brazil. *Cadernos de Saúde Pública*, 27(3), pp.603–607.
- Gontijo, B., 2003. Leishmaniose tegumentar americana American cutaneous leishmaniasis. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 36(1), pp.71–80.
- Gould, I.T. et al., 2013. Leishmaniasis Visceral en la Argentina. Notificación y situación vectorial (2006-2012). *Medicina*, 73, pp.104–110.
- Gull, K., 2001. The biology of kinetoplastid parasites: insights and challenges from genomics and post-genomics. *International journal for parasitology*, 31(5-6), pp.443–452.
- Harris, E. et al., 1998. Single-step multiplex PCR assay for characterization of New World *Leishmania* complexes. *Journal of clinical microbiology*, 36(7), pp.1989–1995.
- Haydon, D.T. et al., 2002. Identifying reservoirs of infection: a conceptual and practical challenge. *Emerging Infectious Diseases*, 8(12), pp.1468–1473.
- Kato, H. et al., 2010. Molecular epidemiology for vector research on leishmaniasis. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 7(3), pp.814–26.
- Kelly, D.W. & Dye, C., 1997. Pheromones, kairomones and the aggregation dynamics of the sandfly *Lutzomyia longipalpis*. *Animal Behaviour*, pp.721–731.
- Killick-Kendrick, R., 1999. The biology and control of phlebotomine sand flies. *Clinics in Dermatology*, 17(3), pp.279–289.

- Landis, J.R. & Koch, G.G., 1977. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics*, 33, pp.159–174.
- Lara-Silva, F.D.O. et al., 2014. *Rattus norvegicus* (Rodentia: Muridae) Infected by *Leishmania (Leishmania) infantum* (syn. *L. chagasi*) in Brazil. *BioMed Research International*, pp.1-7
- Laurenti, M.D. et al., 2013. Asymptomatic dogs are highly competent to transmit *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* to the natural vector. *Veterinary Parasitology*, 196(3-4), pp.296–300.
- Leite, R.S. et al., 2010. PCR diagnosis of visceral leishmaniasis in asymptomatic dogs using conjunctival swab samples. *Veterinary Parasitology*, 170(3-4), pp.201–206.
- Leonardo, F. & Rebelo, J., 2004. A periurbanizacao de *Lutzomyia whitmani* em area de foco de leishmaniose cutanea, no estado do maranhao, Brasil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 37(3), pp.282–284.
- Lewin, S. et al., 2002. Strain typing in *Leishmania donovani* by using sequence-confirmed amplified region analysis. *International Journal for Parasitology*, 32(10), pp.1267–1276.
- Lewis, D.J. et al., 1977. Proposals for a stable classification of the Phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae). *Systematic Entomology*, 2, pp.329–332.
- Lins, R.M.M.A. et al., 2002. Molecular evolution of the cacophony IVS6 region in sandflies. *Insect Molecular Biology*, 11, pp.117–122.
- Lodish, H., et al. , 2004. *Biologia celular y Molecular* (5° ed.). Editorial Medica Panamericana.
- Lombardo, G. et al., 2012. Detection of *Leishmania infantum* DNA by real-time PCR in canine oral and conjunctival swabs and comparison with other diagnostic techniques. *Veterinary Parasitology*, 184(1), pp.10–17.
- Lukes, J. et al., 2002. Minireview Kinetoplast DNA Network : Evolution of an Improbable Structure. *Eukaryotic Cell*, 1(4), pp.495–502.
- Luque Cabrera, J., & Herráez Sanchez, A., 2002. *Biologia Molecular e Ingenieria Genetica. Conceptos, Tecnicas y Aplicaciones en Ciencias de la Salud*. Madrid: Elsevier Inc.

- Malmasi, A. et al., 2014. Seroepidemiologic Survey of Canine Visceral Leishmaniasis in Tehran and Alborz Provinces of Iran., *Journal of Arthropod-Borne Disease*8(December), pp.132–138.
- Manna, L. et al., 2004. Comparison of different tissue sampling for PCR-based diagnosis and follow-up of canine visceral leishmaniosis. *Veterinary Parasitology*, 125(3-4), pp.251–262.
- Manna, L. et al., 2008. Real-time PCR assay in *Leishmania*-infected dogs treated with meglumine antimoniate and allopurinol. *Veterinary Journal (London, England : 1997)*, 177(2), pp.279–282.
- Marco, J.D. et al., 2005. Species assignation of *Leishmania* from human and canine American tegumentary leishmaniasis cases by multilocus enzyme electrophoresis in North Argentina. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 72(5), pp.606–611.
- Marfurt, J. et al., 2003. Diagnostic genotyping of Old and New World *Leishmania* species by PCR-RFLP. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 46(2), pp.115-124.
- Marlow, M.A. et al., 2014. Multilocus Sequence Analysis for *Leishmania braziliensis* Outbreak Investigation. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 8(2), e2695.
- Maroli, M. et al., 2013. Phlebotomine sandflies and the spreading of leishmaniasis and other diseases of public health concern. *Medical and Veterinary Entomology*, 27(2), pp.123–147.
- Martínez-Camblor, P., 2012. Ajuste del valor-p por contrastes múltiples. *Revista Chilena de Salud Publica*, 16(3), pp.225–232.
- Martín-Sánchez, J. et al., 2009. Canine leishmaniasis in southeastern Spain. *Emerging Infectious Diseases*, 15(5), pp.795–798.
- Mastrangelo, A.V. & Salomón, O.D., 2010. Trabajo rural en áreas de transmisión de Leishmaniasis Cutánea : Un análisis social centrado en el riesgo para el N de Misiones (Argentina). *Bio-Phronesis: Revista de Bioética y Socioantropología en Medicina*, vol. V pp. 1 –21.
- Michalsky, et al., 2009 a. Phlebotominae distribution in Janaúba, an area of transmission for visceral leishmaniasis in Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 104(February), pp.56–61.

