DEMOSTRACIÓN PARASITOLÓGICA DE INFECCIÓN PERSISTENTE POR *LEISHMANIA* EN ÁREAS ENDÉMICAS DE COLOMBIA

MARIANA DEL SOCORRO ROSALES CHILAMA

UNIVERSIDAD DEL VALLE
FACULTAD DE SALUD
ESCUELA DE CIENCIAS BÁSICAS
PROGRAMA DE MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
SANTIAGO DE CALI
2015

DEMOSTRACIÓN PARASITOLÓGICA DE INFECCIÓN PERSISTENTE POR *LEISHMANIA* EN ÁREAS ENDÉMICAS DE COLOMBIA

MARIANA DEL SOCORRO ROSALES CHILAMA

Trabajo de Grado presentado como requisito parcial para optar por el Titulo de Magister en Ciencias Biomédicas.

Directora: MARÍA ADELAIDA GÓMEZ, PhD.
Codirector: NANCY GORE SARAVIA, PhD.

UNIVERSIDAD DEL VALLE
FACULTAD DE SALUD
ESCUELA DE CIENCIAS BÁSICAS
PROGRAMA DE MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
SANTIAGO DE CALI
2015

A mis padres, por su guía y apoyo para que lograra cada uno de mis sueños, por estar allí cuando sentía desfallecer y por enseñarme que cada esfuerzo siempre traerá su recompensa.
Todo mi amor, respeto y gratitud para ellos.

TABLA DE CONTENIDO

Página

LISTA DE FIGURAS…… i
LISTA DE TABLAS…… ii
LISTA DE ANEXOS…… iii
ABREVIATURAS…… iv

RESUMEN…… 1

1. INTRODUCCIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA…… 3

2. PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN…… 5

3. OBJETIVOS…… 6

3.1 Objetivo general…… 6
3.2 Objetivos específicos…… 6

4. MARCO TEORICO…… 7

4.1 Biología del parásito…… 7
4.1.1 Ciclo de Vida…… 8
4.2 Formas clínicas de la leishmaniasis…… 9
4.2.1 Leishmaniasis cutánea (LC)…… 9
4.2.2 Leishmaniasis mucocutánea (LMC)…… 10
4.2.3 Leishmaniasis visceral (LV)…… 11
4.3 Ciclos de transmisión…… 12
4.3.1 Transmisión zoonótica…… 12
4.3.2 Transmisión antroponótica…… 12
4.4 Epidemiologia…… 13
4.4.1 Las leishmaniasis en el mundo…… 13
4.4.2 Las leishmaniasis en Colombia…… 14
4.5 Infección asintomática (IA)…… 15
4.5.1 La infección asintomática en las leishmaniasis…… 15
4.5.2 La infección asintomática en *Leishmania* (*Viannia*)…… 17
4.5.3 Factores de riesgo asociados a IA…… 18

4.5.3.1 Los individuos con IA como un potencial reservorio para la transmisión……. 19
4.6 Herramientas moleculares utilizadas para la detección y el análisis genotípico de *Leishmania*…… 20
4.6.1 ADN del minicírculo del cinetoplasto (kADN) de *Leishmania*……... 20
4.6.2 7SL ARN de *Leishmania*…… 21
4.6.3 Tipificación molecular de *Leishmania,* isoenzimas y microsatélites…… 22

5. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL…….. 24

5.1 Diseño del estudio……….. 24

6. MATERIALES Y METODOS……. 26

6.1 Población de estudio…… 26
6.2 Consideraciones éticas…….. 28
6.2.1 Criterios de inclusión……... 28
6.2.2 Criterios de exclusión……. 28
6.3 Obtención y procesamiento de muestras…….. 28
6.3.1 Obtención de monocitos de sangre periférica……. 29
6.3.2 Aspirado de cicatriz……. 29
6.3.3 Obtención de muestras por hisopado de mucosas…… 29
6.3.4 Extracción de ácidos nucleicos……. 29
6.4 Cepas de *Leishmania* y secuencias de kADN…….. 30
6.5 PCR/*Southern blot*……….. 34
6.6 PCR cuantitativa en tiempo real (qRT PCR)…….. 34
6.6.1 Sensibilidad para qRT PCR del transcrito de 7SL ARN y del gen normalizador TBP…… 35
6.7. Captura y procesamiento de flebotomíneos. …….. 36
6.7.1 Captura y taxonomía de flebotomíneos…… 37
6.7.2 Extracción de ADN de los flebotomíneos……. 37
6.7.3 Análisis de ingestas sanguíneas e infección natural con *Leishmania*…. 37
6.8 Genotipificación del kADN……… 38
6.8.1 PCR anidada del kADN de *Leishmania*…… 38
6.8.2 Sensibilidad y especificidad de la PCR anidada del kADN de *Leishmania*. …….. 40
6.8.3 Reproducibilidad experimental de la PCR anidada del kADN de *Leishmania*. …….. 40
6.9. Análisis de secuencias. ……. 40
6.10 Tipificación por microsatélites multilocus (MLMT)……... 40
6.11 Análisis estadístico……… 41

7. RESULTADOS……... 43

7.1. Descripción general de las comunidades y los participantes del estudio……… 43

7.2 Demostración parasitológica de infección persistente en individuos con evidencia inmunológica de exposición a *Leishmania*……... 45

7.3 Persistencia de *Leishmania* y cuantificación de carga parasitaria en individuos con infección persistente.…… 48

7.4 Genotipificación del kADN, una herramienta para explorar la variabilidad o diversidad genética de *Leishmania* en la infección subclínica……… 51

7.4.1 Diseño, sensibilidad y especificidad del método. …… 51

7.4.2 Implementación de la secuenciación del kADN para el análisis de variabilidad o diversidad genética de cepas clínicas de *Leishmania (Viannia)*…... 55

7.4.3 Genotipificación del kADN en individuos con infección subclínica y en flebotomíneos colectados de los sitios de estudio. …… 57

7.5 Resumen de los resultados encontrados en las comunidades de estudio…….. 59

8. DISCUSIÓN…….. 61

9. CONCLUSIONES……. 67

10. BIBLIOGRAFIA…… 68

11. ANEXOS…….. 79

LISTA DE FIGURAS

Pagina

Figura 1. Ciclo de vida de *Leishmania*…….. 8

Figura 2. Espectro de manifestaciones clínicas de LC……. 10

Figura 3. Presentación clínica de la leishmaniasis mucocutánea…… 11

Figura 4. Leishmaniasis visceral…… 11

Figura 5. Estructura del 7SL ARN en Tripanosomátidos……... 22

Figura 6. Estrategia experimental del trabajo de investigación…… 25

Figura 7. Mapa del departamento de Risaralda, Colombia; se resalta la ubicación del municipio de Pueblo Rico…… 26

Figura 8. Mapa del departamento de Nariño, Colombia; se resalta la ubicación del municipio de Tumaco……. 27

Figura 9. Metodología seguida para el procesamiento de los flebotomíneos colectados en las comunidades de Pueblo Rico y Tumaco…….. 36

Figura 10. Ubicación de los cebadores LVp1 y LVp1/LVp5 sobre las regiones conservadas del kADN de *Leishmania*…….. 39

Figura 11. Distribución de los participantes de estudio por grupos clínicos……... 44

Figura 12. *Southern blot* del ADN de muestras de hisopados de mucosas y monocitos de seis individuos con antecedentes de leishmaniasis cutánea del municipio de Pueblo Rico (Risaralda)……. 46

Figura 13. Distribución de muestras kADN positivas por tipo de muestra…….. 48

Figura 14. Viabilidad de *Leishmania* y carga parasitaria en muestras kADN positivas de participantes sin leishmaniasis cutánea activa…….. 50

Figura 15. Polimorfismos en las regiones inter-bloque del kADN de *Leishmania*. 52

Figura 16. Sensibilidad de la PCR anidada para el kADN de *Leishmania*……. 53

Figura 17. Especificidad de la PCR del kADN de *Leishmania* en PBMCs de donantes sanos…… 54

Figura 18. Re-secuenciación del kADN en cepas clínicas de *L.* (*Viannia*)…….... 55

Figura 19. Análisis de la diversidad genética utilizando genotipificación de kADN, permite la agrupación de las cepas aisladas dentro de focos de transmisión durante los brotes de infección…… 56

Figura 20. PCR anidada del kADN con los cebadores internos, en muestras de 12 participantes del estudio (10 de Pueblo Rico y dos de Tumaco)……. 57

Figura 21. Análisis de la diversidad genética de *Leishmania* en individuos con infección subclínica y flebotomíneos con infección por *Leishmania*……. 58

Figura 22. Confirmación, carga, viabilidad y diversidad de *Leishmania* en los participantes del estudio…….. 60

LISTA DE TABLAS

Pagina

Tabla 1. Número de casos de leishmaniasis reportados en Colombia durante los años 2005 a 2013…….. 15

Tabla 2. Aislados clínicos de pacientes con leishmaniasis cutánea y cepas de referencia, obtenidas del Biobanco-CIDEIM……. 30

Tabla 3. Secuencias del minicírculo de ADN de *Leishmania*, obtenidas de GenBank…… 33

Tabla 4. Microsatélites amplificados para la tipificación por MLMT…….. 41

Tabla 5. Características demográficas y prueba de Montenegro en los participantes del estudio…….. 43

Tabla 6. Detección de kADN de *Leishmania* en los diferentes grupos clínicos y sitios de estudio……. 47

LISTA DE ANEXOS

Pagina

ANEXO 1. Participación en el II Congreso Colombiano de Biología Computacional y Bioinformática. Manizales, Septiempre-2013. Modalidad: Presentación oral…….. 79

ANEXO 2. Participación en ASTMH 62nd Annual Meeting. Washington, DC. USA. Noviembre 13-17, 2013. Modalidad: Poster……. 81

ANEXO 3. Manuscrito "First report of *Warileya rotundipennis* (Psychodidae: Phlebotominae) naturally infected with *Leishmania* (*Viannia*) in a focus of cutaneous leishmaniasis in Colombia"……. 84

ANEXO 4. Manuscrito "Parasitological confirmation and analysis of *Leishmania* diversity in asymptomatic and subclinical infection following resolution of cutaneous leishmaniasis"…… 91

ANEXO 5. Aprobación del Comité Institucional de Ética de Investigaciones en Humanos (CIEIH)-CIDEIM……. 112

ABREVIATURAS

LC:	Leishmaniasis cutánea
LMC:	Leishmaniasis mucocutánea.
LV:	Leishmaniasis visceral.
kADN:	ADN del minicírculo del cinetoplasto
PCR:	Reacción en cadena de la polimerasa.
7SL ARN:	Componente integral de la partícula de reconocimiento de la señal, un complejo de ribonucleoproteína de seis polipéptidos y un ARN que media la translocación de proteínas en el retículo endoplasmático.
LST:	"Leishmanin skin test" o Prueba de Montenegro.
VIH:	Virus de la inmunodeficiencia humana.
SIVIGILA:	Sistema Nacional de Vigilancia en Salud Pública
IDSN:	Instituto Departamental de Salud de Nariño.
IA:	Infección asintomática.
IFAT:	Tipificación por Inmunofluorescencia
DAT:	Diagnóstico de leishmaniasis por aglutinación directa
ELISA:	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
IFN-γ:	Interferón gamma
TNF-α:	Factor de necrosis tumoral alfa
IL-5:	Interleuquina 5
GATA-3:	Factor de transcripción codificado en humanos por el gen *gata3*
RFLP:	Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción
RT-PCR:	PCR en tiempo real
qRT-PCR:	PCR cuantitativa en tiempo real
QT-NASBA:	Cuantificación en tiempo real de las secuencia de ácidos nucleicos base de amplificación
SB:	*Southern blot*
ADN:	Ácido desoxirribonucleico
ADNc:	Acido desoxirribonucleico complementario
ARN:	Ácido ribonucleico
ARNr:	Ácido ribonucleico ribosomal
ARNm:	Ácido ribonucleico mensajero
BC:	Bloque conservado
BC1:	Bloque conservado 1, del kADN de *Leishmania*.
BC2:	Bloque conservado 2, del kADN de *Leishmania.*
BC3:	Bloque conservado 3, del kADN de *Leishmania*.
MLST:	Tipificación multilocus de secuencias
MLMT:	Tipificación por microsatélites multilocus

MLEE:	Electroforesis de múltiples enzimas
DANE:	Departamento administrativo Nacional de Estadística.
CIEIH:	Comité Institucional de Ética de Investigación en Humanos de CIDEIM.
PBS:	Solución salina tamponada con fosfato
TBP:	“TATA Box Binding Protein” Proteína de unión a la caja TATA.
MHOM:	Acrónimo usado para nombrar los aislados clínicos provenientes de Humanos.
GAPDH:	Gen Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
CDC:	Centers for Disease Control and Prevention
PBMCs:	Células mononucleares de sangre periférica
UPGMA:	*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*
NJ:	*Neighbor joining*
THP1:	Línea celular de monocitos humanos
PM:	Peso molecular.

