

Normalización de una nueva variante de reacción en cadena de la polimerasa-*hsp20* (PCR-*hsp20S*) útil para la detección de *Leishmania*

Standardization of a new variant of polimerase-*hsp20* (PCR-*hsp20S*) chain reaction which is useful for the detection of *Leishmania*

Ana M. Montalvo, Jorge Fraga, Lisandra Álvarez, Annia Alba, Cecilia Torres

Departamento de Parasitología. Centro de Investigación, Diagnóstico y Referencia (CIDR). Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí". La Habana, Cuba.

RESUMEN

Introducción: La leishmaniasis es una parasitosis producida por más de 20 especies de *Leishmania*. La enfermedad tiene una amplia distribución mundial en zonas tropicales y subtropicales y se presenta en tres formas clínicas fundamentales: la leishmaniasis cutánea, mucocutánea y visceral. Existen varios procedimientos de laboratorio para realizar el diagnóstico, pero continúa la investigación acerca de la detección molecular del parásito ante la falta de consenso sobre los protocolos en uso.

Objetivo: Desarrollar y normalizar una nueva reacción en cadena de la polimerasa (PCR), que amplifique un fragmento más corto del gen *hsp20*.

Métodos: Se utilizaron cepas de referencia del parásito para realizar la normalización de un nuevo ensayo de PCR que amplifica un fragmento corto del gen que codifica para la pequeña proteína de 20 Kda. Se evaluaron las cantidades y concentraciones óptimas del ensayo, la sensibilidad analítica para *L. braziliensis*, la especificidad analítica, así como la repetibilidad, y se evaluó su desempeño con cepas de referencia.

Resultados: Se determinaron las condiciones óptimas de amplificación de la nueva PCR-*hsp20S*, y se demostró que amplifica las principales especies de importancia médica. La sensibilidad analítica resultó en 100 fg para *L. braziliensis*.

Conclusiones: Las condiciones establecidas garantizan un buen desempeño de esta propuesta de PCR, y la sensibilidad analítica y especificidad obtenidas permiten evaluar su desempeño para el diagnóstico utilizando muestras clínicas. Las condiciones de este protocolo, sensibilidad y especificidad y otros parámetros establecidos permiten recomendar su evaluación para su posible uso diagnóstico.

Palabras clave: Leishmania; leishmaniasis; diagnóstico; PCR; normalización; optimización; *hsp20*.

ABSTRACT

Introduction: Leishmaniasis is a parasitosis produced by more than 20 species of *Leishmania*. The disease has a wide global distribution in tropical and subtropical zones, and occurs in three fundamental clinical forms: cutaneous, mucocutaneous and visceral leishmaniasis. There are several laboratory procedures which are used for the diagnosis, but research continues on the molecular detection of the parasite due to the lack of consensus on the protocols in use.

Objective: To develop and standardize a new chain reaction of polymerase (PCR) that extends a shorter fragment of *hsp20* gene.

Methods: Reference strains of the parasite were used to perform the standardization of a new PCR assay that extends a short fragment of the gene encoding the small 20 Kda protein. The optimal conditions and amounts of the assay, the analytical sensitivity for *L. braziliensis*, the analytical specificity as well as the repeatability were evaluated and their performance was evaluated with reference strains.

Results: The optimal amplification conditions of the new PCR-*hsp20S* were determined and it was demonstrated that the main species of medical importance of the parasite are detected using this protocol. The analytical sensitivity resulted in 100 fg for *L. braziliensis*.

Conclusions: The established conditions guarantee a good performance of this PCR proposal, and the analytical sensitivity and specification achieved suggest evaluating its diagnostic performance by using clinical samples. The conditions of this protocol, sensitivity and specification, and other established parameters allow recommending this evaluation for its possible diagnostic use.

Keywords: *Leishmania*; leishmaniasis; diagnostic; PCR; normalization; optimization, *hsp20*.

INTRODUCCIÓN

Más de 20 especies del género *Leishmania* pueden producir en el hombre la leishmaniasis, nombre con el que se identifica a un grupo de enfermedades de amplia distribución geográfica. Se presenta en 98 países y 5 territorios de zonas tropicales y subtropicales, donde cada año se notifican de 1,5 a 2 millones de casos nuevos.¹ La enfermedad se presenta en tres formas clásicas: la leishmaniasis cutánea, la leishmaniasis mucocutánea y la leishmaniasis visceral (forma sistémica), pero también se notifican las formas difusa y diseminada.² Otras presentaciones cutáneas atípicas comprenden manifestaciones vegetativas, verrucosas, costrosas y lupoides.^{3,4}

Recientemente se notificó la ocurrencia de nuevos casos importados, relacionados con la presencia de viajeros cubanos procedentes de áreas endémicas, pues por distintas razones las personas entran en contacto con los vectores transmisores sin la protección adecuada, con la consiguiente infección, y desarrollan posteriormente la enfermedad con distintas manifestaciones clínicas de tipo cutáneas.^{5,6} Esto se corresponde con lo que sucede en otras zonas geográficas, generado por las actividades de turismo, militares, o desplazamientos humanos en general.⁷⁻¹⁰