- Michalsky, et al., 2009 b. Association of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) population density with climate variables in Montes Claros, an area of American visceral leishmaniasis transmission in the state of Minas Gerais, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 104(8), pp.1191–1193.
- Ministerio de Salud de la Nacion, 2013. Leishmaniasis Humana y Canina: Normativa y Tutorial.
- Ministerio de Salud de la Nacion, 2014. *Sistema Nacional de Vigilancia de la Salud. Area Epidemiologia*.
- Ministerio de Salud de la Nacion. (2015). Boletín Integrado de Vigilancia.
- Miró, G. et al., 2012. Current situation of *Leishmania infantum* infection in shelter dogs in northern Spain. *Parasites & Vectors*, 5(1), p.60.
- Missawa, N.A. & Dias, E.S., 2007. Phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) in the municipality of Varzea Grande: an area of transmission of visceral leishmaniasis in the state of Mato Grosso, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 102(December), pp.913–918.
- Missawa, N.A. et al., 2010. *Lutzomyia longipalpis* naturally infected by *Leishmania (L.) chagasi* in Várzea Grande, Mato Grosso State, Brazil, an area of intense transmission of visceral leishmaniasis. *Cadernos de Saúde Pública*, 26(12), pp.2414–2419.
- Montalvo, A.M. et al., 2012. Three new sensitive and specific heat-shock protein 70 PCRs for global *Leishmania* species identification. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, pp.1453–1461.
- Morrison, A. et al., 1995. Seasonal abundance of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) at an endemic focus of visceral leishmaniasis in Colombia. *Journal of Medical Entomology*, 32(4), pp.538–548.
- Moshfe, A. et al., 2008. Seroepidemiological Study on Canine Visceral Leishmaniasis in Meshkin-Shahr District, Ardabil Province, Northwest of Iran during 2006-2007. *Iranian Journal of Parasitology*, 3(3), pp.1–10.
- Mott, K.E. et al., 1990. Parasitic diseases and urban development. *Bulletin of the World Health Organization*, 68(6), pp.691–698.

- Muskus, C. & Marin Villa, M., 2002. Metacyclogenesis: a basic process in the biology of *Leishmania*. *Biomedica*, 22(2), pp.166–177.
- Myler, P.J. & Stuart, K.D., 2000. Recent developments from the *Leishmania* genome project. *Current opinion in Microbiology*, 3(4), pp.412–416.
- Norman, G.R. & Streiner, D.L., 1999. *PDQ Statistics* Second ed., Ontario, Canada: B. C. Decker Inc.
- Oliva, G. et al., 2006. Incidence and Time Course of *Leishmania infantum* Infections Examined by Techniques in a Cohort of Naive Dogs Exposed to Three Consecutive Transmission Seasons. *Journal of Clinical Microbiology*, 44 (4), pp.1318-1322
- De Oliveira, A.G., Falcão, A.L. & Brazil, R.P., 2000. Primeiro encontro de *Lutzomyia longipalpis* ( Lutz & Neiva, 1912) na area urbana de Campo Grande, MS,Brasil. *Journal of Public Health*, 34(6), pp.654–655.
- Oliveira de Andrade, A. R., et al., 2014. Spatial distribution and environmental factors associated to phlebotomine fauna in a border area of transmission of visceral leishmaniasis in Mato Grosso do Sul, Brazil. *Parasites & Vectors*, 7(1), 260.
- OPS/OMS, 2013. *RePLeish.2º Reunión de los PROGRAMAS NACIONALES DE LEISHMANIASIS EN LAS AMÉRICAS. Informe Final*, Ciudad de Panama, Panama.
- PAHO/WHO, O.P.A.H.O./ W.H.O. & SOPERJ, 2008. Update of American Trypanosomiasis and Leishmaniasis Control and Research:Final Report.
- Paiva, B.R. et al., 2006. Detection and identification of *Leishmania* species in field-captured phlebotomine sandflies based on mini-exon gene PCR. *Acta Tropica*, 99(2-3), pp.252–9.
- Peacock, C.S. et al., 2007. Comparative genomic analysis of three *Leishmania* species that cause diverse human disease. *Nature Genetics*, 39(7), pp.839–847.
- Peixoto, a a et al., 2001. New molecular markers for phlebotomine sand flies. *International Journal for Parasitology*, 31(5-6), pp.635–639.
- Pilatti, M.M. et al., 2009. Comparison of PCR methods for diagnosis of canine visceral leishmaniasis in conjunctival swab samples. *Research in Veterinary Science*, 87(2), pp.255–257.

- Pita-Pereira, D. et al., 2005. Identification of naturally infected *Lutzomyia intermedia* and *Lutzomyia migonei* with *Leishmania (Viannia) braziliensis* in Rio de Janeiro (Brazil) revealed by PCR-multiplex non isotopic hibridisation assay. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 99(12), pp.905–913
- Pita-Pereira, D. et al., 2008. Detection of natural infection in *Lutzomyia cruzi* and *Lutzomyia forattinii* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) by *Leishmania infantum chagasi* in an endemic area of visceral leishmaniasis in Brazil using a PCR multiplex assay. *Acta Tropica*, 107(1), pp.66–69.
- Pita-pereira, D. et al., 2009. Short Report: First Report of *Lutzomyia (Nyssomyia ) neivai* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) Naturally Infected by *Leishmania (Viannia) braziliensis* in a Periurban Area of South Brazil Using a Multiplex Polymerase Chain Reaction Assay. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 80(4), pp.593–595.
- PNL. Ministerio de Salud Pública de la Nación., 2004. Manual de procedimientos para el control de Leishmaniasis. Nivel gerencial y profesional.
- Programa Nacional de Leishmaniasis, Ministerio de salud de la Nacion., 2009. *Programa nacional de Leishmaniasis. Documento de trabajo.*
- Promega, 2011. 1 Nucleic Acid Amplification PROTOCOLS & APPLICATIONS GUIDE. [www.promega.com](http://www.promega.com), p.11.
- Quaresma, P.F. et al., 2009. Molecular diagnosis of canine visceral leishmaniasis: identification of *Leishmania* species by PCR-RFLP and quantification of parasite DNA by real-time PCR. *Acta Tropica*, 111(3), pp.289–294.
- Quinhones Pires, M. et al., 2014. Cutaneous and visceral leishmaniasis co-infection in dogs from Rio de Janeiro, Brazil: evaluation by specific PCR and RFLP-PCR assays. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 47(2), pp.243–246.
- Quinn, G.P. & Keough, M.J., 2002. *Experimental Design and Data analysis for Biologists*, Cambridge University Press.
- Quinnell, R.J. et al., 2001. Detection of *Leishmania infantum* by PCR, serology and cellular immune response in a cohort study of Brazilian dogs. *Parasitology*, 122(Pt 3), pp.253–261.