RESUMEN

La contribución de las personas con infección asintomática e individuos con historia de infección activa y resolución clínica en la transmisión y endemicidad de la leishmaniasis cutánea (LC) es aún desconocida. Hasta el momento, la base para la definición de la población humana con infección asintomática y potencialmente subclínica en individuos con previa historia de enfermedad activa, ha sido la evidencia inmunológica de exposición a *Leishmania* en los residentes de las áreas endémicas. Sin embargo, no existe confirmación parasitológica de infección persistente.

Se determinaron la presencia y la viabilidad de *Leishmania* en sangre y en muestras no invasivas de tejidos mucosos de los individuos con evidencia inmunológica de infección asintomática e individuos con antecedentes de LC en dos áreas endémicas para la leishmaniasis cutánea en Colombia. La detección del kADN de *Leishmania* fue realizada por PCR-*Southern Blot* y la viabilidad del parásito se confirmó por la detección y amplificación del transcrito del gen 7SL ARN. Se desarrolló una herramienta molecular para el análisis de la diversidad genética de las poblaciones de parásitos que causan la infección subclínica persistente y que circulan en los flebotomíneos, metodología basada en la amplificación y el análisis de una secuencia de 82pb del kADN, entre los bloques conservados 1 y 2.

La infección persistente por *Leishmania* se demostró en 42% (56/133) de los participantes con evidencia inmunológica de infección subclínica, y en ellos se estableció la viabilidad del parásito en el 59% (33/56). La cuantificación de la carga parasitaria realizada a partir de monocitos sanguíneos, hisopados de mucosas nasal, conjuntival y amígdalas, fueron comparables y oscilaron entre 0,2 a 22 parásitos por reacción. La secuenciación de kADN se logró en muestras de 28 participantes con infección subclínica y en 14 flebotomíneos colectados en los sitios de estudio, lo que permitió el análisis de distancia genética, que revela la diversidad entre las secuencias y su agrupación dentro del subgénero *L.* (*Viannia*).

Los resultados proporcionan una confirmación parasitológica de infección persistente entre los residentes de las áreas endémicas de LC, con historia de LC o con infección asintomática, revelando una población silenciosa como un potencial reservorio del parásito, lo que podría contribuir a la endemicidad y transmisión de LC. La genotipificación del kADN, establece una primera aproximación que demuestra la factibilidad para el análisis de diversidad genética en las poblaciones de parásitos que antes eran inaccesibles e inexploradas, tanto en individuos con infección asintomática y subclínica, como en los flebotomíneos que participan en la transmisión de la enfermedad.

Palabras claves: infección asintomática, subclínico, persistencia, *Leishmania,* diversidad poblacional.

1. INTRODUCCIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La leishmaniasis cutánea (LC) es endémica en Colombia. Anualmente se reportan cerca de 15.000 casos, de los cuales más del 95% corresponden a infecciones causadas por especies del subgénero *Viannia*(1). Esta enfermedad presenta un amplio espectro de manifestaciones clínicas que van desde infección asintomática a formas sintomáticas con manifestaciones cutáneas leves que en algunos casos se resuelven sin necesidad de tratamiento o desarrollan lesiones severas y crónicas de años de evolución clínica.

Se ha demostrado ampliamente la existencia y predominancia de infección asintomática en áreas endémicas para las leishmaniasis visceral (LV) y cutánea, tanto en humanos, como en animales(1–4). Se ha evidenciado que la eliminación de reservorios caninos seropositivos con manifestaciones clínicas, en los programas de control de LV, no es suficiente para frenar la transmisión(5,6). Estudios realizados en perros con infección asintomática causada por *Leishmania infantum* demostraron que pueden ser infecciosos para flebotomíneos, de la misma forma que lo son los perros sintomáticos(4,7), lo que sugiere que una población canina con infección asintomática podría contribuir en la transmisión de la LV.

La proporción de individuos con infección asintomática, tanto en zonas endémicas para la LC como la LV, es variable. En estudios prospectivos realizados en áreas endémicas para la leishmaniasis cutánea en las Américas se resalta una proporción variable de individuos con infección asintomática, comparado con la infección sintomática. En zonas rurales del Pacifico y Santander en Colombia se presenta una proporción de individuos con infección asintomática entre el 91%(1) y el 31%(8), respectivamente, y en comunidades del Perú, del 17%(2). El papel de la infección asintomática y potencialmente subclínica, después de resolución de LC activa en humanos, en la transmisión de la LC y en el desencadenamiento de enfermedad es hasta el momento desconocido(4).

Individuos con evidencia inmunológica de exposición al parásito, aun después de una curación clínica y con presencia de cicatrices compatibles con historia de LC, representan

un grupo con mayor riesgo de desarrollar lesiones activas, comparado con individuos sin evidencia inmunológica(1). La importancia de la detección de infección subclínica en humanos radica en que, además de ser una población a riesgo de desarrollar la enfermedad por activación de la infección, puede representar un reservorio oculto y disponible de parásitos para los vectores antropofílicos. Esto enfatiza la necesidad de realizar estudios que permitan entender y establecer el papel del individuo con infección subclínica en la transmisión de la LC.

Actualmente, la detección de infección asintomática y subclínica en individuos de zonas endémicas para la LC se basa en evidenciar la exposición previa del humano al parásito mediante el uso de pruebas inmunológicas (ej. Linfo-proliferación *in vitro* o prueba de hipersensibilidad retardada al antígeno de leishmanina (en inglés Leishmanin skin test (LST)); sin embargo estas pruebas no discriminan entre exposición previa e infección persistente(9).

Este trabajo de investigación tuvo como objetivo demostrar parasitológicamente la presencia de *Leishmania* durante la infección asintomática y subclínica en habitantes de comunidades endémicas para LC en Colombia, y su potencial relación con la transmisión de la enfermedad. Mediante el desarrollo e implementación de novedosos métodos moleculares, se evaluó la presencia y viabilidad de *Leishmania* en la infección asintomática y subclínica, y se presenta una primera aproximación para ser usada en el análisis de diversidad genética en estas poblaciones de parásitos.

2. PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN

2.1 ¿Hay persistencia de parásitos en ausencia de enfermedad activa en áreas endémicas de Colombia?

2.2 ¿La población con infección asintomática y subclínica podría participar en la transmisión de la leishmaniasis cutánea en circunstancias de transmisión doméstica?

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Detectar la presencia y viabilidad de *Leishmania* en individuos con evidencia de infección asintomática o antecedentes de leishmaniasis cutánea, con el fin de conocer su potencial participación en la transmisión de la infección.

3.2 Objetivos específicos

3.2.1 Determinar la frecuencia de detección de *Leishmania* y la carga parasitaria en mucosas y sangre de individuos con antecedentes de enfermedad o infección asintomática en comunidades endémicas para leishmaniasis cutánea, en Colombia

Indicadores:

- Frecuencia de detección de kADN de *Leishmania* en los diferentes grupos clínicos.

- Frecuencia de positividad de kADN de *Leishmania* en muestras de tejidos mucosos y en sangre.

- Cuantificación de carga parasitaria en las muestras con detección del kADN.

3.2.2 Diseñar y evaluar una herramienta molecular para el análisis de la variabilidad genética de *L. panamensis* a partir de muestras de individuos con infección persistente.

Indicadores:

- Desarrollar una herramienta molecular de alta sensibilidad para genotipificación de *Leishmania* en muestras clínicas con bajas cargas parasitarias.

- Evaluar la diversidad genética de *Leishmania* en muestras clínicas con confirmación parasitológica de infección subclínica.

4. MARCO TEORICO

4.1 Biología del parásito.

Las leishmaniasis son un conjunto de enfermedades zoonóticas y antroponóticas, causadas por protozoos del género *Leishmania*. Son transmitidas por insectos hematófagos de la familia *Psychodidae* y de la subfamilia *Plebotominae*. En el Nuevo Mundo (América) el género *Lutzomyia* es el más importante y en el Viejo Mundo (Europa, África y Asia) lo es *Phlebotomus*(10).

Leishmania es un protozoario intracelular obligado en el hospedero mamífero. Alrededor de 20 especies de *Leishmania* infectan mamíferos incluyendo al hombre. Las especies de importancia médica se encuentran ubicadas taxonómicamente en los subgéneros *Viannia* y *Leishmania*. Las especies más importantes son:

- *Leishmania* subgénero *Leishmania*:
    - Complejo *L. donovani,* asociado a leishmaniasis visceral: *L. donovani* y *L. infantum*/*L. chagasi*
    - Complejo *L. mexicana,* asociado a leishmaniasis cutánea: *L. mexicana*, *L. amazonensis y L. venezuelensis*
    - Especies asociadas a leishmaniasis cutánea en el viejo mundo: *L. tropica, L. major y L. aethiopica.*

- *Leishmania* subgénero *Viannia:*
    - Especies asociadas a manifestaciones cutáneas y mucocutáneas en el nuevo mundo: *L. braziliensis*, *L. guyanensis*, *L. panamensis* y *L. peruviana*.

Las diferentes especies son indistinguibles morfológicamente, pero pueden diferenciarse por análisis de isoenzimas, métodos moleculares o anticuerpos monoclonales(11).

4.1.1 Ciclo de Vida.

Las leishmaniasis se transmiten durante la ingesta sanguínea de las hembras de flebotomíneos infectadas (Figura 1 [1]). Los promastigotes que llegan por la herida de la picadura son fagocitados por los macrófagos (Figura 1 [2]) y otros tipos de células mononucleares fagocíticas. Los promastigotes se transforman en estas células en su estadio tisular, amastigotes (Figura 1 [3]), que se multiplican por fisión binaria y proceden a infectar otras células mononucleares fagocíticas (Figura 1 [4]). Este estadio tisular, es el que se encuentra asociado a infección persistente en los hospederos humanos(12).

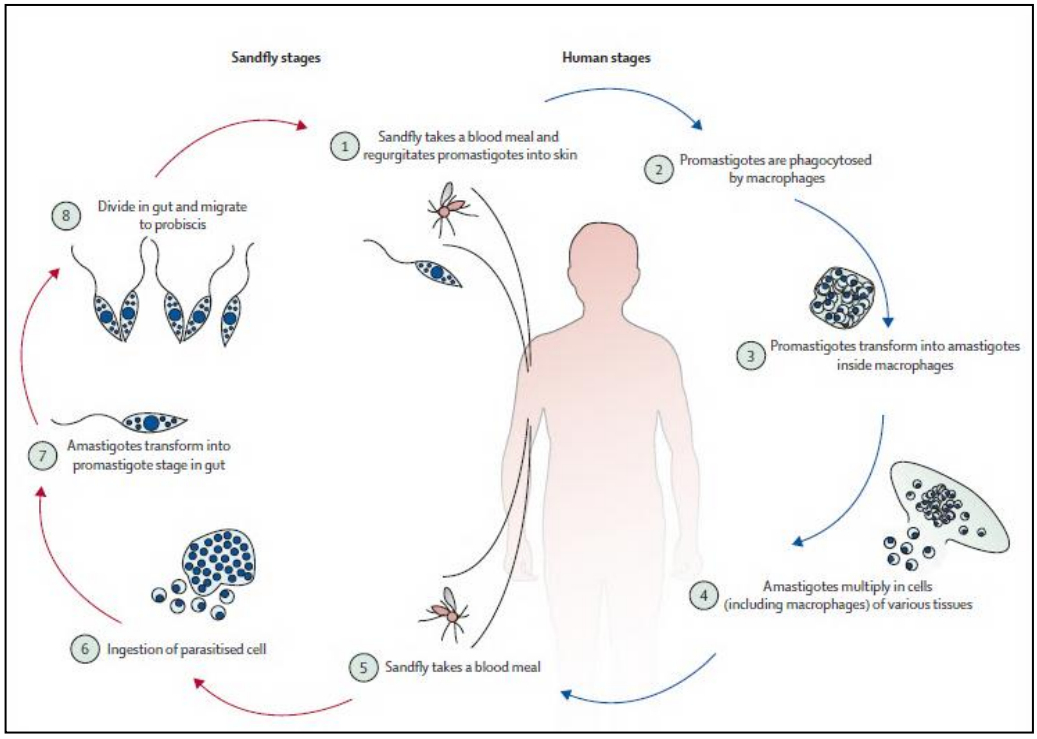


Figura 1. Ciclo de vida de *Leishmania*. Fuente: Reithinger *et al*, 2007.