Para un diagnóstico adecuado de la leishmaniasis deben evaluarse tanto aspectos clínicos, epidemiológicos como de laboratorio. La amplificación molecular del ADN parasitario mediante la reacción en cadena de la polimerasa (en inglés PCR) es un método altamente sensible y específico que está disponible solo en los laboratorios especializados o en clínicas del viajero.¹¹ En el Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí" (IPK), Centro Nacional de Referencia para las enfermedades infecciosas, se utiliza un algoritmo diagnóstico de la leishmaniasis que conjuga la aplicación de métodos parasitológicos y moleculares, lo cual permite la detección e identificación de la especie infectante.¹²

Entre las dianas genéticas que más se han aplicado a la detección de *Leishmania*, se encuentran distintas regiones del gen ribosomal (ADNr) y el ADN del kinetoplasto (kADN).^{13,14} Otros protocolos moleculares detectan género, subgénero, complejos o especies¹⁵⁻¹⁸ El gen que codifica la pequeña proteína de choque térmico HSP20 (sHSP20), participa en los procesos que evitan la agregación de proteínas mal plegadas o inestables, aún en ausencia de estrés celular.¹⁹ En estudios previos se comprobó que un fragmento de sus secuencias está suficientemente conservado y es a la vez polimórfico, lo que permite discriminar las especies y subespecies de *Leishmania* de mayor importancia médica.²⁰ Esto permitió desarrollar una PCR que detecta el género *Leishmania* en muestras clínicas, con una sensibilidad adecuada (84,6 %) y una excelente especificidad (100 %).²¹

A pesar de esto, hasta el momento no existe un consenso global que guíe la aproximación diagnóstica, dada la diversidad de especies del parásito que circulan, los acercamientos experimentales, los propósitos o intereses de los laboratorios, y el bajo número de evaluaciones multicéntricas, con lo cual la investigación en esta área continúa siendo necesaria. En tal sentido, y tomando en cuenta resultados anteriores de la PCR-*hsp20*, nos propusimos desarrollar y normalizar una nueva PCR, que amplifique un fragmento más corto del gen *hsp20*, con vistas a lograr una mayor sensibilidad, que posibilite su futura aplicación diagnóstica en el laboratorio.

MÉTODOS

ADN de cepas de referencia de *Leishmania* spp. Se utilizó ADN de 37 cepas de referencia de *Leishmania*, representativas de las especies de mayor importancia médica procedentes del Nuevo y Viejo Mundo ([anexo](#)). Las alícuotas, a una concentración de 1 o 10 ng/μL, fueron donadas por el Laboratorio de Parasitología Molecular del Instituto de Medicina Tropical de Amberes, Bélgica. Estas se almacenaron a -20 °C en el banco de ADN del Laboratorio de Biología Molecular del Departamento de Parasitología, IPK, hasta su uso.

ADN de otros patógenos. Para evaluar la especificidad analítica de la PCR a desarrollar se utilizó el ADN de otros patógenos provenientes del Banco de ADN del Laboratorio de Biología Molecular del Departamento de Parasitología del IPK: *Trypanosoma* spp., *Plasmodium falciparum*, *Cryptosporidium* sp., *Entamoeba* sp., *Giardia lamblia*; además ADN de papiloma virus humano, adenovirus y de *herpes simplex* donados por el Departamento de Virología del IPK. Se obtuvo también ADN de otras especies patógenas al hombre como: *Treponema pallidum*, *Haemophilus influenzae*, *Staphylococcus pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Mycoplasma genitalium*, *Fonsecaea pedrosoi*, *Candida albicans*, *Candida tropicalis* y *Candida parapsilosis*, por el método de Chelex® al 20 % (Bio-Rad, Richmond, Estados Unidos) donados por el Departamento de Bacteriología-Micología, IPK.

Diseño de cebadores género específicos. Para el diseño de cebadores específicos al género *Leishmania* se utilizaron 39 secuencias nucleotídicas correspondientes a un fragmento del gen *hsp20* de *Leishmania* spp.¹³ Se adicionaron al análisis, otras seis secuencias del mismo gen almacenadas en el banco de genes (números de acceso: XM_842817; XM_003862626; XM_001466741; XM_003872264; AM712297; XM_001566535), a partir de la búsqueda de identidad de secuencia con el gen *hsp20* de *Leishmania* utilizando el programa n-BLAST (2000).²²

Todas las secuencias se alinearon utilizando el programa MEGA versión 5.0 (2011)²³ y se seleccionó como molde para el diseño de los cebadores una región de 100 a 120 pb, conservada entre las distintas especies de *Leishmania*. Se utilizó el programa Primer 3²⁴ en el diseño y selección de dos oligonucleótidos. A los cebadores seleccionados se les determinó la temperatura de hibridación (T_m , por sus siglas en inglés), el porcentaje G-C, la probabilidad de complementariedad en el extremo 3' y la potencialidad de formar horquillas y de autohibridar, utilizando el programa Oligonucleotide Properties Calculator.²⁵ Teniendo en cuenta estos criterios, se verificó la identidad de secuencia de los cebadores con genes de otras especies de patógenos que pudieran estar presentes en las muestras clínicas, y de ADN humano, utilizando el programa n-BLAST.²² Los cebadores se rediseñaron manualmente cuando fue necesario, con el fin de obtener los oligonucleótidos más adecuados para el ensayo de PCR.