- Quintana, M.G. et al., 2010. Distribution of Phlebotomine Sand Flies (Diptera: Psychodidae) in a Primary Forest-Crop Interface, Salta, Argentina. *Journal of Medical Entomology*, 47(6), pp.1003–1010.
- Quintana, M.G. et al., 2012. Distribution and abundance of phlebotominae, vectors of leishmaniasis, in Argentina: spatial and temporal analysis at different scales. *Journal of Tropical Medicine*, 2012, pp.1-16.
- Ranasinghe, S. et al., 2008. A real-time PCR assay to estimate *Leishmania chagasi* load in its natural sand fly vector *Lutzomyia longipalpis*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 102(9), pp.875–882.
- Rangel, E.F. et al., 1986. Biologia de *Lutzomyia intermedia* Lutz & Neiva, 1912 e *Lutzomyia longipalpis* Lutz & Neiva, 1912 (Diptera, Phychodidae), em condições experimentais. I. aspectos da alimentação de larvas e adultos. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 81(4), pp.431–438.
- Rangel, E.F., 2008. *Lutzomyia longipalpis* (Diptera , Psychodidae , Phlebotominae) and urbanization of visceral leishmaniasis in Brazil. *Cadernos Saude Publica*, 24(12), pp.2948–2952.
- Rangel, O. et al., 2012. The distribution pattern of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) in the peridomiciles of a sector with canine and human visceral leishmaniasis transmission in the municipality of Dracena, São Paulo, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 107(2), pp.163–169.
- Ready, P.D., 2008. Leishmaniasis emergence and climate change. *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)*, 27(2), pp.399–412.
- Ready, P.D., 2013. Biology of phlebotomine sand flies as vectors of disease agents. *Annual Review of Entomology*, 58, pp.227–250.
- Rebêlo, J.M., 2001. Freqüência horária e sazonalidade de *Lutzomyia longipalpis* (Diptera : Psychodidae : Phlebotominae) na Ilha de São Luís , Maranhão , Brasil. *Cadernos de Saúde Pública*, 17(1), pp.221–227.
- Reithinger, R. et al., 2000. Use of PCR to detect *Leishmania* (*Viannia*) spp. in dog blood and bone marrow. *Journal of Clinical Microbiology*, 38(2), pp.748–751.
- Reithinger, R. et al., 2002. Rapid Detection of *Leishmania infantum* Infection in Dogs : Comparative Study Using an Immunochromatographic Dipstick Test , Enzyme-

- Linked Immunosorbent Assay , and PCR. *Journal of Jlinical microbiology*, 40(7), pp.2352–56.
- Reithinger, R. & Dujardin, J.-C., 2007. Molecular diagnosis of leishmaniasis: current status and future applications. *Journal of Clinical Microbiology*, 45(1), pp.21–25.
- Roberts, L.J. et al., 2000. Science, medicine, and future. Leishmaniasis. *British Medical Journal*, (321)(September), pp.801-804.
- Roelfsema, J.H. et al., 2011. Evaluation and improvement of two PCR targets in molecular typing of clinical samples of *Leishmania* patients. *Experimental Parasitology*, 127(1), pp.36–41.
- Romero, G. a S. & Boelaert, M., 2010. Control of visceral leishmaniasis in latin america-a systematic review. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 4(1), p.e584.
- Roque, A.L.R. & Jansen, A.M., 2014. Wild and synanthropic reservoirs of *Leishmania* species in the Americas. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, 3(3), pp.251–262.
- Rosa, J. et al., 2012. Natural infection of *cortelezzii* complex (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) with *Leishmania braziliensis* in Chaco, Argentina. *Acta Tropica*, 123(2), pp.128–131.
- Rotureau, B. et al., 2006. Use of PCR-restriction fragment length polymorphism analysis to identify the main new world *Leishmania* species and analyze their taxonomic properties and polymorphism by application of the assay to clinical samples. *Journal of Clinical Microbiology*, 44(2), pp.459–467.
- Saiki, R.K. et al., 1992. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. 1985. *Biotechnology (Reading, Mass.)*, 24, pp.476–480.
- Salomón, O.D. et al., 2001 a. Presencia de *Lutzomyia longipalpis* y situación de la leishmaniosis visceral en Argentina. *Medicina Buenos Aires*, 61, pp.174–178.
- Salomón, O.D., et al., 2001 b. Epidemic outbreak of tegumentary leishmaniasis in Puerto Esperanza, Misiones, 1998. *Medicina Buenos Aires*, 61(4), pp.385–390.
- Salomón, O.D., 2002. Leishmaniasis: vectores y brotes epidemicos en Argentina. Actualizaciones en artropodologia sanitaria Argentina. O.D. Salomon, ed., Fundación Mundo Sano.

- Salomón, O.D. et al., 2003. Phlebotominae Sand Flies in Paraguay. Abundance Distribution in the Southeastern Region. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 98(2), pp.185–190.
- Salomón, O.D. et al., 2004. Spatial and temporal patterns of phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) in a cutaneous leishmaniasis focus in northern Argentina. *Journal of Medical Entomology*, 41(1), pp.33–39.
- Salomón, O.D. & Orellano, P.W., 2005. *Lutzomyia longipalpis* in Clorinda, Formosa province, an area of potential visceral leishmaniasis transmission in Argentina. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 100(5), pp.475–476.
- Salomón, O.D., 2005. *Artrópodos de interés médico en Argentina. Phlebotominae, flebotomos. Capítulo 10. Serie enfermedades transmisibles*, Fundación Mundo Sano.
- Salomón, O.D. et al., 2006. Transmisión de la Leishmaniasis tegumentaria en la Argentina. *Medicina Buenos Aires*, 66(3), pp.211–219.
- Salomón, O.D., et al., 2008 a. First visceral leishmaniasis focus in Argentina. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 103(1), pp.109–111.
- Salomón, O.D. et al., 2008 b. Ecoepidemiología de la leishmaniasis cutánea en la Argentina. *Sociedad Iberoamericana de Información Científica*, 16(5), pp.514–520.
- Salomón, O.D. et al., 2009 a. Epidemiological aspects of cutaneous leishmaniasis in the Iguazú falls area of Argentina. *Acta Tropica*, 109(1), pp.5–11.
- Salomón, O.D. et al., 2009 b. Distribución de vectores de leishmaniasis visceral en la provincia de Corrientes, 2008. *Medicina Buenos Aires*, 69(625-630).
- Salomón, O.D. et al., 2010. *Lutzomyia migonei* as putative vector of visceral leishmaniasis in La Banda, Argentina. *Acta Tropica*, 113(1), pp.84–87.
- Salomón, O.D., 2010. Mapa de riesgo de leishmaniasis visceral en áreas vulnerables de Argentina y Uruguay. Informe ANLIS, DET.
- Salomón, O.D. et al., 2011. Distribución de *Lutzomyia longipalpis* en la Mesopotamia Argentina, 2010. *Medicina Buenos Aires*, 71, pp.22–26.
- Salomón, O.D. et al., 2012. Leishmaniasis and climate change-case study: Argentina. *Journal of Tropical Medicine*, pp.1-11