El ciclo de infección de los flebotomíneos comienza cuando la hembra ingiere sangre de un hospedero infectado con amastigotes de *Leishmania* (Figura 1 [5], [6]). En el intestino

medio de los flebotomíneos, los amastigotes se diferencian en promastigotes procíclicos no infectivos y nectomonas (Figura 1 [7]) hasta diferenciarse en promastigotes metacíclicos infectivos en la válvula estomodeal del intestino anterior, para ser inoculados a un hospedero sano al alimentarse nuevamente de sangre (Figura 1 [8]). El parásito necesita un periodo de cuatro a 25 días, para desarrollarse dentro del flebotomíneo; cuando éste inocula el parásito a otra persona o a un animal, el ciclo de transmisión se completa(12). El parásito, el hospedero y otros factores influyen en que la infección se vuelva sintomática y en la presentación de las formas clínicas.

4.2 Formas clínicas de la leishmaniasis.

Hay varias formas de las leishmaniasis en los humanos, desde formas asintomáticas (sin síntomas o signos), hasta formas sintomáticas, con manifestaciones clínicas que van desde úlceras cutáneas que cicatrizan espontáneamente, hasta formas fatales en las cuales se encuentra compromiso de hígado y bazo(10). La expresión clínica de la enfermedad es muy variable. El estado fisiológico, nutricional y la predisposición genética del hospedero, pueden jugar un papel importante en el desenlace de la infección(4).

4.2.1 Leishmaniasis cutánea (LC)

Es la forma más común de las leishmaniasis. Es causada, entre otras, por especies del subgénero *Viannia* y del complejo *L. mexicana* en América Latina, y por *L. major* y *L. tropica,* principalmente, en regiones tropicales y subtropicales de Asia y África. Las manifestaciones clínicas varían de acuerdo con la respuesta inmune del hospedero, la especie del parásito y el tiempo de evolución de la infección(13). Generalmente se producen úlceras en partes expuestas del cuerpo como la cara, los brazos y las piernas. Las úlceras típicas son redondeadas, de fondo limpio y granular, de bordes elevados y eritematosos, que usualmente es indolora. Las úlceras dejan una cicatriz característica, atrófica en su centro, de borde hiperpigmentado y con estriaciones estrelladas del centro a la periferia. En menor proporción, las manifestaciones se pueden presentar como lesiones nodulares, en forma de placa o vegetantes(9,14).

Una forma de LC es la leishmaniasis cutánea difusa causada por *L. amazonesis* y *L. mexicana*. Esta forma se presenta con lesiones nodulares difusas, no ulceradas, que no

cicatrizan espontáneamente, que se pueden distribuir en todo el cuerpo, con recaídas después del tratamiento, y en ocasiones pueden causar la muerte. Se sugiere que estas manifestaciones son desencadenadas a causa de deficiencias inmunológicas en los individuos afectados(9).



Figura 2. Espectro de manifestaciones clínicas de LC. (A) Lesión nodular, (B) Lesión típica, (C) Lesión atípica y (D) Reactivación de la LC. Fuente: Archivo fotográfico CIDEIM.

4.2.2 Leishmaniasis mucocutánea (LMC)

Es la forma menos común de la leishmaniasis tegumentaria, presente únicamente en algunas partes de América Latina, la mayoría de los casos se presentan en Bolivia, Brasil y Perú(10). Esta forma clínica está asociada con infección con algunas de las especies de *Leishmania* del subgénero *Viannia*(12). La lesión puede causar la destrucción total o parcial de las membranas de las mucosas de la nariz, boca, garganta, cavidades y tejidos circundantes (Figura 3). La LMC se considera un episodio secundario a lesiones cutáneas(15). Se estima que ocurren 4.000 nuevos casos cada año(16).



Figura 3. Presentación clínica de la leishmaniasis mucocutánea. Lesión en parpado (A) y labio superior (B). Fuente: Zea *et al*., 2009(17).

4.2.3 Leishmaniasis visceral (LV)

En el Viejo Mundo esta forma clínica también se conoce como Kala-azar, es la forma clínica más severa de las leishmaniasis y es causada por especies del complejo *L. donovani*. Las manifestaciones clínicas incluyen hepato-esplenomegalia e inmunosupresión por afectar el bazo, el hígado y la medula ósea; hay episodios irregulares de fiebre, pérdida sustancial de peso y anemia (Figura 4). De no ser tratada, puede ser mortal. Es altamente endémica en el subcontinente Indio y en África oriental. Se estima que cada año se producen en el mundo entre 200.000 y 400.000 casos nuevos de LV, más del 90% de ellos en seis países: Bangladesh, Brasil, Etiopía, India, Sudán y Sudán del Sur(10).



Figura 4. Leishmaniasis visceral. Fuente: www.cdc.gov.

4.3 Ciclos de transmisión.

4.3.1 Transmisión zoonótica.

En este ciclo de transmisión es necesaria la presencia del reservorio animal para el mantenimiento del parásito en la naturaleza. Entre los reservorios identificados para las diferentes especies de *Leishmania* se encuentran: marsupiales (*Didelphis* spp), el oso perezoso (*Choloepus* spp y *Bradypus* spp), el oso hormiguero menor (*Tamandua tetradactyla*), el zorro (*Cerdocyonthous*) y roedores (*Rattus* spp*, Proechimys* spp, *Nectomys* spp, *Oryzomys* spp, etc). En el ambiente urbano, el perro es el principal reservorio de *L. infantum/L. chagasi* (10).

El ciclo de transmisión zoonótica está ampliamente distribuido en Asia Central, Oriente Medio y el Mediterráneo; también se puede encontrar en algunas regiones de Latinoamérica, como en el Brasil(18,19). Este ciclo ha sido descrito principalmente para infecciones causadas por *L. major*, *L. aethiopica* y especies del subgénero *Viannia*. La LC por *L. major*, afecta a alrededor de 500.000 personas cada año. Se presenta en Asia Central, Oriente Medio, Norte de África y algunos países sub-saharianos. Los brotes son típicos en las áreas rurales y dependen de las fluctuaciones en la población de roedores(20). La LC causada por *L. aethiopica* está presente en Etiopía y a pesar de presentar 50.000 casos anuales y tener una progreso clínicamente grave (LC difusa y en menor grado LMC), es la forma más desatendida de las LC. En América del Sur, se presentan anualmente alrededor de 300.000 casos nuevos de LC de transmisión zoonótica, causada por especies del subgénero *Viannia*.

4.3.2 Transmisión antroponótica.

En este ciclo de transmisión, el humano es la única fuente de infección para el vector. El ciclo antroponótico de la LV, donde *L. donovani* es la especie involucrada, se caracteriza por ciclos cerrados de transmisión. Se distribuye principalmente en India, con más de 300.000 casos anuales. En África Oriental, causa alrededor de 50.000 casos anuales, en forma de brotes epidémicos, con una alta tasa de mortalidad(20). La transmisión antroponótica de LV en áreas urbanas cada vez es mayor, se relaciona con el gran número de inmigrantes que viven en condiciones de pobreza, el difícil acceso a los sistemas de salud, deficientes condiciones de salubridad, desnutrición y co-infección con

el VIH(21,22). En términos de control para la LV, la prioridad se ha dado a los focos antroponóticos, por su alto impacto a nivel epidemiológico(23).

También se ha reportado un ciclo de transmisión antroponótica en LC causada por *L. tropica*. Se transmite en las áreas urbanas y afecta a aproximadamente 400.000 personas al año. Se han presentado brotes masivos en suburbios superpoblados con malas condiciones ambientales y de vivienda(24). Aunque la transmisión de la LC causada por especies del subgénero *Viannia* se considera principalmente zoonótica, existe evidencia de aumento de casos en población pediátrica y adulta mayor(25), y urbanización de la transmisión(26,27), que sugieren una participación importante de un ciclo antroponótico en focos endémicos de la enfermedad.

4.4 Epidemiologia

4.4.1 Las leishmaniasis en el mundo.

Las leishmaniasis están presentes en cinco continentes y son endémicas en 98 países, estimándose que cerca de 350 millones de personas viven en las zonas con riesgo de adquirir la infección.

Se estima que cada año se producen 1,3 millones de casos nuevos, de los cuales 300.000 son de LV (90 % de los cuales se producen en Bangladesh, Brasil, Etiopía, India, Nepal, Sudán del Sur y Sudán) y 1.000.000 son de LC (que se producen principalmente en Afganistán, Argelia, Brasil, Colombia, Irán, Pakistán, Perú, Arabia Saudita, Siria y Túnez) y LMC (principalmente en Brasil, Perú y Bolivia). De los 1,3 millones de casos estimados, sólo alrededor de 600.000 se reportaron realmente. La distribución de las leishmaniasis ha aumentado desde el año 1993, presentándose también un aumento en el número de casos registrados. La notificación es obligatoria en 33 de los 98 países afectados por lo que la verdadera magnitud del problema es aún desconocida(10).

Estas enfermedades se relacionan con la pobreza. Se asocian con desnutrición, desplazamiento, malas condiciones de vivienda, analfabetismo, discriminación de género, y dificultad para acceder a los servicios de salud. También se han vinculado con cambios ambientales como la deforestación, la construcción de represas, desastres naturales,

nuevos sistemas de riego, urbanización, conflicto armado y la migración a áreas endémicas; donde la exposición a la infección resulta en epidemias notables(10,23).
En América constituyen un problema de salud pública debido a su morbilidad y amplia distribución geográfica. Su complejo ciclo de transmisión comprende diferentes especies de parásitos, reservorios y vectores, y se han registrado casos de LC y LMC en 18 países de América.

4.4.2 Las leishmaniasis en Colombia.

En Colombia las leishmaniasis son endémicas y se encuentran en el 91% de todo el territorio ubicado bajo los 1750 m.s.n.m(28). Se encuentran las tres formas clínicas de la enfermedad: LC, LV y LMC; siendo la más frecuente la LC, con más del 95% de los casos totales. Se estima que en el país existen alrededor de 10 millones de personas en riesgo y la transmisión es principalmente rural(29). Los focos se encuentran en diferentes regiones naturales que incluyen zonas selváticas de bosque seco tropical (Costa Caribe), región andina y oriente del país. Se ha demostrado la presencia de cinco especies de *Leishmania*, pertenecientes a los subgéneros *Viannia* y *Leishmania.* Sin embargo, el mayor número de casos de leishmaniasis cutánea es ocasionado por las especies del subgénero *Viannia,* siendo *L. panamens*is la especie más frecuente(30,31). Se han descrito 125 especies de flebotomíneos, pero sólo siete de ellos se han encontrado naturalmente infectados con *Leishmania* y han sido incriminados como vectores(32).

Esta diversidad de especies de parásitos y vectores hace más compleja la caracterización epidemiológica y el control de la enfermedad en el país. De acuerdo con los reportes del Sistema de Vigilancia en Salud Pública (SIVIGILA), para el año 2012 se reportaron 9.546 casos de leishmaniasis en todas sus formas, de los cuales 9.353 (98%) corresponden a LC (Tabla 1). En cuanto a esta forma clínica, se ha comprobado que la transmisión es altamente heterogénea y se observa que una pequeña proporción de municipios que reportan la mayor parte de todos los casos notificados.

Tabla 1. Número de casos de leishmaniasis reportados en Colombia durante los años 2005 a 2013. LC: Leishmaniasis cutánea; LMC: Leishmaniasis mucocutánea; LV: Leishmaniasis visceral

	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013
LC	10009	8296	5880	3291	12574	14411	8023	9353	8514
LMC	61	107	80	47	94	280	147	179	131
LV	62	44	54	44	59	31	18	14	18
TOTAL	**10132**	**8447**	**6014**	**3382**	**12727**	**14722**	**8188**	**9546**	**8663**

Fuente: Instituto Nacional de Salud-SIVIGILA, años 2005 a 2013.

La epidemiologia de la leishmaniasis cutánea en Colombia ha presentado modificaciones importantes en los últimos años, atribuidas a la migración (circulación de grupos humanos por áreas selváticas), a las prácticas agrícolas, al conflicto armado y a los cambios en el comportamiento de los vectores; este último aspecto está relacionado con los factores climáticos o con actividades humanas que favorecen la colonización del vector en nuevos ambientes(10).