Normalización de una nueva PCR basada en el gen *hsp20* de *Leishmania*. La normalización de la PCR incluyó el ensayo independiente de diferentes concentraciones en un volumen final de 25 μ L de reacción de los siguientes componentes: cebadores (0,2, 0,4, 0,6, 0,8 y 1 μ mol/L), enzima HotStarTaq®Plus (0,5, 1, 1,5, 2 y 2,5 U) y $MgCl_2$ (1,5, 2, 2,5, 3 y 3,5 mmol/L). La mezcla se completó en cada caso con 1X de tampón *Coral Load PCR*, 200 μ mol/L de desoxirribonucleósidos (dNTPs), 1 μ L de ADN molde a 0,1 ng y cantidad suficiente de agua libre de RNAsas para completar el volumen final de la reacción. Además, se evaluaron distintas temperaturas de hibridación dentro de un intervalo de temperaturas cercanas a la preestablecida por el análisis teórico de los cebadores: 65 °C; 64,6 °C; 64 °C; 63,1 °C; 61,9 °C; 61 °C; 60,4 °C y 60 °C.

Para todas las evaluaciones el programa de amplificación (T100TM Thermal Cycler (BioRad) fue: desnaturalización a 95 °C por 1 min, seguida de 35 ciclos de: desnaturalización a 94 °C 40 s, hibridación a la temperatura seleccionada como óptima por 1 min, extensión a 72 °C durante 1 min, con una extensión final a 72 °C por 8 min.

En todos los ensayos de normalización se utilizó como molde ADN de las cepas de referencia *L. braziliensis* (LH2887) y *L. donovani* (Hussen), ambas representativas de los subgéneros *L. (Viannia)* y *L. (Leishmania)*, respectivamente. Se incluyó un control negativo de la PCR que consistió en un vial que contenía la mezcla de reacción, al que se le adicionó agua libre de RNAsas en lugar de ADN molde.

Electroforesis en gel de agarosa. En cada caso, se verificó el producto de amplificación mediante electroforesis en gel de agarosa 2 % en 0,5X de tampón de corrida TBE (0,045 mol/L de tris-borato, 0,001 mol/L de ácido etiléndiaminotetracético [EDTA, por sus siglas en inglés]), que contenía bromuro de etidio (0,5 μ g/mL). La corrida electroforética se realizó a 135 V, por 30-35 min. El patrón de peso molecular utilizado fue Gene Ruler 100 bp Plus Ladder (MBI, Fermentas). Los resultados se visualizaron utilizando un sistema compacto analizador de imágenes U-Genius (Syngene, Reino Unido). Se consideraron como condiciones óptimas de la reacción de amplificación, las concentraciones de los componentes de la mezcla y la temperatura de hibridación a la que se obtuvo el producto de PCR específico con la mayor intensidad de la banda, sin la presencia de otras bandas de amplificación inespecíficas.

Sensibilidad analítica de la PCR desarrollada. Para determinar la mínima cantidad de ADN de *Leishmania* spp. que es capaz de detectar la PCR-*hsp20S* se utilizó ADN de la cepa de referencia *L. braziliensis* (LH2887), perteneciente al subgénero *L. (Viannia)*. Se realizaron diluciones seriadas (1/10) del ADN en tampón TE desde 100 pg hasta 0,01 pg, y se evaluaron en la PCR normalizada. Como control negativo se incluyó un vial que contenía la mezcla de reacción y al que se le adicionó agua libre de RNAsas en lugar de ADN molde. Los productos de amplificación obtenidos con cada dilución de ADN realizada se observaron en una corrida electroforética en gel de agarosa 2 %.

Especificidad analítica de la PCR desarrollada. Para estudiar la especificidad analítica de la PCR, se utilizaron como molde 1 o 10 ng de ADN de otros patógenos. Se realizó la reacción de amplificación en las condiciones de la PCR previamente normalizadas. Se utilizó como control positivo 1 µL de ADN a 0,1 ng de la cepa de referencia de *L. donovani* (Hussen) y como control negativo se incluyó un vial que contenía la mezcla de reacción antes descrita. Los productos de amplificación se visualizaron en una corrida electroforética en gel de agarosa 2 %.

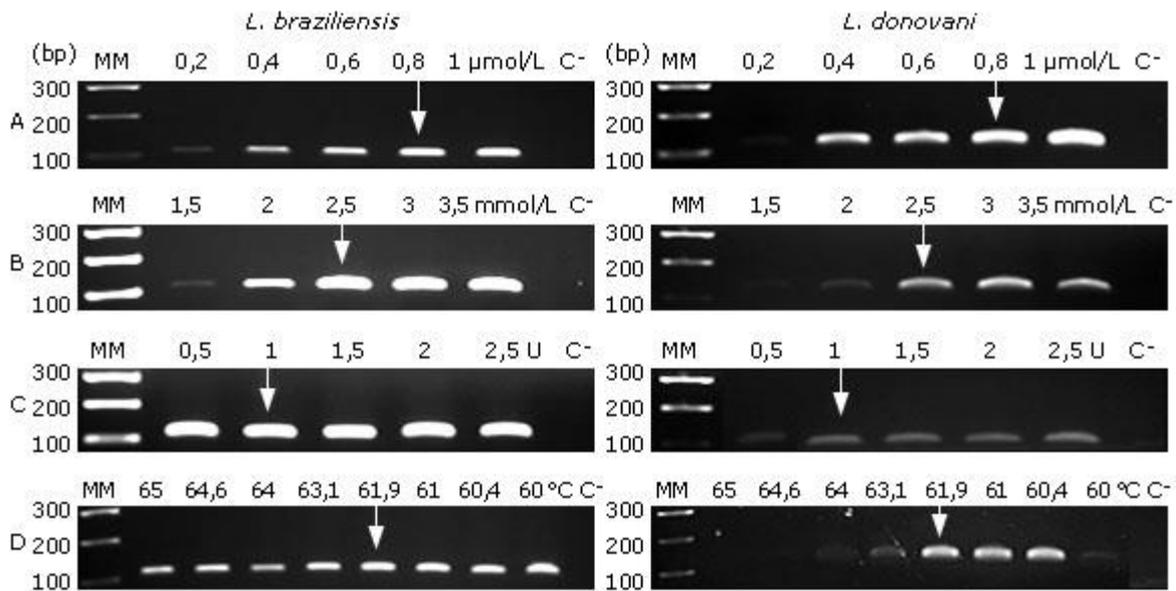
Repetibilidad de la PCR desarrollada. Para evaluar la variabilidad intrínseca o repetibilidad de la reacción se realizaron en dos días diferentes los ensayos de sensibilidad analítica y se evaluó también la amplificación del ADN de *L. lainsoni* (CUM78) y *L. guyanensis* (LH2190), pertenecientes al subgénero *L. (Viannia)*, y *L. donovani* (3S) subgénero *L. (Leishmania)*.