- Sant'anna, M.R. et al., 2010. Chicken blood provides a suitable meal for the sand fly *Lutzomyia longipalpis* and does not inhibit *Leishmania* development in the gut. *Parasites & Vectors*, 3, pp.3–11.
- Santamaría, E. et al., 2005. Validación de la PCR en la detección de parásitos *Lutzomyia* (Diptera: Psychodidae) como herramienta en la definición de especies vectorales. *Biomédica* (25), pp.271–279.
- Santini, M.S. et al., 2010. *Lutzomyia longipalpis* behavior and control at an urban visceral leishmaniasis focus in Argentina. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 52(4), pp.187–191.
- Santini, M.S. et al., 2012. *Lutzomyia longipalpis* abundance in the city of Posadas, northeastern Argentina: variations at different spatial scales. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 107(6), pp.767–771.
- Santini, M.S. et al., 2013. Spatial Distribution of Phlebotominae in Puerto Iguazu-Misiones, Argentina-Brazil-Paraguay Border Area. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 55(4), pp.239–243.
- Saraiva, L. et al., 2009. Natural Infection of *Lutzomyia neivai* and *Lutzomyia sallesi* (Diptera: Psychodidae) by *Leishmania infantum chagasi* in Brazil. *Vector/Pathogen/Host Interaction, Transmission*, 46(5), pp.1159–1163.
- Saraiva, L. et al., 2010. The molecular detection of different *Leishmania* species within sand flies from a cutaneous and visceral leishmaniasis sympatric area in Southeastern Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 105(December), pp.1033–1039.
- Schönian, G. et al., 2003. PCR diagnosis and characterization of *Leishmania* in local and imported clinical samples. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 47(1), pp.349–358.
- Shang, L. et al., 2011. The prevalence of canine *Leishmania infantum* infection in Sichuan Province, southwestern China detected by real time PCR. *Parasites & vectors*, 4(1), pp.173.
- Shaw, J., 2007. The leishmaniasis - survival and expansion in a changing world. A mini-review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 102(August), pp.541–547.

- Silva, C.B. Da et al., 2013. Seroepidemiological aspects of *Leishmania* spp. in dogs in the Itaguaí micro-region, Rio de Janeiro, Brazil. *Revista brasileira de parasitologia veterinária = Brazilian journal of veterinary parasitology: Órgão Oficial do Colégio Brasileiro de Parasitologia Veterinária*, 22(1), pp.39–45.
- Silva, E.A. et al., 2007. Comportamento de *Lutzomyia longipalpis*, vetor principal da leishmaniose visceral americana, em Campo Grande, Estado do Mato Grosso do Sul. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 40(4), pp.420–425.
- Silva, E.A. et al., 2008. Detection of *Leishmania* DNA in phlebotomines captured in Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil. *Experimental Parasitology*, 119(3), pp.343–348.
- Da Silva, L.A. et al., 2010. Sequence analysis and PCR-RFLP profiling of the hsp70 gene as a valuable tool for identifying *Leishmania* species associated with human leishmaniasis in Brazil. *Infection, Genetics and Evolution: Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases*, 10(1), pp.77–83.
- Sistema Meteorológico Nacional. 2012., p.<http://www.smn.gov.br/>.
- Soares, R.P.P. & Turco, S.J., 2003. *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae): a review. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 75(3), pp.301–330.
- Solano-Gallego, L. et al., 2001. Prevalence of *Leishmania infantum* Infection in Dogs Living in an Area of Canine Leishmaniasis Endemicity Using PCR on Several Tissues and Serology. *Journal of Clinical Microbiology*, 39(2), pp.560–563.
- Solano-Gallego, L. et al., 2011. LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniasis. *Parasites & Vectors*, 4(1), p.86.
- Sosa-Estani, S. et al., 2001. Leishmaniose cutânea no Norte da Argentina. Fatores de risco identificados num estudo caso-coorte em três municípios de Salta Cutaneous leishmaniasis in Northern Argentina. Identification of risk. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 34(6), pp.511–517.
- Souza, C.M. et al., 2004. Study on phlebotomine sand fly (Diptera: Psychodidae) fauna in Belo Horizonte, state of Minas Gerais, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 99(8), pp.795–803.

- Stauch, A. et al., 2011. Visceral leishmaniasis in the Indian subcontinent: modelling epidemiology and control. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 5(11), p.e1405.
- Stauch, A. et al., 2014. Model-based investigations of different vector-related intervention strategies to eliminate visceral leishmaniasis on the Indian subcontinent. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 8(4), p.e2810.
- Strauss-Ayali, D. et al., 2004. Polymerase chain reaction using noninvasively obtained samples, for the detection of *Leishmania infantum* DNA in dogs. *The Journal of Infectious Diseases*, 189(9), pp.1729–1733.
- El Tai, N. O. et al., 2000. Genetic heterogeneity of ribosomal internal transcribed spacer in clinical samples of *Leishmania donovani* spotted on filter paper as revealed by single-strand conformation polymorphisms and sequencing. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 94(5), pp.575–579.
- Tashakori, M. et al., 2006. *Leishmania major*: genetic heterogeneity of Iranian isolates by single-strand conformation polymorphism and sequence analysis of ribosomal DNA internal transcribed spacer. *Acta Tropica*, 98(1), pp.52–58.
- Thies, S.F. et al., 2013. Phlebotomine sandfly fauna and natural *Leishmania* infection rates in a rural area of Cerrado (tropical savannah) in Nova Mutum, State of Mato Grosso in Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 46 (February), pp.293–298.
- Volf, P. & Volfova, V., 2011. Establishment and maintenance of sand fly colonies. *Journal of Vector Ecology*, 36, pp.S1–S9.
- WHO, 2010. Technical report series 99. Control of the Leishmaniasis. *Report of the meeting of the WHO experts committee on the control of Leishmaniasis.*, Geneva.
- Ximenes, M. et al., 2006. Effect of Abiotic Factors on Seasonal Population Dynamics of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera : Psychodidae) in Northeastern Brazil. *Journal of Medical Entomology* 43(5), pp.990-994.
- Young, D.G. & Duncan, M.A., 1994. *Guide to the identification and geographic distribution of Lutzomyia sand flies in Mexico, the west Indies, Central and South America (Diptera: Psychodidae)*, Associated Publishers