Las comunidades en las que se desarrolló el presente estudio se encuentran en los departamentos de Risaralda y Nariño. En Risaralda para el año 2012 se registraron 87 casos de LC, mientras que en el año 2013 el número de casos llego a 272(33,34). En este departamento, las zonas endémicas para leishmaniasis son, principalmente, Mistrató y Pueblo Rico, siendo este último uno de los municipios donde se desarrolló el presente trabajo de investigación. En el departamento de Nariño para el año 2012, se presentaron 317 casos; y para el año 2013, 649 casos. Casos que en su mayoría provienen del municipio de Tumaco, seguido por Barbacoas, Roberto Payán, Olaya Herrera y El Charco; todos municipios del litoral pacífico, según datos reportados por el SIVIGILA y el Instituto Departamental de Salud de Nariño (IDSN).

4.5 Infección asintomática (IA).

4.5.1 La infección asintomática en las leishmaniasis.

La infección asintomática (IA) ha sido documentada en individuos que viven en áreas endémicas para la leishmaniasis y que han desarrollado una apropiada respuesta inmune que puede controlar la replicación del parásito y mantener la integridad del tejido(3).

Estudios de prevalencia de IA por *L. infantum* en zonas endémicas de transmisión, muestran una frecuencia del 25% al 80% dependiendo del área geográfica y la técnica usada para la detección(35). En Bihar (India), un estado altamente endémico para LV, se estimó que el número de individuos seropositivos asintomáticos en la población y sin un historial de LV fue cercano al 13 %, lo que sugiere una alta tasa de IA también con *L. donovani*(4).

Dentro del panorama de la infección asintomática en la LV han surgido hallazgos como la demostración de infección persistente por *Leishmania infantum/L. chagasi* por PCR en donantes de sangre(36,37), lo que abre la puerta a interrogantes sobre la posibilidad de adquirir la enfermedad al recibir una transfusión de sangre de un individuo con IA, y a otro tipo de riesgos en la salud pública a lo que estas comunidades endémicas se podrían enfrentar. Sin embargo, la falta de métodos estándares fiables para la detección de IA, hace difícil determinar su impacto epidemiológico(38).

Actualmente las técnicas inmunológicas o moleculares, como la prueba de Montenegro (LST: Leishmanin Skin Test), inmunofluorescencia (IFAT), aglutinación directa (DAT), ELISA, Western blot o inmunocromatografía y PCR, permiten evidenciar la exposición previa al parásito, y con especial mención en las pruebas moleculares, permiten demostrar la presencia del parásito(39,40) en tejidos aparentemente sanos(41–44). El uso de un solo método de detección, puede subestimar el número de individuos con IA en una población dada(35).

Se conoce muy poco, sobre lo que contribuye a que una infección por *Leishmania* desencadene en una forma asintomática o persista subclínicamente después de una infección activa y cura clínica de la misma. Sin embargo podrían encontrarse características propias del parásito, del vector, del hospedero y/o medio ambientales; que juegan un papel importante en definir el tropismo del parásito

En un área endémica, una misma especie (o cepa) de *Leishmania* puede encontrarse asociada al desencadenamiento de diferentes manifestaciones clínicas de la enfermedad, o a diferencias en la susceptibilidad a medicamentos(45), lo cual indica que factores del patógeno y de su interacción con el hospedero podrían modular el desenlace clínico de la infección. Hay poca información disponible sobre las cepas que se encuentran en los individuos con infección asintomática y subclínica, en parte por la dificultad de su aislamiento y posterior propagación *in vitro*. En estudios recientes se ha reportado que los aislados de *Leishmania* obtenidos a partir de sangre de individuos con IA de un área endémica para LV, son genéticamente diferentes a los encontrados en los pacientes con enfermedad activa(36,46), lo cual sugiere una potencial selección poblacional en el desencadenamiento o no de patología. La relación entre las manifestaciones asintomáticas de la LC y los parásitos asociados a esta, es aún desconocido.

Los programas de control y erradicación de la LV, han evidenciado que la eliminación de los reservorios seropositivos o con manifestaciones clínicas, no es suficiente para frenar la transmisión(5,6). Adicionalmente, en estudios realizados en perros con IA, se demostró que pueden ser infecciosos para los flebotomíneos, en la misma forma que los son los perros sintomáticos(4). Esto sugiere que tanto animales como humanos con infección subclínica, podrían contribuir en la endemicidad y transmisión de la enfermedad.

4.5.2 La infección asintomática en *Leishmania* (*Viannia*).

Las infecciones causadas por especies de *Leishmania* del subgénero *Viannia*, presentan una alta variabilidad en su historia natural: el curso clínico puede ir desde la infección asintomática, curación espontanea, diseminación metastásica, reactivación, reinfección hasta lesiones crónicas(1). Sin embargo aún no es claro porqué la infección por *L.* (*Viannia*), en unos individuos ocasiona enfermedad y en otros no. La prevalencia de la infección asintomática, en áreas endémicas para *L.* (*Viannia*) ha sido variable. En poblaciones expuestas a *L. panamensis*, se ha reportado una prevalencia entre el 31% y 91%(1,8), para *L. peruviana* de un 17%(2) y en áreas endémicas para *L. braziliensis* la prevalencia de infección asintomática ha sido reportada entre un 5% y un 10%(47).

Uno de los aspectos más estudiados en relación al desencadenamiento y persistencia de la infección asintomática es la respuesta inmune. En estudios *in vitro* y con modelos

murinos, la respuesta inmune sistémica en este grupo de individuos ha mostrado un perfil de respuesta tipo Th1 y una disminución en la respuesta tipo Th2 en comparación con los individuos que desarrollan LC(47). La respuesta eficiente tipo Th1 protege de LC, mientras que la inducción de respuesta Th2 resulta en una enfermedad progresiva(3,48). De otro lado, en individuos asintomáticos en zonas endémicas para *L. braziliensis*, se encontraron niveles más bajos de IFN-γ y TNF-α y niveles altos de IL-5, en comparación con pacientes con LC, sugiriendo que los individuos que no desarrollaron la enfermedad pueden tener la capacidad de modular una respuesta inmune protectora(47).

Se sugiere que los niveles de IFN-γ y TNF-α observados en individuos con infección asintomática pueden ser suficientes para controlar el crecimiento del parásito y no mediar daños en los tejidos(47). Esto coincide con los hallazgos que reportan una respuesta pro inflamatoria controlada en la infección asintomática, y que se correlaciona inversamente con la transcripción de GATA-3, un factor de transcripción que controla la activación de la respuesta Th2(49).

El uso de metodologías moleculares (PCR, RFLP, RT-PCR, etc) junto con ayudas serológicas, ha permitido conocer la extensión de la IA en algunas poblaciones de áreas endémicas. Es así como esta combinación de herramientas ha dado a conocer la población de perros que pueden ser blanco para las medidas de control de la transmisión de la enfermedad(50,51). En estudios realizados en Perú y Brasil, se detectó ADN del parásito en la sangre, tanto de los perros sintomáticos como asintomáticos(52,53). En Perú, la positividad de detección del parásito fue del 7,5% para los perros asintomáticos y del 32% para los sintomáticos(54).

En pacientes con LC causada por *L.* (*Viannia*)(43,55) e individuos con resolución de la enfermedad después del tratamiento, se ha demostrado la presencia subclínica del parásito en tejidos extra lesionales, a través de la combinación de PCR y muestreo no invasivo (hisopados) de mucosas(56).

4.5.3 Factores de riesgo asociados a IA.

La IA es más frecuente en las áreas rurales donde la circulación del flebotomíneos es más abundante que en áreas urbanas(57), y donde hay un contacto prolongado y sin

interrupciones entre el vector y el hospedero(58). Además de las condiciones medioambientales, los factores del hospedero también pueden influir, como lo reportan estudios en donde los hombres presentan mayor incidencia de IA que las mujeres(35). Las diferencias socioeconómicas, los estados nutricionales y los perfiles genéticos de los individuos, pueden favorecer o no la incidencia de IA(35).

En áreas endémicas para *L. donovani*, el riesgo de seroconversión se incrementa a medida que aumenta la edad en los individuos(59). La convivencia con un individuo con LV, puede incrementar el riesgo de infección asintomática por *L. infantum/L. chagasi* (7,60). Entre otros factores de riesgo se encuentra vivir en casa con techos de paja(60).

4.5.3.1 Los individuos con IA como un potencial reservorio para la transmisión.

Un hospedero debe cumplir con los siguientes criterios, para ser incriminado como reservorio en la leishmaniasis(10):

- El reservorio debe ser abundante y de larga vida.
- Son necesarios contactos repetitivos entre el reservorio y el vector para incrementar las posibilidades de transmitir el parásito.
- La proporción de individuos reservorios debe exceder el 20%.
- La infección debe ser lo suficientemente larga y no patogénica para permitir una supervivencia prolongada de los parásitos.
- La carga parasitaria debe ser suficiente y estar disponible en la piel y sangre.

En las áreas endémicas para *L. infantum,* los individuos con IA cumplen con los cuatro primeros criterios sin embargo, la carga parasitaria disponible en sangre es mucho menor (0 - 0,2 parásitos/ml de sangre mediante PCR cuantitativa) a las observadas en los pacientes con LV (32 - 188.700 parásitos/ml)(61). Se ha reportado, al comparar pacientes con LV activa o curada frente a individuos con IA (LST positivos o personas que vivían cerca de un paciente con LV), que solo el grupo de LV activa es capaz de infectar al flebotomíneo(62) y recientemente, a través de modelos matemáticos, se ha mostrado que los individuos con infección asintomática, con altas parasitemias en LV, fueron los responsables de la infección de los flebotomíneos(63). Aunque estos hallazgos son importantes, no se puede descartar el aporte de los individuos con IA, ellos representan

una proporción importante de las poblaciones endémicas y la dinámica de la carga parasitaria en estos individuos, entre otras características, que pueden influenciar su participación en el ciclo de transmisión, son aún desconocidas.

4.6 Herramientas moleculares utilizadas para la detección y el análisis genotípico de *Leishmania.*

Dadas las bajas cargas parasitarias esperadas durante las infecciones asintomáticas y subclínicas, las herramientas moleculares basadas en el análisis de ácidos nucleicos del parásito son una alternativa al estudio de la IA en las áreas endémicas para LC, para las que métodos convencionales de aislamiento y propagación de *Leishmania* no han sido exitosamente implementados(11).

Las ventajas de las aproximaciones moleculares basadas en PCR u otras técnicas de amplificación se basan en la alta sensibilidad de detección de la infección en tejidos humanos, animales y flebotomíneos. Se han realizado numerosas aproximaciones basadas en PCR, utilizando como blanco diferentes regiones de genoma de *Leishmania*, tanto codificantes como no codificantes. De estos blancos se destacan el ADN del minicírculo del cinetoplasto (kADN)(43,64,65), el miniexon(66), el ADN ribosomal(67) y los genes de: la Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa(68,69), *gp*63(70), *hsp*70(71), citocromo b(72), 7SL ARN(41,73) y 18S ribisomal(74), entre otros(75).

Para este trabajo de investigación se seleccionó el kADN como blanco molecular para la detección de *Leishmania* y para los análisis de diversidad genética. El transcrito del gen 7SL ARN se seleccionó para determinar la viabilidad del parásito y para cuantificar la carga parasitaria en los tejidos muestreados. La siguiente sección describirá de una forma no exhaustiva estos blancos moleculares y algunas de las técnicas más comunes para el análisis de la diversidad en *Leishmania.*

4.6.1 ADN del minicírculo del cinetoplasto (kADN) de *Leishmania.*

El ADN del cinetoplasto es el ADN mitocondrial de los parásitos de la familia *Trypanosomatidae*. Este ADN está organizado en cientos de redes interconectados de ADN circular(76). En cada parásito, el cinetoplasto contiene entre 10 y 20 copias de

círculos grandes de ADN, denominados maxicírculos, con un tamaño de 20.000 a 40.000 pares de bases (pb)(76). Sin embargo la mayor parte de la red se compone de alrededor de 1.000 copias de círculos pequeños de ADN, denominados minicírculos con un tamaño <1.000 pb(76). Los maxicírculos tiene funciones similares a los ADN mitocondriales de otras especies eucariotas; participan en la codificación de algunos productos génicos tales como ARNr y subunidades de los complejos respiratorios. Para generar ARNm funcionales los maxicírculos experimentan una modificación postranscripcional a través de un proceso de edición del ARN. La información genética para la edición es proporcionada por ARN guías que en su mayoría se codifican en los minicírculos. La codificación de ARN guías es la única función conocida de los minicírculos(77). Los minicírculos varían en tamaño y en secuencia en las diferentes especies; hay incluso una considerable heterogeneidad de secuencia dentro de un único parásito(76).