Evaluación de las cepas de referencia mediante la PCR desarrollada. Se evaluó la PCR desarrollada en las condiciones previamente normalizadas utilizando como molde 1 µL de ADN a 1 ng obtenido de cada una de las 37 cepas de *Leishmania* spp. representativas de ambos subgéneros, para determinar en qué especies sería posible obtener un diagnóstico positivo de leishmaniasis a partir de la posible amplificación del fragmento deseado.

RESULTADOS

Diseño de cebadores género específicos. Tras el alineamiento de las secuencias nucleotídicas de un fragmento del gen que codifica la proteína HSP20 en *Leishmania* spp. se seleccionó un juego de cebadores específicos para este género para amplificar un fragmento de 107 pb. Las secuencias de estos cebadores fueron: 5´-GCC RGA RGT GAR RAA GGA GGA C-3´ cebador positivo (*hsp20S* F) y 5´-GYA GCT GGYKYT CGT CCT GC-3´ cebador negativo (*hsp20S* R), donde R= A o G; Y= C o T y K= G o T. En ambos casos, el contenido G-C resultó en más de 50 %. Las respectivas Tms obtenidas fueron para el cebador positivo entre 62,1 °C a 69,5 °C y para el cebador negativo entre 60,5 °C a 68,7 °C. Asimismo, la probabilidad de complementariedad en el extremo 3´, la potencialidad de formar horquillas y de autohibridación de los cebadores resultó nula, características que sugieren su utilización en una PCR.

Normalización de la PCR basada en el gen *hsp20* de *Leishmania*. Los resultados de la normalización de la nueva PCR desarrollada (en lo adelante PCR-*hsp20S*), se muestran en la Fig. 1. Tanto para *L. braziliensis* como para *L. donovani* la concentración óptima de cebadores resultó de 0,8 µmol/L; mientras que la de MgCl₂ fue 2,5 mmol/L. La banda de amplificación que se observó con mayor nitidez a la menor concentración para la enzima HotStarTaq® Plus fue 1 U y la temperatura de hibridación óptima resultó 61,9 °C, por lo que se estableció en 62 °C.



A: concentración de cebadores; B: concentración de MgCl₂; C: cantidad de la enzima polimerizadora HotStarTaq® Plus; D: temperaturas de hibridación evaluadas. MM marcador de peso molecular: Gene Ruler 100 bp Plus Ladder (MBI, Fermentas); C⁻: control negativo compuesto por la mezcla de reacción sin ADN molde.

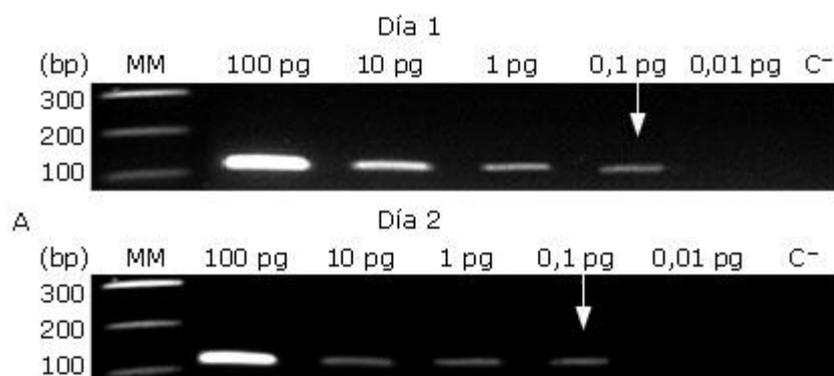
En el encabezado de cada carril se muestran las concentraciones y cantidades evaluadas (A-C) y las distintas temperaturas de hibridación ensayadas (D). Las flechas indican las condiciones seleccionadas como óptimas.

Fig. 1. Geles de agarosa a 2 % en los que se muestran los productos de amplificación obtenidos mediante PCR-*hsp20S* durante la normalización con la cepa *L. braziliensis* y *L. donovani*.