# 10 ANEXOS

## 10.1 ANEXO I

### 10.1.1 PROTOCOLOS DE EXTRACCIÓN DE ADN ADAPTADOS EN EL MARCO DE ESTA TESIS:

#### **Protocolo de Extracción de ADN Hisopado de Conjuntiva**

1. Adherir el hisopo a la pared del tubo con cinta de papel, centrifugar a 7000 rpm en centrifuga por 1 minuto hasta extraer todo el líquido del hisopo. Descartar el hisopo seco.
2. Cambiar la muestra a otro tubo, rotulado correctamente.
3. Agregar 125 µl de solución de trabajo (*working*)- Proteinasa K (0.25 ng/µl) más 175 µl de *working* únicamente. Mezclar por vortex.
4. Llevar a baño a 58°C durante 2 horas. Mezclar por vortex y realizar spin cada media hora.
5. Agregar 0,5 ml de Fenol-Cloroformo-Alcohol isoamílico (Ph8). Mezclar suavemente por 2-3 minutos.
6. Centrifugar 5 minutos en ultracentrífuga a máxima velocidad. Tomar fase superior (250 µl aproximadamente) y transferir a otro tubo.
7. Repetir pasos 5 y 6.
8. Agregar 700 µl de Cloroformo- Alcohol isoamílico (24:1 v/v), mezclar suavemente.
9. Centrifugar 3 minutos a máx. velocidad en ultracentrífuga.
10. Tomar fase superior y transferir a otro tubo.
11. Agregar 2 µl de ARNt y 2 y ½ volúmenes de Etanol 100 % helado. (pe para 400 µl 1 ml de Etoh) Mezclar suavemente. No mezclar con vortex. Incubar toda la noche a -20°C.
12. Centrifugar a máxima velocidad en ultracentrífuga por 20 minutos cuidadosamente remover el sobrenadante, cuidando de no remover el pellet.
13. Dejar que se evapore el líquido o secar 5 minutos en placa térmica a 38°C. Resuspender en 30 µl de agua PCR o TE (10 M Tris, 1 M EDTA).

### **Protocolo de extracción de ADN a partir de capa de glóbulos blancos**

1. A partir de sangre entera (dos gotas EDTA) centrifugar 15 minutos a 3000 rpm, descartar sobrenadante (plasma), tomar capa de blancos tratando de levantar la menor cantidad posible de glóbulos rojos.
2. Agregar 167  $\mu$ l de solución de *working*-Proteinasa K (0.2 ug/ $\mu$ l) mas 333  $\mu$ l de *working* solamente. Mezclar con vortex
3. Llevar a baño a 58°C toda la noche. Mezclar por vortex, realizar spin regularmente.
4. Agregar 0,5 ml de Fenol-Cloroformo-Alcohol isoamílico (Ph8). Mezclar suavemente por 1-2 minutos.
5. Centrifugar 5 minutos a máx. velocidad en ultracentrífuga. Tomar fase superior (480  $\mu$ l aproximadamente) y transferir cuidadosamente de la fase superior a otro tubo.
6. Repetir pasos 4 y 5.
7. Agregar 700  $\mu$ l de Cloroformo- alcohol isoamílico (24:1 v/v), Mezclar suavemente.
8. Centrifugar 3 minutos a máx. velocidad en ultracentrífuga
9. Tomar fase superior y pasarla a otro tubo.
10. Agregar 2  $\mu$ l de ARNt y 2 y ½ volúmenes de Etanol 100 % helado. Mezclar suavemente. Incubar toda la noche a -20°C.
11. Centrifugar a máx. velocidad en ultracentrífuga por 20 minutos, cuidadosamente remover el sobrenadante, cuidando de no remover el pellet.
12. Dejar que se evapore el líquido o secar 5 min. en placa térmica a 38°C. Resuspender en 50  $\mu$ l de agua PCR o TE (10 M Tris, 1 M EDTA).

### **Protocolo de extracción de ADN ganglio poplíteo**

Lavado previo a extracción con Solucion Sodio Citrato (SCC) 1 X :

- Colocar 500  $\mu$ l de SSC 1 X a la muestra.
  - Homogeneizar con cuidado de no disgregar las células.
  - Centrifugar a 1400 rpm por 5 minutos.
  - Descartar la fase superior (descartar el SSC y dejar las células).
1. Agregar al material 350  $\mu$ l de solución de trabajo (*working*)-Proteinasa K [0,6  $\mu$ g/ $\mu$ l] y 150  $\mu$ l de *working* solamente. Mezclar por vortex, realizar spin.
  2. Llevar a baño a 58°C toda la noche. Mezclar por vortex, realizar spin regularmente.

3. Agregar 0,5 ml de Fenol-Cloroformo-Alcohol isoamílico (PH: 8). Mezclar suavemente por 2-3 minutos.
4. Centrifugar 5 minutos a máx. velocidad en ultracentrífuga, tomar la fase superior y transferir cuidadosamente (480 µl aproximadamente) a otro tubo.
5. Repetir pasos 3 y 4 .
6. Agregar 700 µl de Cloroformo- Alcohol isoamílico (24:1 v/v), Mezclar suavemente.
7. Centrifugar 3 minutos a máx. velocidad en ultracentrífuga.
8. Tomar fase superior y pasarla a otro tubo.
9. Agregar 2 µl de ARNt y 2 y ½ volúmenes de Etanol 100 % helado ( p.e. para 400 ul 1 ml de Etoh). Mezclar suavemente. Incubar ON a -20°C.
10. Centrifugar a máx. velocidad por 20 minutos. Descartar cuidadosamente el sobrenadante.
11. Dejar que se evapore el líquido o secar 5 min en placa térmica a 38°C. Resuspender en 50 µl de agua PCR o TE (10 M Tris, 1 M EDTA).

---

10.1.2 PROTOCOLOS DE EXTRACCIÓN DE ADN CON LOS QUE SE  
CONTABA EN EL LABORATORIO PREVIAMENTE AL  
DESARROLLO DE ESTA TESIS:

**Protocolo de extracción de DNA a partir de cultivos de *Leishmania* sp.**

1. Centrifugar 0.5 ml de cultivo a 3000 rpm. (800 g) durante 5' y 5'a máxima velocidad, descartar sobrenadante.
2. Agregar 1 ml de PBS. Resuspender las células suavemente
3. Centrifugar a 3000 rpm (800g) durante 5' y 5'a máxima velocidad , descartar sobrenadante.
4. Agregar 500 ul de solución de trabajo (*working*)-Proteinasa K. Realizar un spin
5. Llevar a baño a 58°C durante 2 horas. Realizar spin cada hora.
6. Agregar 0,5 ml de Fenol-Cloroformo-Alcohol isoamílico. Mezclar suavemente por 2-3 minutos.
7. Centrifugar 5 minutos a máxima velocidad tomar fase superior y transferirla a otro tubo.
8. Repetir pasos 6 y 7
9. Agregar 700 ul de Cloroformo- alcohol isoamílico (24:1 v/v), mezclar suavemente.