La abundancia del kADN, hacen de este un blanco molecular para la utilización en metodologías basadas en PCR, ya que se ha demostrado una mayor sensibilidad dado el número de copias presentes por parásito(43,78).

Todos los minicírculos de kADN de Trypanosomatidae, están organizados en un esquema homogéneo, que incluye una o varias regiones altamente conservadas. En *Leishmania* hay tres bloques altamente conservados (BC): BC1 (GGGCGT), BC2 (CCCCGTTC) y el BC3 (GGGGTTGGTGTA) con homologías entre las especies entre el 90 y el 100%. El BC1 y el BC3 son casi idénticos en todas las especies investigadas, mientras que el BC2 es menos universal(79).

Existe controversia en cuanto a la relación entre detección de ADN de un organismo y su viabilidad. La larga vida media del ADN puede resultar en su detección independientemente de viabilidad celular(39).

4.6.2 7SL ARN de *Leishmania*.

Por la vida media y la labilidad el ARN ha sido considerado un indicador de viabilidad y un blanco para el diagnóstico de las enfermedades infecciosas(80). Se han desarrollado métodos como la amplificación cuantitativa de ácidos nucleicos basados en secuencia

(QT-NASBA) y PCR en tiempo real para el uso en la detección de ARN en los microorganismos patógenos.

El 7SL ARN es un componente integral de la partícula de reconocimiento de la señal, un complejo de ribonucleoproteína de seis polipéptidos y un ARN que media la translocación de proteínas en el retículo endoplasmático. La diversidad genética del 7SL ARN, en mamíferos y tripanosomátidos, su abundancia en el citoplasma (250 copias del transcrito por organismo)(81)y la corta vida media, apoyan la factibilidad de detección sensible y especifica de parásitos vivos por la amplificación de este blanco(82).

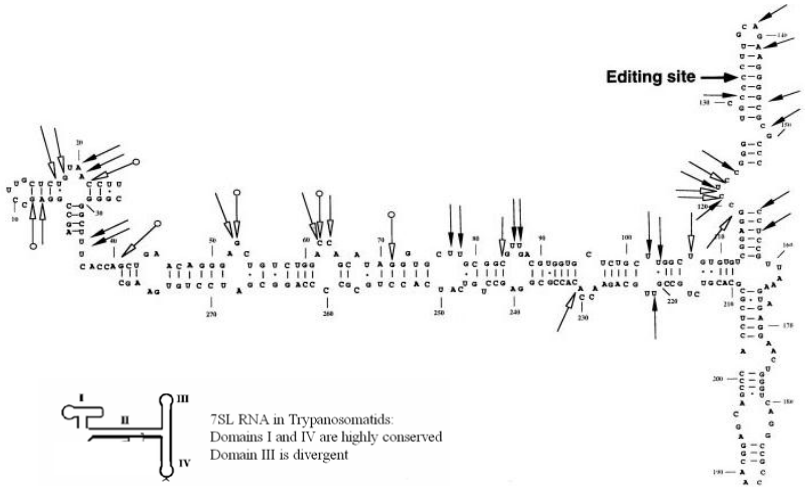


Figura 5. Estructura del 7SL ARN en Tripanosomátidos. Fuente: Ben-Shlomo *et al*., 1999(83).

Este blanco molecular ha sido usado para la identificación de especies de *Leishmania*, usando PCR en tiempo real y el análisis de la secuencia amplificada(73), y para establecer la viabilidad y estimar la carga parasitaria en lesiones y tejidos extra lesiónales de pacientes con LC(41).

4.6.3 Tipificación molecular de *Leishmania,* isoenzimas y microsatélites.

La clasificación actual de *Leishmania* se realiza por tipificación de isoenzimas, usando una electroforesis de múltiples enzimas (MLEE). Esta ha sido la técnica “gold standard” usada para la identificación de especies y subespecies de *Leishmania*. Detecta diferentes alelos de genes constitutivos por movilidad electroforética de las enzimas que codifican.

Este método se basa en diferentes paneles de enzimas(30), dependiendo de la epidemiologia de los sitios.

Desde hace más de 15 años, los marcadores de microsatélites han sido ampliamente utilizados para estudiar la genética de poblaciones de diversos organismos(11). Los microsatélites son repeticiones cortas de ADN, se distribuyen en todo el genoma, presentan una diversidad alélica en un gran número de loci, se heredan de una manera mendeliana y son co-dominantes(83). La alta variabilidad hace de ellos unos marcadores moleculares útiles para la tipificación genética a nivel de individuo o de grandes poblaciones(85). En *Leishmania*, los microsatélites además de ser usados en genética de poblaciones y en estudios de micro-epidemiología, se han usado principalmente para evaluar cepas de diferentes áreas geográficas y poder establecer poblaciones y especies circulantes(11).

No obstante la robustez y aplicabilidad de estos dos métodos, están limitados por la necesidad de cultivar el parásito, por la gran cantidad de proteínas o ácidos nucleicos necesarios para las técnicas.

5. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

5.1 Diseño del estudio.

Este estudio fue diseñado para 1) evaluar si la infección asintomática y subclínica en individuos de zonas endémicas para LC puede confirmarse parasitológicamente, y 2) para demostrar la persistencia, viabilidad y diversidad de *Leishmania* en individuos con infección persistente en comunidades endémicas para la LC. Se definieron como individuos con infección asintomática aquellos con evidencia inmunológica de infección sin historia de enfermedad ni manifestaciones clínicas aparentes. Individuos con potencial infección subclínica fueron definidos como aquellos con antecedentes y resolución de enfermedad activa con reactividad positiva al LST. Este estudio se realizó en las comunidades de transmisión endémica de leishmaniasis cutánea en los departamentos de Nariño y Risaralda en Colombia.

Después de la confirmación inmunológica de exposición a *Leishmania* por reactividad a LST, se evaluó la presencia de *Leishmania* mediante la detección del kADN por PCR / *Southern Blot* en monocitos de sangre, aspirados de cicatriz de lesión e hisopados de mucosa nasal, amígdala y conjuntiva. La viabilidad del parásito se determinó por qRT-PCR del transcrito del gen 7SL ARN, y la diversidad genética de *Leishmania* se evaluó por genotipificación de la región conservada del kADN.

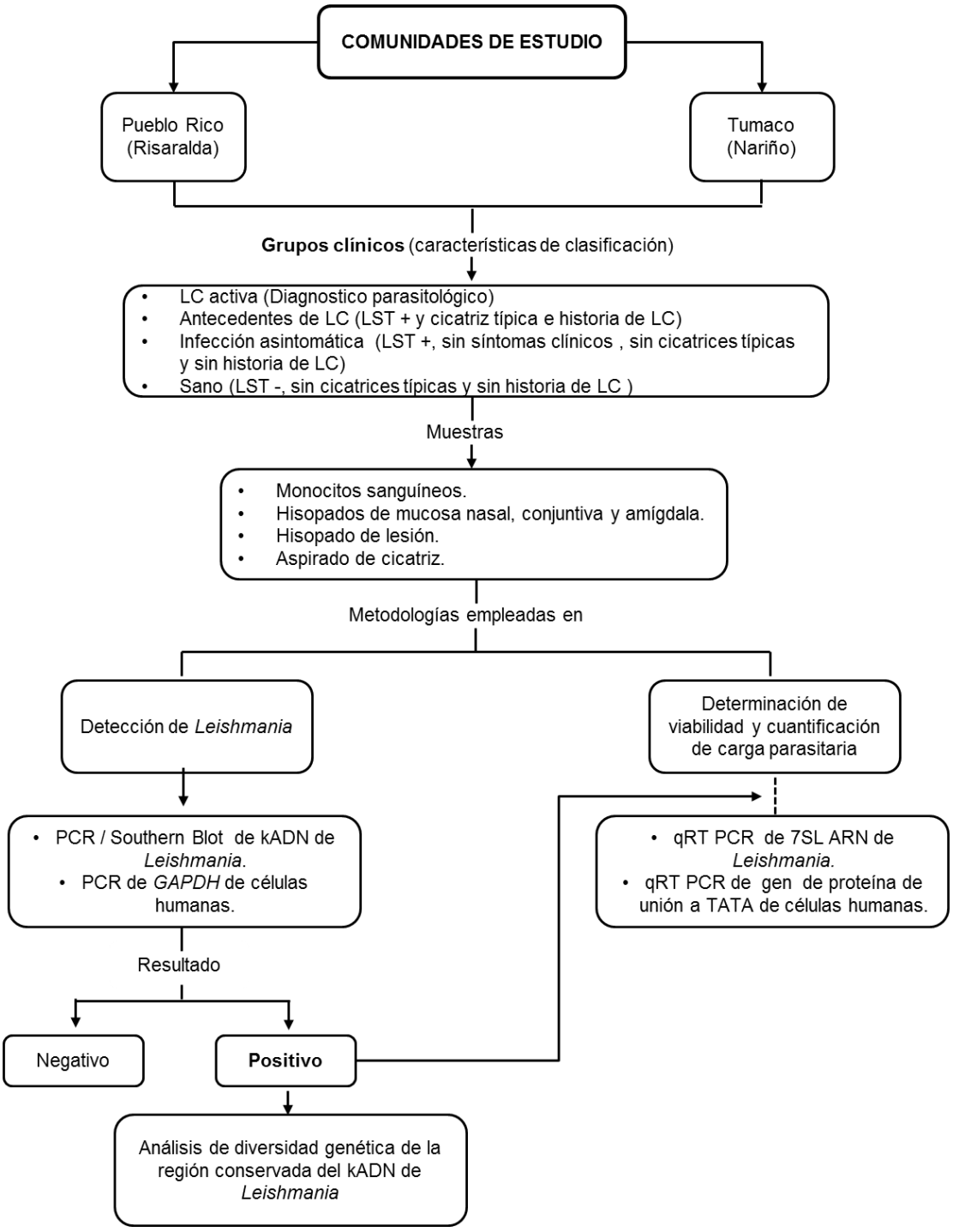


Figura 6. Estrategia experimental del trabajo de investigación. (LC: Leishmaniasis cutánea; LST: Leishmanin skin test o Prueba de Montenegro)

6. **MATERIALES Y METODOS**

6.1 Población de estudio

Para este estudio descriptivo se invitó a participar a individuos de cinco comunidades ubicadas en los departamentos de Nariño (San Juan, Achotal y Restrepo) y Risaralda (La Cabaña e Itauri), en Colombia. Los participantes se clasificaron en cuatro grupos clínicos: infección asintomática, antecedentes de la enfermedad, leishmaniasis cutánea activa e individuos sanos.

Risaralda cuenta con una población de 1.035.000 habitantes, se localiza en el centro occidente del país, limita la norte con los departamentos de Antioquia y Caldas, al sur con el Quindío, al oriente con el Tolima, al noroccidente con el Choco y al occidente con el Valle del Cauca.

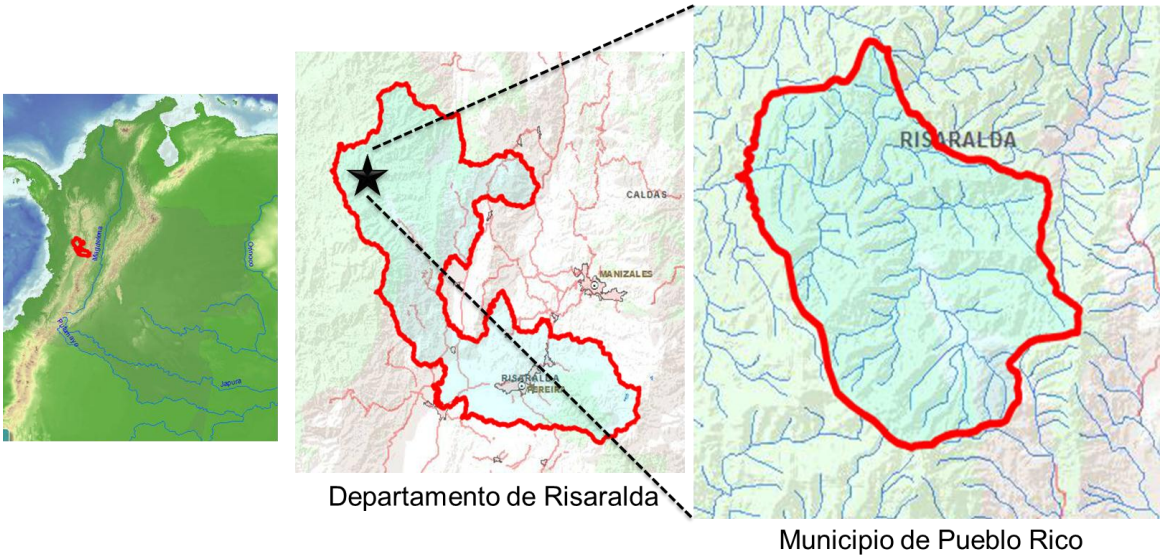


Figura 7. Mapa del departamento de Risaralda, Colombia; se resalta la ubicación del municipio de Pueblo Rico. Fuente: geoportal.igac.gov.co.