Parámetros analíticos de la PCR-*hsp20S*. Una vez normalizada la PCR, se determinó la sensibilidad analítica (menor cantidad de ADN a la cual aun se observó una banda de amplificación específica). Para la cepa de *L. braziliensis* utilizada, la sensibilidad de la PCR-*hsp20S* al repetirse en dos días diferentes, fue de 0,1 pg (100 fg) de ADN genómico del parásito (Fig. 2).

El ensayo de la PCR-*hsp20S* utilizando ADN de un amplio grupo de especies del género *Trypanosoma*, otros protozoos, así como de hongos, bacterias y virus vinculados a enfermedades cutáneas o mucocutáneas, demostró que no hubo amplificación con ninguno de los organismos evaluados (Fig. 3).

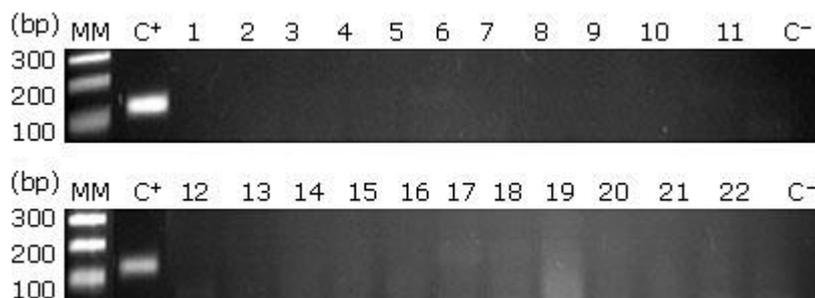
Evaluación de la PCR-*hsp20S* con cepas de referencia. La evaluación de la PCR-*hsp20S* con un grupo de 37 cepas de referencia representativas de ambos subgéneros de *Leishmania* demostró la amplificación del ADN de todas las especies utilizadas en el estudio (Fig. 4).



A: amplicones de 107 pb obtenidos al ensayar distintas cantidades de ADN de *L. braziliensis* en dos días diferentes. MM: marcador molecular; C-: control negativo compuesto por la mezcla de reacción sin ADN molde.

En el encabezado de cada carril aparecen las cantidades de ADN en picogramos (pg) evaluadas en cada ensayo.

Fig. 2. Geles de agarosa a 2 % en el que se muestran los productos de amplificación obtenidos en dos días diferentes mediante PCR-*hsp20S* durante el ensayo de sensibilidad analítica para la especie *L. braziliensis* (LH2887).



Carriles 1 al 22: Resultados de la amplificación con los distintos ADN obtenidos de los diferentes microorganismos utilizados en el experimento de especificidad. MM: marcador molecular; C+: control positivo de la reacción; C-: control negativo compuesto por la mezcla de reacción sin ADN molde.

Fig. 3. Geles de agarosa al 2 % en los que se muestran los productos de amplificación obtenidos en el experimento de especificidad analítica.



MM: marcador de peso molecular: Gene Ruler 100 bp Plus Ladder; C⁻: control negativo. Carriles: per: *L. peruviana*; bra: *L. braziliensis*; guy: *L. guyanensis*; lai: *L. lainsoni*; pan: *L. panamensis*; ama: *L. amazonensis*; mex: *L. mexicana*; cha: *L. chagasi*; don: *L. donovani*; maj: *L. major*; tro: *L. tropica*; aet: *L. aethiopica*; inf: *L. infantum*.

Fig. 4. Gel de agarosa a 2 % en el que se muestran los productos de amplificación de 107 pb obtenidos mediante PCR-*hsp20S* al evaluar ADN de cepas de 13 especies de *Leishmania*, representativas de ambos subgéneros.

DISCUSIÓN

Para el diagnóstico de laboratorio de la leishmaniasis, los métodos basados en la amplificación del ADN mediante PCR han mostrado avances en cuanto a la especificidad, sensibilidad, versatilidad y rapidez; además de su posible aplicación a una gran variedad de muestras clínicas que incluyen: raspado de lesión, exudado de mucosas, leucocitos en sangre periférica, tejido impregnado en papel de filtro y extendidos teñidos previamente con Giemsa, entre otros.^{18,26-28}

En este escenario, los intentos por disponer de herramientas diagnósticas cada vez más sensibles y específicas, que sean aplicables a una gran variedad de muestras, son de vital importancia en los laboratorios de referencia o clínicas del viajero donde se reciben pacientes de diversas áreas endémicas en las que circulan diferentes especies. Estas son responsables de gran variedad de presentaciones de la leishmaniasis, las cuales deben distinguirse certeramente de otras afecciones, junto a otros factores del hospedero.²⁹⁻³¹

Actualmente, se notifican con más frecuencia ensayos dirigidos a la detección o identificación de especies, lo cual es relevante para la terapéutica y el seguimiento del paciente.^{15,28} Sin embargo, la detección a nivel de género facilita un paso importante para ofrecer una respuesta inmediata al médico de asistencia y pudiera, en paralelo, favorecer en otros contextos el análisis de los posibles reservorios o vectores involucrados como parte de estudios epidemiológicos.³²⁻³⁴

Para el desarrollo de la PCR-*hsp20S* se seleccionó un fragmento más corto del gen *hsp20* (107 pb), lo cual facilita la amplificación, incidiendo de manera positiva en la sensibilidad diagnóstica. En paralelo, se tomaron en cuenta otras consideraciones como el contenido de G-C, la longitud de los cebadores y que la T_m de ambos no difiera en más de 5 °C. Por su parte, la concentración de cebadores que se estableció para la reacción (0,8 μmol/L) coincide con la recomendada anteriormente, en tanto difirieron la cantidad de enzima polimerisadora y la concentración de MgCl₂;²¹ todo lo cual puede variar en cada protocolo^{15,35,36} al ajustar cada reactivo en los rangos establecidos, a la obtención de la banda de amplificación más nítida.