10. Centrifugar 2 minutos a máx. velocidad en ultracentrífuga.
11. Tomar fase superior y transferirla a otro tubo.
12. Agregar 2  $\mu$ l de ARNt y 2 y  $\frac{1}{2}$  volúmenes de Etanol 100 % helado. (pe para 400  $\mu$ l 1 ml de Etoh) Mezclar suavemente. No mezclar con vortex. Incubar durante toda la noche a -20°C.
13. Centrifugar a máx. velocidad en ultracentrífuga por 20 minutos. Cuidadosamente remover el sobrenadante, cuidando de no remover el pellet.
14. Dejar que se evapore el líquido o secar 5 min. en placa térmica a 37 °C. Resuspender en 50  $\mu$ l de agua PCR o TE (10 M Tris, 1 M EDTA).

### **Protocolo de extracción de DNA a partir de Biopsia Humanas**

1. Retirar PBS 1X, en caso de que este preservado en alcohol u otra solución, lavarlo con 500  $\mu$ l de PBS 1X y vortexear. Retirarlo.
2. Repetir la operación 1.
3. Agregar 500  $\mu$ l de solución de trabajo (*working*)-Proteinasa K (0,42  $\mu$ g/ $\mu$ l). Realizar un spin.
4. Llevar a baño a 58° C durante 3 horas. Realizar vortex cada media hora.
5. Agregar 500  $\mu$ l de Fenol-Cloroformo-Alcohol isoamílico. Mezclar suavemente por 2-3 minutos.
6. Centrifugar 5 minutos a máxima velocidad tomar fase superior y transferirla a otro tubo.
7. Repetir pasos 5 y 6.
8. Agregar 700  $\mu$ l de Cloroformo- alcohol isoamílico (24:1 v/v), mezclar suavemente.
9. Centrifugar 2 minutos a máx. velocidad en ultracentrífuga.
10. Tomar fase superior y transferirla a otro tubo.
11. Agregar 2  $\mu$ l de ARNt y 2 y  $\frac{1}{2}$  volúmenes de Etanol 100 % helado. (pe para 400  $\mu$ l 1 ml de Etoh) Mezclar suavemente. No mezclar con vortex. Incubar durante toda la noche a -20°C.
12. Centrifugar a máx. velocidad en ultracentrífuga por 20 minutos. Cuidadosamente remover el sobrenadante, cuidando de no remover el pellet.
13. Dejar que se evapore el líquido o secar 5 min. en placa térmica a 37° C. Resuspender en 50  $\mu$ l de agua PCR o TE (10 M Tris, 1 M EDTA).

### Protocolo de extracción de ADN a partir de phlebotominae

1. Agregar 30  $\mu\text{l}$  de solución de trabajo (*working*)-Proteinasa K (0,42  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ); macerar con micromortero. Agregar los 320  $\mu\text{l}$  restantes de Sn W-Proteinasa K más 150  $\mu\text{l}$  de *working*
2. Llevar a baño a 58°C durante 8 horas. Realizar vortex cada media hora.
3. Agregar 0,5 ml de Fenol-Cloroformo-Alcohol isoamílico (24:24:1 v/v). Mezclar suavemente por 1-2 minutos.
4. Centrifugar 5 minutos a máx. velocidad en ultracentrífuga tomar fase superior y transferirla a otro tubo.
5. Repetir pasos 4 y 5.
6. Agregar 700  $\mu\text{l}$  de Cloroformo- Alcohol isoamílico (24:1 v/v), mezclar suavemente.
7. Centrifugar 3 minutos a máx. velocidad en ultracentrífuga.
8. Tomar fase superior y transferirla a otro tubo.
9. Agregar 2  $\mu\text{l}$  de ARNt y 2 y  $\frac{1}{2}$  volúmenes de alcohol 100 % helado. (pe para 400  $\mu\text{l}$  1 ml de Etoh) Mezclar suavemente. No mezclar con vortex. Incubar toda la noche a -20°C
10. Centrifugar a máx. velocidad en ultracentrífuga por 20 minutos, cuidadosamente remover el sobrenadante, cuidando de no remover el pellet.
11. Dejar que se evapore el líquido o secar 5 min. en placa térmica a 37°C. Resuspender en 50  $\mu\text{l}$  de agua PCR o TE (10 M Tris, 1 M EDTA).

---

### 10.1.3 OPTIMIZACION PROTOCOLOS DE PCR-RFLP

---

#### 10.1.3.1 MINIEXON

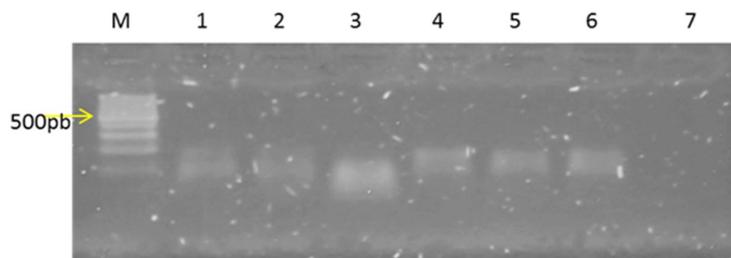
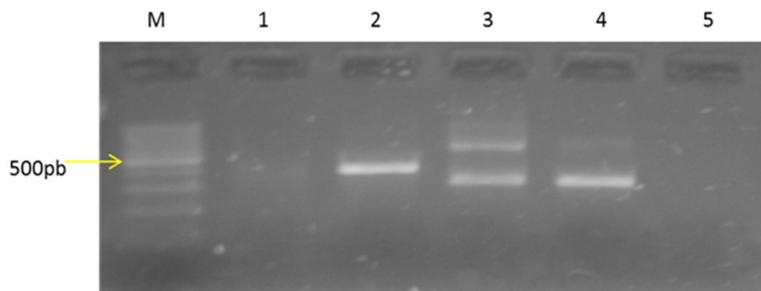