En el departamento de Risaralda se ubica el municipio de Pueblo Rico, con las veredas La Cabaña e Itauri. El municipio se encuentra a una altitud de 1.560 m.s.n.m, con una

temperatura promedio de 18ºC, tiene un área de 1.020 Km^2 y cuenta con 11.436 habitantes (DANE, 2005). Este municipio se encuentra ubicado al noroccidente del departamento de Risaralda. (Figura 7) Limita al norte con Mistrató y Bagadó, al sur con Novita (Chocó), al oriente con Apía, Belén de Umbría y Santuario y por el occidente con Tadó.

El departamento de Nariño se encuentra ubicado al suroccidente del país, limita al norte con el departamento del Cauca, por el oriente con el Putumayo, por el sur con la Republica del Ecuador y por el occidente con el Océano Pacifico. Cuenta con 1.680.795 habitantes (DANE 2012).

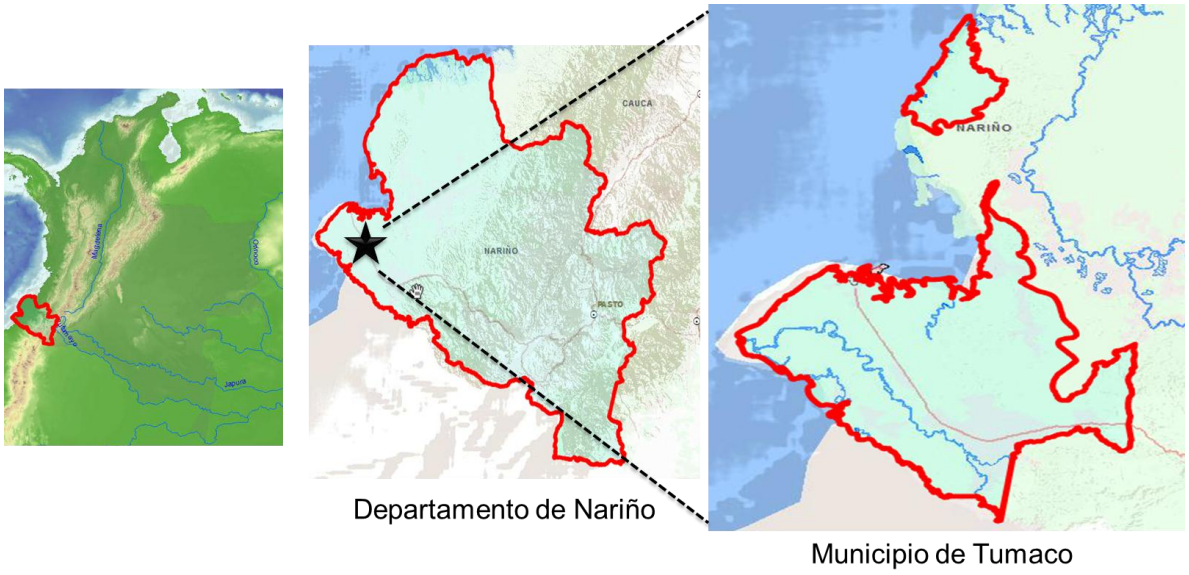


Figura 8. Mapa del departamento de Nariño, Colombia; se resalta la ubicación del municipio de Tumaco. Fuente: geoportal.igac.gov.co.

En el departamento de Nariño se identificó el municipio de Tumaco, con las veredas San Juan, Achotal y Restrepo. Este municipio se encuentra a una altura de 2 m.s.n.m, tiene una temperatura media entre 26 y 28°C. Limita al norte con el Océano Pacifico y el municipio Francisco Pizarro, por el sur con le República del Ecuador, por el oriente con los municipios de Roberto Payán y Barbacoas y por el occidente con el Océano Pacifico. El municipio cuenta con 187.084 habitantes (DANE) (Figura 8)

6.2 Consideraciones éticas.

La inclusión de los individuos se realizó bajo el Protocolo de Investigación del proyecto: *Carga de infección humana en la transmisión y pérdida de susceptibilidad a medicamentos en la leishmaniasis cutánea*, en conformidad con las pautas éticas nacionales (Resolución No. 008430 del 4 de Octubre de 1993, República de Colombia, Ministerio de Salud) e internacionales (Declaración de Helsinki y sus enmiendas, Brasil 2013) bajo aprobación y seguimiento por el Comité Institucional de Ética de Investigación en Humanos de CIDEIM (CIEIH). Para la inclusión de participantes dentro del estudio se realizó el proceso de consentimiento o asentimiento informado donde se explicaron de manera clara los objetivos, beneficios y potenciales riesgos del estudio.

6.2.1 Criterios de inclusión. Se tuvieron en cuenta los siguientes criterios de inclusión:

1) Residencia en comunidad con alta probabilidad de transmisión domestica de leishmaniasis cutánea.
    a. Niños entre cero a cinco años, con lesiones activas y/o cicatrices típicas.
    b. Proporción similar de casos con LC en ambos sexos.
    c. Presencia del vector en el interior de las viviendas y en las áreas cercanas a la misma (peri domicilio).
2) Participación voluntaria.

6.2.2 Criterios de exclusión. Se excluyeron individuos por:

1) No aceptación del proceso de consentimiento informado.

6.3 Obtención y procesamiento de muestras.

A cada uno de los participantes se les tomó una muestra de 10 mL de sangre periférica y dos hisopados de mucosa nasal, conjuntiva y amígdalas. Para los participantes con antecedentes de la enfermedad y leishmaniasis cutánea activa, se incluyó aspirado de cicatriz e hisopado de lesión, respectivamente. A los participantes menores de siete años, solo se les tomó hisopado de mucosa nasal.

6.3.1. Obtención de monocitos de sangre periférica.

La sangre periférica se obtuvo por punción venosa, utilizando como anticoagulante EDTA en solución (400 mg/ml).Los monocitos de sangre periférica fueron aislados mediante centrifugación usando 1-Step™ Monocytes (Accurate Chemical & Scientific co). La sangre total se mezcló en una proporción de una parte de Dextran 500 en 0.9% de NaCl por 10 partes de la sangre, se incubó a temperatura ambiente por 90 min para permitir la sedimentación de los eritrocitos y obtener así un sobrenadante rico en leucocitos. Este sobrenadante se adicionó a 1-Step™ Monocytes, se centrifugó a 1500 rpm por 15 min a 20ºC. El sobrenadante se colectó y se diluyó en una solución de 0.9% NaCl/ 0.13% EDTA/ 1 % Albumina de suero bovino (BSA), se centrifugó por 1500 rpm por 10 min a 20ºC; el sobrenadante se descartó, se resuspendió el pellet de células y se lavó la suspensión con solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco (D-PBS).

Los monocitos fueron almacenados en TRIzol® Reagent (Invitrogen), a -70ºC hasta su procesamiento.

6.3.2 Aspirado de cicatriz.

La obtención del aspirado de cicatriz se realizó con una jeringa de 1 mL con 0.1 mL de solución salina tamponada con fosfato (PBS) adicionada con antibiótico (penicilina/estreptomicina), se introdujo la aguja de 3 a 4 mm en el borde exterior de la cicatriz, realizando movimientos de rotación constante y aspirando el material. El material aspirado se almacenó en TRIzol® Reagent (Invitrogen), a -70ºC hasta su procesamiento.

6.3.3 Obtención de muestras por hisopado de mucosas.

Los hisopados de mucosas (mucosa nasal, amígdala y conjuntiva) y lesión; se obtuvieron frotando suavemente la superficie de la mucosa o la lesión, con un hisopo desarrollado para la recolección de muestras de ADN (BuccalAmp kit; Epicenter Biotechnologies), estos se almacenaron a -70ºC hasta su procesamiento.

6.3.4 Extracción de ácidos nucleicos.

El ARN y el ADN fueron extraídos de los monocitos sanguíneos y de los aspirados de cicatriz usando AllPrep DNA/RNA Minikit (Qiagen). El ADN de los hisopos, fue extraído siguiendo las instrucciones de la casa comercial (BuccalAmp kit; Epicenter Biotechnologies) con un paso adicional de precipitación en etanol al 90% y una solución

de acetato de sodio 300 mM, por toda la noche a - 45ºC. El ARN fue extraído de las muestras de hisopados en TRIzol® y procesado usando RNeasy Mini Kit (Qiagen).

El ADN fue usado para PCR/*Southern blot* del kADN de *Leishmania*, secuenciación del kADN y PCR del *GAPDH* humano. El ARN total, tratado con ADNasa I, fue usado para síntesis de ADNc y PCR en tiempo real cuantitativo (qRT-PCR) de los transcritos del gen 7SL ARN de *Leishmania* y TATA Box Binding Protein (TBP) humano. La calidad y cantidad de los ácidos nucleicos fue evaluada usando el espectrofotómetro NanoDrop2000 (Thermo Scientific).

6.4 Cepas de *Leishmania* y secuencias de kADN.

Las cepas de referencia *L. panamensis* (MHOM/PA/1971/LS94), *L. guyanensis* (MHOM/BR/1975/M4147), *L. braziliensis* (MHOM/BR/1975/M2903), *L. donovani* (MHOM/IN/1980/DD8), *L. amazonensis* (MHOM/BR/1973/M2269), *L. mexicana* (MHOM/BZ/1982/BEL21) y *L. infantum* (MHOM/TN/80/IPT1), y los aislados clínicos de pacientes con LC (Tabla 2), fueron obtenidos del Biobanco de CIDEIM. Todos los aislados fueron tipificados por anticuerpos monoclonales y/o electroforesis de isoenzimas. Los promastigotes fueron mantenidos a 26ºC en medio Roswell Park Memorial Institute (RPMI) suplementado con 10% de suero fetal bovino inactivado por calor (Gibco), glutamina al 1%, 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomicina. Los promastigotes en fase logarítmica se recogieron por centrifugación, se lavaron en PBS y la suspensión de parásitos se almacenó a -70ºC hasta su procesamiento. La extracción de ADN a partir de la suspensión de parásitos se realizó con DNeasy® Blood & Tissue Kit (Qiagen).

Tabla 2. Aislados clínicos de pacientes con leishmaniasis cutánea y cepas de referencia, obtenidas del Biobanco-CIDEIM.

Especies	Nombre de la cepa	Identificación
L. (V) braziliensis	MHOM/BR/1975/M2903 [a]	M2903
	MHOM/CO/08/5387R	5387Lb
	MHOM/CO/09/5601	5601Lb

	MHOM/CO/12/7036	7036Lb
	MHOM/CO/13/12174	12174Lb
	MHOM/CO/14/12208	12208Lb
	MHOM/CO/13/11008	11008Lb
	MHOM/CO/14/11089	11089Lb
	MHOM/CO/13/12168	12168Lb
	MHOM/CO/14/12256	12256Lb
	MHOM/CO/14/12255	12255Lb
L. (V) guyanensis	MHOM/BR/1975/M4147 [a]	M4147
	MHOM/CO/06/A073	A073Lg
	MHOM/CO/08/A192	A192Lg
	MHOM/CO/06/A016	A016Lg
	MHOM/CO/06/A076	A076Lg
	MHOM/CO/06/A025	A025Lg
	MHOM/CO/83/L76	L76Lg
	MHOM/CO/NR/L75	L75Lg
	MHOM/CO/83/1028	1028Lg
	MHOM/CO/84/1096	1096Lg
L. (V) panamensis	MHOM/PA/1971/LS94 [a]	LS94
	MHOM/CO/2002/3594/*Luc*001	*Luc*001
	MHOM/CO/11/5996	5996
	MHOM/CO/12/B006	B006
	MHOM/CO/11/5967	5967
	MHOM/CO/85/2277	2277-2.2
	MHOM/CO/85/2476	2476-2.2
	MHOM/CO/85/2496	2496-2.2
	MHOM/CO/85/2423	2423-2.2
	MHOM/CO/85/2272	2272-2.2
	MHOM/CO/85/2350	2350-2.2
	MHOM/CO/85/2330	2330-2.2

	MHOM/CO/85/2420	2420-2.2
	MHOM/CO/85/2363	2363-2.2
	MHOM/CO/85/2348	2348-2.2
	MHOM/CO/84/2198	2198-2.3
	MHOM/CO/84/2159	2159-2.3
	MHOM/CO/84/2173	2173-2.3
	MHOM/CO/84/2168	2168-2.3
	MHOM/CO/84/2183	2183-2.3
	MHOM/CO/84/2169	2169-2.3
	MHOM/CO/87/1320	1320
	MHOM/CO/09/5578	5578
	MHOM/CO/06/8591	8591
	MHOM/CO/08/5415	5415
	MHOM/CO/11/5944	5944
	MHOM/CO/07/5264	5264
	MHOM/CO/05/8094	8094
	MHOM/CO/06/8668	8668
	MHOM/CO/05/5035	5035
	MHOM/CO/05/5033	5033
	MHOM/CO/03/3783	3783R
	MHOM/CO/12/7136	7136
	MHOM/CO/12/7123	7123
	MHOM/CO/13/7127	7127
	MHOM/CO/12/7137	7137
Complejo *L.(L) mexicana*	MHOM/BR/1973/M2269 [a]	M2269

[a] Cepas referencia

Para el análisis de la diversidad genética también se incluyeron secuencias del GenBank NCBI, los números de acceso están incluidos en la siguiente tabla.