La sensibilidad analítica alcanzada para *L. braziliensis* permite detectar el ADN de un solo parásito. Más adelante sería recomendable realizar el estudio de sensibilidad analítica con una representación del subgénero *L. (Leishmania)*, pues se han informado

divergencias en la sensibilidad entre diferentes especies con anterioridad para otros PCR, que en general se han atribuido a la calidad del ADN empleado, su degradación o a la presencia de elementos inhibitorios.²¹ Teniendo esto en cuenta, cabría esperar que la amplificación para fines diagnósticos pudiera favorecerse con el uso de muestras frescas de manera general.³⁷

A pesar de la cercanía filogenética de *Leishmania* con algunos trypanosomátidos evaluados en el ensayo de especificidad analítica, no se observó amplificación en ninguno de los casos. Esto difiere de estudios previos en los que se notificó la amplificación con *T. cruzi*³⁸ o en los que se obtuvieron amplificaciones inespecíficas²¹ y, por lo tanto, refleja la alta especificidad analítica alcanzada en el nuevo ensayo propuesto. Igualmente, importante es el hecho de que la PCR-*hsp20S* normalizada amplificó al utilizar como molde ADN de 13 especies de interés médico, representativas de ambos subgéneros y de todas las áreas geográficas, lo que sustenta su utilidad práctica como método diagnóstico. Sería aconsejable, además realizar la evaluación de la PCR-*hsp20S* con *L. naiffi*, especie de importancia médica no evaluada en este estudio y que en algunas zonas se ha encontrado relacionada a casos humanos o en vectores.^{39,40}

En conclusión, consideramos que esta investigación para normalizar un ensayo de detección de *Leishmania* pudiera ser de utilidad a otros investigadores. Las condiciones establecidas permiten un buen desempeño de esta propuesta de PCR-*hsp20S*, y la sensibilidad analítica y especificidad alcanzadas ameritan evaluar su desempeño diagnóstico utilizando muestras clínicas. Esto permitiría conocer el comportamiento de la amplificación ante otras especies del parásito, que pudieran presentarse en muestras de diversa procedencia geográfica y de otras formas clínicas de la enfermedad.

Conflicto de intereses

No existe conflicto de intereses.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Alvar J, Vélez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. PLoS One. 2012;7:e35671.
2. Goto H, Lauletta-Lindoso JA. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. Infect Dis Clin North Am. 2012;26:293-307.
3. Torres-Guerrero E, Quintanilla-Cedillo MR, Ruiz-Esmenjaud J, Arenas R. Leishmaniasis: a review. F1000Research. 2017;6:750. doi: 10.12688/f1000research.11120.1.
4. Guimarães LH, Machado PRL, Lago EL, Morgan DJ, Schriefer A, Bacellar O, et al. Atypical manifestations of tegumentary leishmaniasis in a transmission area of *Leishmania braziliensis* in the state of Bahia, Brazil. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2009;103:712-5.
5. Montalvo AM, Fraga J, Blanco O, González D, Monzote L, Soong L, et al. Imported leishmaniasis cases in Cuba (2006-2016): what have we learned? Trop Dis Travel Med and Vaccines. 2018;4:2-8.