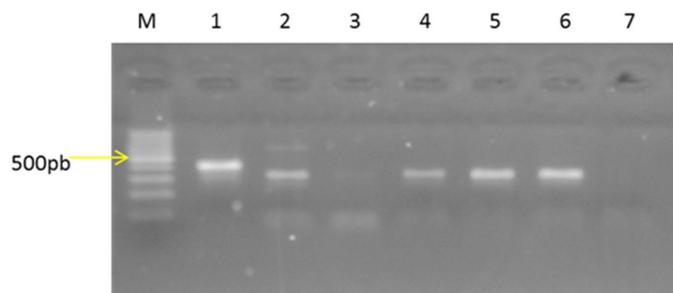
Ilustración a

M: marcador de peso molecular; 1: 5ul cepa *Leishmania (L) infantum* [5,19ng/ul]; 2: 2ul cepa *Leishmania (L) infantum* [5,19ng/ul]; 3: 5 ul cepa *Leishmania (L) amazonensis* [11,6 ng/ul]; 4:5 ul cepa *Leishmania (L) amazonensis* [11,6 ng/ul]; 5:5 ul cepa *Leishmania (L) amazonensis* [6,41 ng/ul]; 6:2ul cepa *Leishmania (L) amazonensis* [6,41 ng/ul]; 7: control negativo agua.



**Ilustración b**

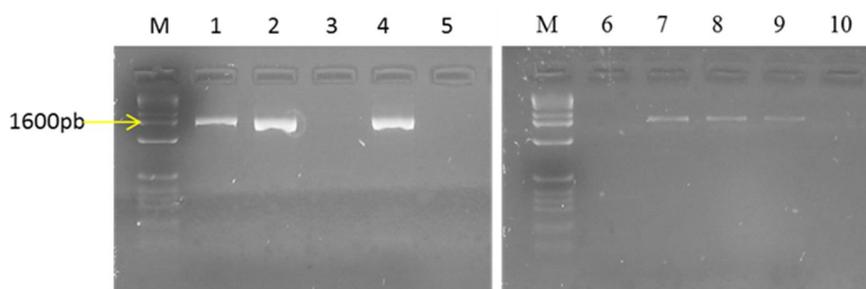
M: marcador de peso molecular ,1: 5ul cepa *Leishmania (L) infantum* cedida por Instituto Ciencias de La Salud de concentracion desconocida.; 2: 7,5 ul cepa *Leishmania (L) infantum* [5,19ng/ul]; 3: 7,5 ul cepa *Leishmania (L) amazonensis* [6,41 ng/ul]; 4:5 ul cepa *Leishmania (L) amazonensis* [6,41 ng/ul]; 5: Control negativo agua.



**Ilustración c**

M: marcador de peso molecular ,1: 7,5ul cepa *Leishmania (L) infantum*[5,19ng/ul]; 2: 5 ul cepa *Leishmania (L) amazonensis* [6,41 ng/ul]; 3: 2 ul cepa *Leishmania (L) amazonensis* [6,41 ng/ul]; 4-6: 2, 5 y 7,5 ul cepa *Leishmania (L) amazonensis* [11,6 ng/ul]; 7: Control negativo agua.

10.1.3.2 HSP70



**Ilustración d**

M: marcador de peso molecular 1 kb. Calles 1-4: 3,5ul *Leishmania (L) amazonensis* [16ng/ul] a 1;1,5;2 y 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>. Calles 6-9: 3,5 ul *Leishmania(L) infantum* [34,8ng/ul] a 1;1,5;2 y 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>. Calles 5 y 10: control negativo agua.

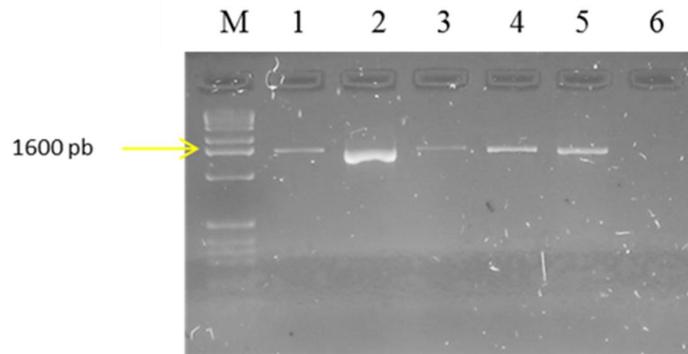


Ilustración e

M: marcador de peso molecular 1 kb. Calles 1-5 3,5ul *Leishmania (L) amazonensis* [6,41ng/ul] a 1;1,5;2; 2,5 y 3 mM MgCl<sub>2</sub>. Calle 6 control negativo agua.

### 10.1.3.3 ITS-1

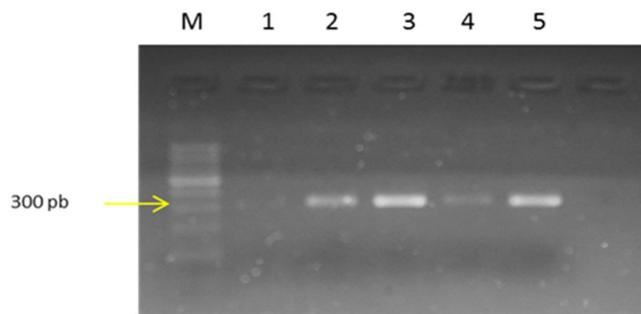


Ilustración f

M: marcador de peso molecular 1 kb. Calles 1-5 3,5ul *Leishmania (L) infantum* [15,7ng/ul] a 1;1,5;2; 2,5 y 3 mM MgCl<sub>2</sub>.

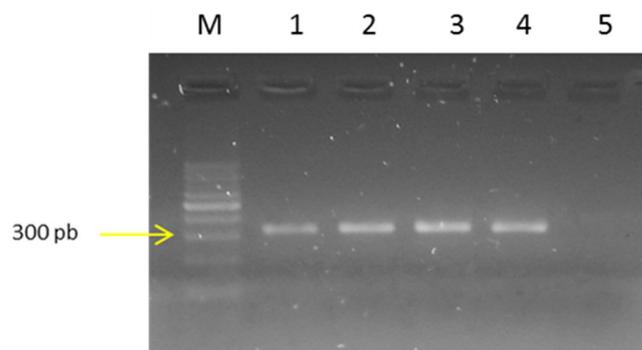


Ilustración g

M: marcador de peso molecular 1 kb. Calles 1-5 3,5ul *Leishmania (L) amazonensis* [20,9ng/ul] a 1;1,5;2; 2,5 y 3 mM MgCl<sub>2</sub>.