Tabla 3. Secuencias del minicírculo de ADN de *Leishmania*, obtenidas de GenBank.

Especies	Nombre de la cepa	Numero de acceso GenBank	Identificación
L.(L) donovani	MHOM/IN/80/DD8 [a]	AF167712.1	DD8
	MHOM/CN/80/STRAIN-A	AF168358.1	STRAIN-A
	MHOM/SD/95/SIGIN	AF169136.1	SIGIN
	MHOM/SD/97/RHD-48	AF169135.1	RHD-48
	MHOM/SD/95/MSA2	AF169134.1	MSA2
	MHOM/KE/75/MUTINGA-H9	AF184892.1	MUTINGA-H9
	MHOM/ET/67/HU3	AF103742.1	HU3
	MHOM/SD/97/RLD1	AF103737.1	RLD1
	MHOM/SD/85/A22	AF103736.1	A22
L.(L) infantum/L. chagasi	*MHOM/ES/81/LEM307*	AF188701.1	LEM307
	MHOM/TN/80/IPT1 [a]	Z35274.1	IPT1
	MHOM/FR/91/LEM-2298	AF190475.1	LEM-2298
	MHOM/ES/97/LLM-710	AJ275335.1	LLM-710
	MHOM/DZ/85/LIPA141	AF169133.1	LIPA141
	MHOM/ES/98/LLM-735	AJ275326.1	LLM-735
	MHOM/FR/78/LEM75	AF103735.1	LEM75
	MHOM/UK/88/CILLONICZ	AF103740.1	CILLONICZ
	MHOM/SU/84/MARZ-KRIM	AF190476.1	MARZ-KRIM
Complejo *L.(L) mexicana*	*L. amazonensis* Lam-331	EU370875.1	Lam-331
	MHOM/BR/00/Raimundo	M21326.1	Raimundo
	L. amazonensis isolate Lam-324	EU370871.1	Lam-324
	NA	Z11555.1	L. mex
L.(S) tarentolae	*L. tarentolae LEIKPMNCA KSR1 strain C-1*	K01978.1	KSR1
	L. tarentolae clone ND9-VIa	AF380753.1	ND9-VIa
	L. tarentolae clone ND8-VIb	AF380752.1	ND8-VIb
	L. tarentolae Strain UC	X04110.1	UC

	L. tarentolae clone RPS12-VIII	AF380747.1	RPS12-VIII
L.(V) braziliensis	MHOM/BR/75/M2904	XM_001568753.1	M2904
L. (V) panamensis	MHOM/PA/75/M4037	AF118474.1	M4037

[a] Cepas referencia.

6.5 PCR/*Southern blot*.

El kADN de *Leishmania* fue amplificado de todas las muestras por PCR, usando los cebadores B1 (5'-GGG GTT GGT GTA ATA TAG TGG-3') y LV (5'-ATT TTT GAA CGG GGT TTC TG-3'), seguido por hibridación por *Southern blot*, como se ha descrito previamente(78). Los productos de PCR se separaron en geles de agarosa al 1.2% y las bandas se visualizaron en el equipo Gel Doc™ EZ (BioRad). Para el *Southern blot*, se transfirieron los productos de PCR a una membrana de nylon (Amersham Hybond-N+), en la membrana se realizó la hibridación y detección con AlkPhos Direct Labeling and Detection System (Amersham Biosciences) de acuerdo con las instrucciones de la casa comercial. La hibridación se realizó a 60ºC con una sonda de 700 pb obtenida del kADN de *L. panamensis Luc*001. Las membranas se expusieron a películas radiográficas y se evaluó la positividad por visualización de bandas a la altura de 700 pb.

Para evaluar la calidad de las muestras de ADN se amplificó un fragmento de 242 pb del gen Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (*GAPDH*) humano, utilizando los cebadores *GAPDH*–242 Fw (5´-CTG GCC CTC TGC CCT CCT ACC A-3´) y *GAPDH*-242 RV (5´-TTC CAT CCA GCC TGG GGC GAA-3´). Los productos de PCR se separaron en geles de agarosa al 2.5% y se visualizaron en Gel Doc™ EZ (BioRad). Las muestras *GAPDH* negativas fueron excluidas de los análisis.

6.6. PCR cuantitativa en tiempo real (qRT PCR).

Las muestras kADN positivas, fueron evaluadas por PCR en tiempo real, para establecer la viabilidad de *Leishmania* y estimar la carga parasitaria usando el transcrito 7SL ARN de

Leishmania (41). Para la síntesis de ADNc se usó High Capacity cDNA Reverse Transcription Kits (Applied Biosystems*)*. La detección en la reacción de PCR se realizó con SYBR® Green PCR Master Mix (Life technologies), con los cebadores TRY7SL.For.1 (5´-TGC TCT GTA ACC TTC GGG GGC T-3´) y TRY7SL.Rev.1 (5´-GGC TGC TCC GTY NCC GGC CTG ACC C-3´), que amplifican un transcrito de 179 pb de 7SL ARN de *Leishmania.* La amplificación y la medición en tiempo real se realizaron en BIO-RAD CFX96. El ADNc de la cepa de laboratorio *L. panamensis Luc*001, se usó como control positivo. La especificidad de los productos de qRT PCR, se evaluó por análisis de curvas *melting*.

Para normalizar y con el fin de hacer comparativa la cuantificación entre muestras clínicas se usó como gen normalizador de la proteína de unión a la caja TATA (TBP) de humano. Este gen fue amplificado con los cebadores hTBP-Q; forward (5´-CAC GAA CCA CGG CAC TGA TT-3´) y reverse (5´-TTT TCT TGC CAG TCT GGA-3´) (donación David Gregory, Harvard University).

6.6.1 Sensibilidad para qRT PCR del transcrito de 7SL ARN y del gen normalizador TBP.
Para determinar el límite de detección de la qRT PCR del 7SL ARN de *Leishmania,* se realizó una curva estándar, utilizando una cepa de *L. panamensis* Luc. La extracción de ARN, se realizó a partir de 1 x 10^7 parásitos (conteo realizado en cámaras de Neubauer) con RNeasy Mini Kit (Qiagen). Para la síntesis de ADNc, se usó High Capacity cDNA Reverse Transcription Kits (Applied Biosystems*)*. Del ADNc se realizó diluciones seriadas 1:10 en agua libre de nucleasas (Qiagen), desde 1 x 10^7 hasta 1 x 10^{-2}. Siguiendo con las condiciones previamente descritas (6.6), se continuó con la qRT PCR del transcrito de 7SL ARN.

Para el gen normalizador TBP, en la construcción de la curva estándar se utilizaron 1 X 10^7 células de la línea celular U937. La extracción de ARN se realizó con RNeasy Mini Kit (Qiagen) y la síntesis con High Capacity cDNA Reverse Transcription Kits (Applied Biosystems*).* A partir del ADNc, se realizaron diluciones seriadas 1:10 en agua libre de nucleasas (Qiagen), desde 1 x 10^7 hasta 1 x 10^{-2}. Se continuó con la qRT PCR del gen normalizador TBP, siguiendo con las condiciones previamente descritas (6.6).

6.7. Captura y procesamiento de flebotomíneos.

El componente entomológico hace parte del proyecto marco de este trabajo de investigación titulado "*Carga de infección humana en la transmisión y pérdida de susceptibilidad a medicamentos en la leishmaniasis cutánea*". Para establecer posibles relaciones de los individuos con infección subclínica y el ciclo de transmisión, se genotipificó por secuenciación del kADN (sección 6.8) las poblaciones de *Leishmania* encontradas en los insectos vectores circulantes en las comunidades de estudio, en los individuos con infección activa y aquellos con evidencia de infección subclínica. Brevemente se describe el proceso de colecta y procesamiento de muestras de flebotomíneos realizado por la Unidad de Control de Vectores de CIDEIM.

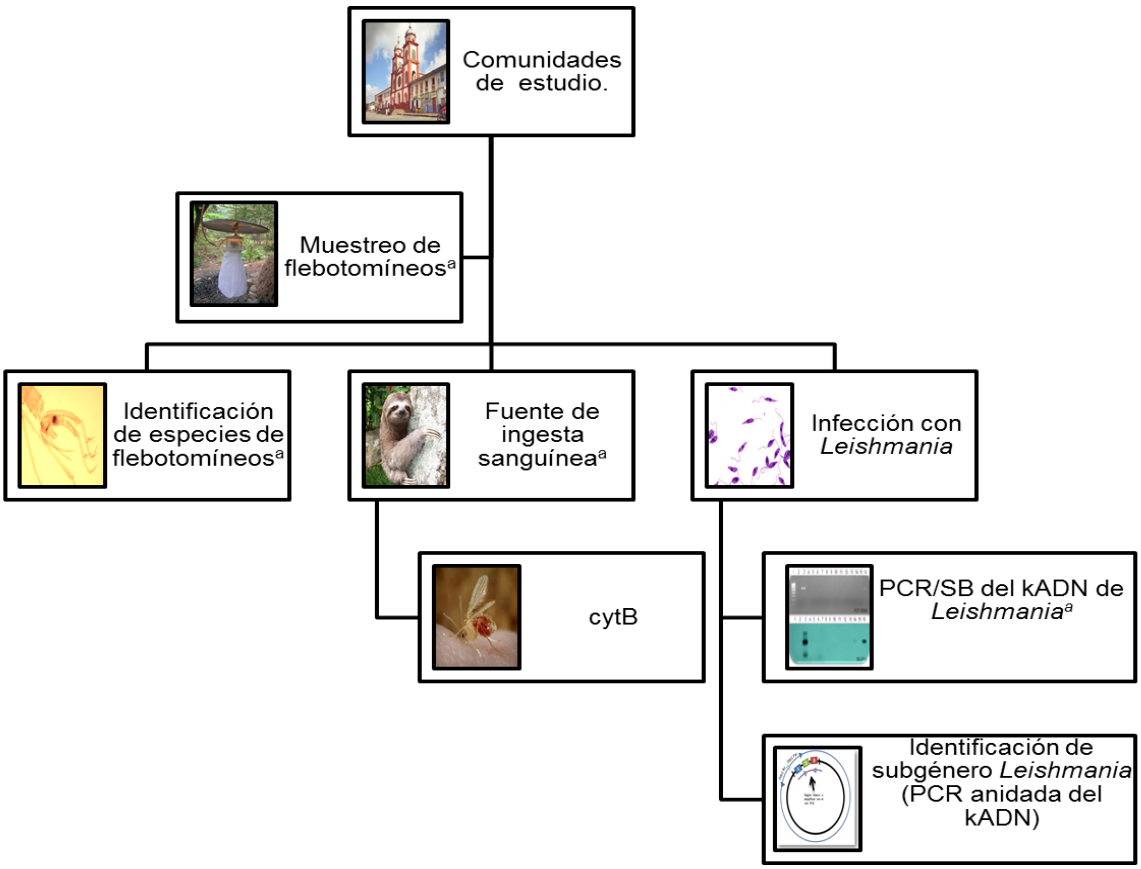


Figura 9. Metodología seguida para el procesamiento de los flebotomíneos colectados en las comunidades de Pueblo Rico y Tumaco. [a] Procesos realizados por Mabel Moreno, estudiante de maestría en Epidemiologia, Unidad de Control de Vectores-CIDEIM. SB: *Southern blot*

6.7.1 Captura y taxonomía de flebotomíneos.

Las capturas de los insectos flebotomíneos se llevaron a cabo en el Municipio de Pueblo Rico-Risaralda durante dos días consecutivos, en el intra-domicilio en nueve viviendas de la vereda La Cabaña y 18 viviendas en la vereda Itauri. El material entomológico del municipio de Tumaco-Nariño fue colectado en intra-domicilio y peri-domicilio de 12 y 13 viviendas de las veredas Achotal y San Juan, respectivamente. Para las capturas de los flebotomíneos se utilizaron trampas de luz CDC, instaladas a una altura de 1.5 metros sobre el nivel de suelo y activadas entre las 18:00 y 06:00 horas. Los flebotomíneos colectados fueron almacenados en viales con alcohol al 70%. La determinación taxonómica de los individuos se realizó siguiendo las claves entomológicas de Young, 1979; Young & Duncan, 1994 y Galati, 2009 (86–88).