6. Eiras DP, Kirkman LA, Murray HW. Cutaneous leishmaniasis: Current treatment practices in the USA for returning travelers. *Curr Treat Options Infect Dis*. 2015;7:52-62.
7. Showler AJ, Boggild AK. Cutaneous leishmaniasis in travellers: a focus on epidemiology and treatment in 2015. *Curr Infect Dis Rep*. 2015;17:37.
8. Cargnelutti DE, Borremans CG, Tonelli RL, Carrizo LC, Salomón MC. Diagnosis of *Leishmania* infection in a nonendemic area of South America. *J Microbiol Immunol Infect*. 2016;49:809-12.
9. Van der Snoek EM, Lammers AM, Kortbeek LM, Roelfsema JH, Bart A, Jaspers CA. Spontaneous cure of American cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania naiffi* in two Dutch infantry soldiers. *Clin Exp Dermatol*. 2009; 34:e889-e891.
10. Reithinger R, Dujardin JC. Molecular diagnosis of leishmaniasis: current status and future applications. *J Clin Microbiol*. 2007;45:21-5.
11. Montalvo AM, Fraga J, Monzote L, García M, Fonseca L. Diagnóstico de la leishmaniasis: de la observación microscópica del parásito a la detección del ADN. *Rev Cubana Med Trop*. 2012;64:108-31.
12. Deborggraeve S, Boelaert M, Rijal S, De Doncker S, Dujardin JC, Herdewijn P, et al. Diagnostic accuracy of a new *Leishmania* PCR for clinical visceral leishmaniasis in Nepal and its role in diagnosis of disease. *Trop Med Int Health*. 2008;13:1378-83.
13. Rodgers MR, Popper SJ, Wirth DF. Amplification of kinetoplast DNA as a tool in the detection and diagnosis of *Leishmania*. *Exp Parasitol*. 1990;71:267-75.
14. Neitzke-Abreu HC, Venazzi MS, Bernal MVZ, Reinhold-Castro KR, Vagetti F, et al. Detection of DNA from *Leishmania (Viannia)*: Accuracy of Polymerase Chain Reaction for the Diagnosis of Cutaneous Leishmaniasis. *PLoS ONE*. 2013;8(7):e62473.
15. De Paiva-Cavalcanti M, Silva de Moraes RC, Pessoa e Silva R, Mendonça Trajano Silva LA, da Cunha Gonçalves-de-Albuquerque S, et al. Leishmaniasis diagnosis: an update on the use of immunological and molecular tools. *Cell & Bioscience*. 2015;5:2-10.
16. Akhoundi M, Downing T, Votýpka J, Kuhls K, Lukeš J, Cannet A, et al. *Leishmania* infections: Molecular targets and diagnosis. *Mol Aspects Med*. 2017;57:1-29.
17. Cella Conter C, Coeto Neitzke-Abreu H, Bocchi Pedroso R, Campana Lonardoni MV, Gomes Verzignassi Silveira T, Alessi Aristides SM. Detection of *Leishmania (Viannia)* DNA in leucocytes from the blood of patients with cutaneous leishmaniasis. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2015;48:626-8.
18. Requena JM, Montalvo AM, Fraga J. Molecular Chaperones of *Leishmania*: Central Players in Many Stress-Related and -Unrelated Physiological Processes. *Bio Med Research International*. 2015;2015:ID 301326.
19. Fraga J, Montalvo AM, Van der Auwera G, Maes I, Dujardin JC, Requena JM. Evolution and species discrimination according to the *Leishmania* heat-shock protein 20 gene. *Inf Gen Evol*. 2013;18:229-37.
20. Montalvo AM, Fraga J, Rodríguez O, Blanco O, Llanos-Cuentas A, García AL, et al. Detección de *Leishmania* spp. en base al gen que codifica la proteína HSP20. *Rev Peru Med Exp Salud Pública*. 2014;31:635-43.

21. Zhang J, Schwartz S, Wagner L, Miller W. A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *J Comput Biol.* 2000;7:203-14.
22. Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution.* 2011;28:2731-9.
23. Rozen S, Skaletsky HJ. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. in: Krawetz S, Misener S (eds.). *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology.* New Jersey: Humana Press: Totowa; 2000.
24. Kibbe WA. OligoCalc: an online oligonucleotide properties calculator. *Nucleic Acids Res.* 2007;35:43-6.
25. Venazzi EAS, Roberto ACBS, Barbosa-Tessmann IP, Zanzarini PD, Lonardoni MVC. Polymerase chain reaction with lesion scrapping for the dianosis of human American tegumentary leishmaniasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2006;101:427-30.
26. Figueroa RA, Lozano LE, Romero IC, Cardona MT, Prager M, Pacheco R, et al. Detection of *Leishmania* in Unaffected Mucosal Tissues of Patients with Cutaneous Leishmaniasis Caused by *Leishmania (Viannia)* Species. *J Infect Dis.* 2009;200:638-46.
27. Cruz-Barrera ML, Ovalle-Bracho C, Ortegon-Vergara V, Pérez-Franco JE, Echeverry MC. Improving *Leishmania* species identification in different types of samples from cutaneous lesions. *J Clin Microbiol.* 2015;53:1339-41.
28. Bart A, van Thiel PP, de Vries HJ, Hodiamont CJ, Van Gool T. Imported leishmaniasis in the Netherlands from 2005 to 2012: epidemiology, diagnostic techniques and sequence-based species typing from 195 patients. *Euro Surveill.* 2013;18:20544.
29. Pérez-Ayala A, Norman F, Pérez-Molina JA, Herrero JM, Monge B, López-Vélez R. Imported Leishmaniasis: A heterogeneous group of diseases. *Journal of Travel Medicine.* 2009;16:395-401.
30. Montalvo AM, Blanco O, Capó V, Fraga J, Monzote L. ¿Leishmaniasis o psoriasis? Diagnóstico diferencial. *Rev Cubana Med Trop.* 2009;66:305-11.
31. Riboldi E, Carvalho F, Torres Romão PR, Bones Barcellos R, Lima Bello G, Rocha Ramos R, et al. Molecular Method Confirms Canine *Leishmania* Infection Detected by Serological Methods in Non-Endemic Area of Brazil. *Korean J Parasitol.* 2018;56:11-9.
32. Ferro C, López M, Fuya P, Lugo Cordovez JM, González C. Spatial Distribution of Sand Fly Vectors and Eco-Epidemiology of Cutaneous Leishmaniasis Transmission in Colombia. *PLoS One.* 2015;10:e0139391.
33. Dutari LC, Loaiza JR. American Cutaneous Leishmaniasis in Panama: a historical review of entomological studies on anthropophilic *Lutzomyia* sand fly species. *Parasites and Vectors.* 2014;7:218-28.
34. Gualda KP, Marcussi IM, Neitzke-Abreu HC, Aristides SMA. New primers for detection of *Leishmania infantum* using polymerase chain reaction. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2015;57:377-83.