## 10.2 ANEXO II

### ACUERDO VOLUNTARIO

#### CONSENTIMIENTO INFORMADO

Por medio del presente documento y teniendo plena capacidad de mis facultades mentales, doy mi consentimiento y me ofrezco voluntariamente para participar de la investigación médica vinculada al diagnóstico de las patologías Leishmaniasis Visceral y Tegumentaria, la cual consiste en detectar e identificar al parásito de género *leishmania sp.* en raspados y biopsias de pacientes con úlceras cutáneas además de biopsias y muestras de sangre de pacientes con sintomatología compatible con Leishmaniasis visceral, que se realizará bajo la Dirección del Laboratorio de Biología Molecular Aplicada perteneciente a la Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales de la Universidad Nacional de Misiones, con domicilio en la Av. Mariano Moreno N°1375 de la ciudad de Posadas (CP 3300), Provincia de Misiones, República Argentina, quienes adoptan los principios éticos para las investigaciones médicas en seres humanos descriptos en la Declaración de Helsinki de la Asociación Médica Mundial en su última versión de octubre del año 2000 y de la Carta de Derechos en Genética (Bulletin of Medical Ethics, Number 158, May 2000, p.7), destacando el derecho a la privacidad genética, incluyendo el derecho a prevenir la toma o almacenamiento de muestras corporales para información genética sin el voluntario consentimiento informado.-----

Dejo explícito que se me ha puesto en conocimiento del significado de mi participación voluntaria, la duración y finalidad del estudio, los métodos diagnósticos a ser empleados y el alcance del resultado a ser obtenido. Así mismo, he tenido la oportunidad de realizar preguntas referidas a este estudio y las respuestas recibidas han sido todas satisfactorias. Sé que la información que sobre mí se obtenga como producto de la participación de este estudio podrá ser empleada en ámbitos científicos para favorecer el adelanto de las ciencias biomédicas, bajo la condición que se preservará el carácter de confidencialidad de mi persona y de cualquier dato vinculado a la identidad de la misma.----- Sé que dispongo de plena libertad de dejar de participar en este estudio en el momento en que así lo desee, debiendo para ello notificar por escrito al Dr. Domingo Javier Liotta, Director del Laboratorio de Biología Molecular Aplicada o a la Lic. Soraya Alejandra Acardi a dirección postal previamente citada. Sé que mi exclusión del presente estudio se realizará sin cuestionamiento alguno y se concretará una vez que la mencionada persona se notifique de mi decisión. Ninguna gratificación financiera será otorgada a los pacientes.

Voluntario

Firma:

Lugar y fecha:

Aclaración

Nro de Documento:

Dirección:

Testigo

Doy fe de la participación voluntaria de: \_\_\_\_\_ (Apellido y Nombre del voluntario), la originalidad de su firma y de sus datos personales.

Firma del testigo: Aclaración: \_\_\_\_\_ Nro de Documento: En caso que el voluntario sea menor de 21 años, o que la persona se vea imposibilitada de dar su consentimiento por escrito, autorizo la participación voluntaria de: \_\_\_\_\_ (Apellido y Nombre del voluntario) a participar del presente estudio Firma del padre, tutor o responsable legal: \_\_\_\_\_ Aclaración: \_\_\_\_\_  
Nro de Documento: \_\_\_\_\_

## 10.3 ANEXO III

### 10.3.1 ESTADÍSTICA DESCRIPTIVA ÁREAS

tipo	Variable	n	Media	D.E.	Mín	Máx
ALTA	Densidad vegetación	4	61,25	16,52	45,00	80,00
ALTA	calles tierra Mz.	4	1,75	2,06	0,00	4,00
ALTA	perros totales	4	15,25	8,22	3,00	20,00
ALTA	Dist_cuerpo_agua	4	1641,00	640,13	970,00	2504,00
ALTA	[PropRKPos]	4	0,33	0,09	0,20	0,40
ALTA	propPCRpos	4	0,14	0,14	0,00	0,30
BAJA	Densidad vegetación	2	40,00	0,00	40,00	40,00
BAJA	calles tierra Mz.	2	2,00	2,83	0,00	4,00
BAJA	perros totales	2	6,50	0,71	6,00	7,00
BAJA	Dist_cuerpo_agua	2	469,50	621,55	30,00	909,00
BAJA	[PropRKPos]	2	0,08	0,11	0,00	0,16
BAJA	propPCRpos	2	0,21	0,30	0,00	0,42

### 10.3.2 ESTADÍSTICA DESCRIPTIVA VIVIENDAS

tipo	Variable	n	Media	D.E.	Mín	Máx
ALTA	tierra_pasto	27	163,26		71,28	50,00 332,00
ALTA	alisado	27	18,67		26,17	0,00 120,00
ALTA	Dist_agua	27	1593,00		619,68	917,00 2895,00
ALTA	tierra	27	25,48		77,23	0,00 400,00
ALTA	macetas	27	2,52		6,54	0,00 30,00
ALTA	Canes_viv	27	2,00		1,49	0,00 5,00
ALTA	gallinas	27	1,93		6,32	0,00 30,00
ALTA	veg_m2	27	29,19		48,13	0,00 177,60
ALTA	sp_arbol	27	3,48		2,15	0,00 7,00
ALTA	sp_arbusto	27	0,37		0,69	0,00 2,00
ALTA	sp_plantas	27	1,30		1,81	0,00 8,00
ALTA	arboles	27	4,04		7,44	0,00 40,00
ALTA	diam_tronco	27	37,78		35,88	0,00 150,00
ALTA	diam_copa	27	5,33		4,32	0,00 20,00
BAJA	tierra_pasto	11	262,55		199,05	0,00 455,00
BAJA	alisado	11	16,45		23,63	0,00 70,00
BAJA	Dist_agua	11	589,45		443,78	10,00 934,00
BAJA	tierra	11	0,00		0,00	0,00 0,00
BAJA	macetas	11	0,00		0,00	0,00 0,00
BAJA	Canes_viv	11	2,73		1,74	1,00 6,00
BAJA	gallinas	11	2,91		4,50	0,00 13,00
BAJA	veg_m2	11	64,38		117,62	0,00 400,00
BAJA	sp_arbol	11	3,00		2,57	0,00 9,00
BAJA	sp_arbusto	11	0,27		0,47	0,00 1,00
BAJA	sp_plantas	11	0,36		0,50	0,00 1,00
BAJA	arboles	11	3,00		5,85	0,00 20,00
BAJA	diam_tronco	11	13,64		12,86	0,00 40,00
BAJA	diam_copa	11	9,45		14,73	0,00 50,00