35. Fraga J, Veland N, Montalvo AM, Praet N, Boggild AK, Valencia BM, et al. Accurate and rapid species typing from cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis lesions of the New World. *Diagn Microbiol Infect Di.* 2012;74:142-50.
36. García L, Kindt A, Bermudez H, Llanos-Cuentas A. Culture independent species typing of Neotropical *Leishmania* for clinical validation of a PCR-based assay targeting heat shock protein 70 genes. *J Clin Microbiol.* 2004;42:2294-7.
37. Kato H, Calvopiña M, Criollo H, Hashiguchi Y. First human cases of *Leishmania* (*Viannia*) *naiffi* infection in Ecuador and identification of its suspected vector species. *Acta Tropica.* 2013;128:710-3.
38. Azpurua J, de la Cruz D, Valderama A, Windsor D. *Lutzomyia* Sand Fly Diversity and Rates of Infection by *Wolbachia* and an Exotic *Leishmania* Species on Barro Colorado Island, Panama. *PLoS Negl Trop Dis.* 2010;4:e627.
39. Viana de Andrade R, Massone C, Nogueira- Barbosa de Lucena N, Chusciak -Talhari A, Talhari S, de Oliveira-Guerra JA. The use of polymerase chain reaction to confirm diagnosis in skin biopsies consistent with American tegumentary leishmaniasis at histopathology: a study of 90 cases. *An Bras Dermatol.* 2011;86:892-6.
40. Satow MM, Yamashiro-Kanashiro EH, Rocha MC, Oyafuso LK. Applicability of KDNA-PCR for routine diagnosis of American Tegumentary Leishmaniasis in a tertiary reference hospital. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2013; 55:393-9.

Recibido: 6 de agosto de 2018.

Aprobado: 12 de septiembre de 2018.

Ana M. Montalvo. Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí". Autopista Novia del Mediodía km 6½. La Lisa. La Habana, Cuba.
Correo electrónico: amontalvo@ipk.sld.cu

Anexo. Cepas de *Leishmania* utilizadas en el estudio

Código de referencia	Código de ADN	Especie	Procedencia
MHOM/PE/90/HB44	HB44	<i>L. peruviana</i>	Perú
MHOM/PE/90/LCA08	LCA08	<i>L. peruviana</i>	Perú
MHOM/PE/90/LH925	LH925	<i>L. peruviana</i>	Perú
MHOM/PE/03/LH2864	LH2864	<i>L. peruviana</i>	Perú
MHOM/PE/90/LCA09	LCA09	<i>L. peruviana</i>	Perú
ND	LH2439	<i>L. peruviana</i>	Perú
MHOM/PE/02/LH2162	LH2162	<i>L. braziliensis</i>	Perú
MHOM/PE/03/LH2538	LH2538	<i>L. braziliensis</i>	Perú
MHOM/BR/06/ICA	ICA	<i>L. braziliensis</i>	Brasil
MHOM/PE/91/LC2176	LC2176	<i>L. braziliensis</i>	Perú
MHOM/PE/03/LH2887	LH2887	<i>L. braziliensis</i>	Perú
ND	ECBra4	<i>L. braziliensis</i>	Brasil
MHOM/PE/02/LH2372	LH2372	<i>L. guyanensis</i>	Perú
MHOM/BR/07/029-ZAV	029-ZAV	<i>L. guyanensis</i>	Brasil
ND	LH2190	<i>L. guyanensis</i>	Perú
MHOM/PE/03/LH2517	LH2517	<i>L. lainsoni</i>	Perú
MHOM/BO/95/CUM71	CUM71	<i>L. lainsoni</i>	Bolivia
MHOM/BO/94/CUM78	CUM78	<i>L. lainsoni</i>	Bolivia
ND	UA140	<i>L. panamensis</i>	Colombia
MHOM/BR/73/M2269	M2269	<i>L. amazonensis</i>	Brasil
MHOM/BR/72/LTB0016	LTB0016	<i>L. amazonensis</i>	Brasil
MHOM/FR/97/LSL29	LSL29	<i>L. infantum</i>	Francia
MHOM/ES/86/BCN16	BCN16	<i>L. infantum</i>	España
MHOM/PT/00/IMT260	IMT260	<i>L. infantum</i>	Portugal
MHOM/FR/96/LEM3249	LEM3249	<i>L. infantum</i>	Francia
MHOM/ES/92/LLM373	LLM373	<i>L. infantum</i>	España
MHOM/IL/67/LRC-L137	L137	<i>L. major</i>	Israel
MHOM/BF/96/LIPA538	LIPA538	<i>L. major</i>	Burkina Faso
MHOM/TN/97/LPN162	LPN162	<i>L. major</i>	Túnez
ND	3S	<i>L. donovani</i>	Kenia
MHOM/ET/72/GEBRE1	GEBRE1	<i>L. donovani</i>	Etiopía
MHOM/ET/00/Hussen	Hussen	<i>L. donovani</i>	Etiopía
MHOM/AZ/58/NLB305	NLB305	<i>L. tropica</i>	Kenia
MHOM/ET/72/L100	L100	<i>L. aethiopica</i>	Etiopía
ND	LVV-129	<i>L. chagasi</i>	Brasil
MCAN/BR/05/SPACK	SPACK	<i>L. chagasi</i>	Brasil
MNYC/BZ/62/M1339	M1339	<i>L. mexicana</i>	Belice

ND: código de referencia no disponible.