6.7.2 Extracción de ADN de los flebotomíneos.

La extracción del ADN se llevó a cabo en las hembras de las especies de flebotomíneos más abundantes y con antecedentes vectoriales por cada departamento y vereda. Las hembras colectadas se almacenaron individualmente o en grupos de máximo cuatro hembras, en tubos Eppendorff de 1.5 mL con etanol al 70% para la extracción del ADN utilizando el Kit *DNeasy Blood & Tissue* (Qiagen). A cada tubo se le adicionaron 90 µL de buffer de lisis (ATL) y 10 µL de Proteinasa K y se incubó a 56°C durante 12 horas, para luego macerar la muestra con maceradores plásticos estériles. Una vez completada la lisis celular, el ADN liberado se precipitó con 100 µL de etanol absoluto. El volumen de cada muestra se transfirió a una columna del kit y se centrifugó por un minuto a 8000 rpm. Después de agregar los buffers para la denaturación de proteínas que acompañan el ADN (AW1-AW2) y centrifugar para la remoción de sales, el ADN se eluyó con 30 µL de buffer AE (10mM Tris-HCl; 0.5 mM EDTA; pH 9.0). Se cuantificó y almacenó a -20°C para análisis posteriores.

6.7.3 Análisis de ingestas sanguíneas e infección natural con *Leishmania*.

La identificación de las fuentes de ingesta sanguínea de los flebotomíneos se realizó con la amplificación y secuenciación del gen citocromo b (c*ytB*), sobre el ADN de las hembras que contenían sangre como está previamente descrito (89). La detección de *Leishmania* en los flebotomíneos colectados se llevó a cabo de manera individual o por grupos. Se

amplificó el kADN de *Leishmania*(43,78,89) en las muestras de los flebotomíneos, siguiendo los descrito en la sección 6.5.

6.8 Genotipificación del kADN.

Las cepas de *Leishmania,* las muestras kADN positivas de los participante del estudio y muestras de flebotomíneos colectados en las comunidades de estudio(90) fueron procesadas para análisis de diversidad genética, basado en la comparación de secuencias de los bloques conservados del kADN de *Leishmania*.

6.8.1 PCR anidada del kADN de *Leishmania*.

Se diseñó una PCR anidada para amplificar los bloques conservados el kADN de *Leishmania*. Los cebadores externos LVp1 Fw (5´-GAC ATG CCT CTG GGT AGG GGC GTT C-3´) y LVp1 Rv (5´-GGG TGG TAC GAT TTT GAC CCT AA-3´) fueron usados para la reacción del primer ciclo de PCR. Los cebadores internos LVp1 Fw y LVp5 Rv (5´-CTG GGA TGC GCG GCC CAC TAT-3´) fueron usados en la segunda reacción de PCR (Figura 10).

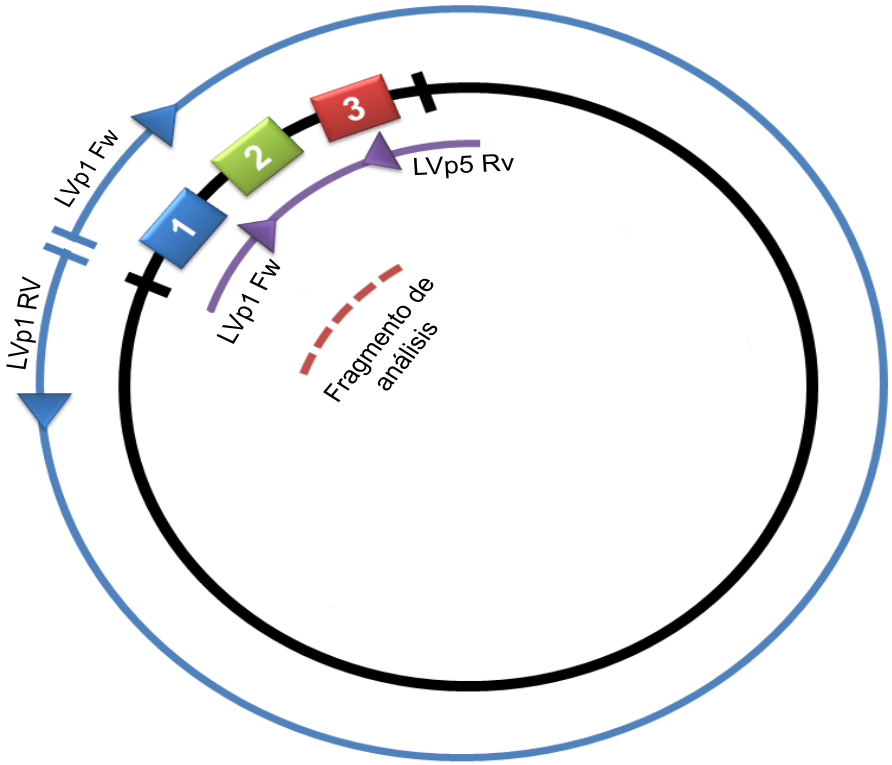


Figura 10. Ubicación de los cebadores LVp1 y LVp1/LVp5 sobre las regiones conservadas del kADN de *Leishmania.*

Cada 25 µL de la mezcla de la primera reacción de PCR contenía 0,8 mM de dNTP, 0,04 U/µL Taq polymerase, 2 µL del ADN, 2.2 mM $MgCl_2$, 1 X PCR buffer, y 0,4 nM de los cebadores LVp1-Fw y LVp1-Rv.Las temperaturas de amplificación fueron las siguientes: 95ºC por 5 min, seguido por 35 ciclos, cada ciclo de 11 min a 95ºC, 62ºC por 30 seg y 72ºC por 30 seg, y una extensión final de 1 min a 72ºC. El producto de la primera PCR fue diluido 1:10 con agua ultra pura, 2 µL de esta dilución fue usada como templado para el segundo PCR, que se realizó bajo las condiciones descritas anteriormente, excepto por el uso de los cebadores LVp1-Fw y Lvp5-Rv y una temperatura de anillamiento de 59ºC. Los productos de PCR (180 pb aproximadamente) fueron separados en geles de agarosa al 1.3%, extraídos y purificados para la reacción de secuenciación usando el kit QIAquick gel extraction (Qiagen).

6.8.2 Sensibilidad y especificidad de la PCR anidada del kADN de *Leishmania*.

Se utilizó la cepa de *L. panamensis* MHOM/PA/1971/LS94, para determinar el límite de detección de la PCR anidada en promastigotes, y línea celular monocítica THP1 y células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) de donantes sanos para evaluar su especificidad. La extracción de ADN, se realizó a partir de 1 x 10^6 promastigotes o células humanas, respectivamente. y se realizaron diluciones seriadas 1:10 en buffer AE, desde 1 x 10^6 hasta 1 x 10^{-2}. Posteriormente, se realizó la PCR anidada y visualización de los productos de amplificación, siguiendo las condiciones previamente descritas en 6.8.1.

6.8.3 Reproducibilidad experimental de la PCR anidada del kADN de *Leishmania*.

Se realizó una réplica técnica de la PCR anidada y de la secuenciación, con el ADN de 13 cepas de *L.* (*Viannia*). Las réplicas se realizaron sobre el mismo ADN, en diferentes días, bajo las mismas condiciones experimentales descritas en el numeral 6.8.1.

6.9 Análisis de secuencias.

Para el análisis se utilizó un fragmento de 82 pb que abarca los bloques conservados 1 y 2 del kADN de *Leishmania*. El alineamiento múltiple de las secuencias se realizó con BioEdit (Tom Hall, Ibis Biosciences, versión 7.2.5, 2013). Las distancias genéticas se estimaron utilizando los métodos UPGMA y *Neighbor joining*, con el modelo Jukes-Cantor y distribución G. Los árboles que incluyen una prueba para intervalos de confianza por bootstrap (100 repeticiones) y basados en un resultado de matriz de distancias, fueron construidos usando MEGA6. Se define 0.0035 como punto de corte para los “cluster” o grupos, en la escala de distancia, teniendo como base que un punto de corte 0.01 en la escala que indica homogeneidad de secuencia.

6.10. Tipificación por microsatélites multilocus (MLMT).

El ADN fue extraído de promastigotes en fase logarítmica usando DNeasy® Blood & Tissue Kit (Qiagen). Fueron amplificados por PCR 14 microsatélites (Tabla 4) distribuidos en 13 cromosomas de *Leishmania*, como se ha descrito previamente(91). El tamaño de los microsatélites fue determinado por movilidad de los productos de PCR en geles de agarosa al 4.5%, las bandas se visualizaron y estimaron usando Gel Doc™ EZ (BioRad).

Las distancias genéticas fueron calculadas usando los softwares MSA4.05 y Populations-1.2.32. La construcción de los árboles se realizó en MEGA6 con los métodos UPGMA y *Neighbor joining*.

Tabla 4. Microsatélites amplificados para la tipificación por MLMT(91).

MLMT	Cebadores		Tamaño de fragmento
	Foward	Reverse	
CSg46	AAACGTGCAAAGGCACATC	TCTATTACCGCGCTCATGCT	79
CSg47	GTGTTCGTGAAACGTCGAAA	AAAAGGCCGGTTTCAAATTC	97
CSg48	TTGACGTGTACACCGCTCTT	TTCTGAGAAAGGCAACCGATA	76
CSg53	CATGTAGGCATGCGGTTGTA	GCTCCTTTTCTCGTTTGAAC	100
CSg59	CATTTGAGCTGCACGTGTCT	AGGGGAGAGTGTGTTTGGTG	94
7GN	CTCCTGGAACGGCTAACAC	TGATATGAGGCACATTCAGC	115
11H	CACACCTGCTACTGGTCCTC	TCTGTTTCATGACATGCCTTT	92
11C	GTGGGTATGCGTGTGTCTCT	ATTAAAGTTGCCACCCTCAC	100
6F	CAACAGCAAAGCACAAAGAA	CAGCAATGCCGATAAGAAAC	91
10F	TGCGAGTATACCTCTCCTTCA	CAACAACAACAACCGAGAGG	99
B6F	CACCTCTTGCCTGCACTT	TTTAAACGTCGGTCTGTGTG	95
B3H	GGTATGCGTGGATATGAAGC	CTCGGCATCGCAGTTTC 77	77
AC01R	ACGTCAGCACACAAACGTC	CTTCTTCCTGCTTTGCCTCT	99
AC16R	GGGTGTCGAGGATGAGGT	TAGTGCCATTAGGGGCTCA	93

6.11 Análisis estadístico.

En el diseño metodológico para el Objetivo 1 contempló principalmente la recolección de datos categóricos (ej. ADN del parásito, reactividad a pruebas inmunológicas). Se hizo un primer análisis de variables dicotómicas de forma presencia/ausencia y se estableció relaciones con los grupos clínicos de interés o tipos de muestras. Posteriormente, se realizó un análisis bivariado con relación a las cargas parasitarias en hisopados de mucosas y en monocitos, donde se expresó una cuantificación absoluta y una relativa al gen normalizador. Se aplicó la prueba de normalidad de D'Agostino & Pearson ómnibus para los datos y después una prueba de dos colas con U-Mann-Whitney. El programa estadístico usado fue GraphPad Prism (GraphPad Software, versión 5.01, 2007).

.

Los datos recolectados durante el desarrollo del Objetivo 2 tuvieron una naturaleza categórica (secuencias de ADN de *Leishmania*). Para los análisis de variabilidad o diversidad genética en la genotipificación del kADN de *Leishmania*, el alineamiento múltiple de las secuencias se realizó con ClustalW Multiple Aligment y las distancias genéticas se estimaron con los métodos UPGMA, *Neighbor joining* y *Maximum likelihood*, con el modelo Jukes-Cantor y distribución Gamma. La construcción de los dendogramas se realizó en MEGA6 (Molecular evolutionary genetics analysis, versión 6.0.6, 2013), incluyendo una prueba para intervalos de confianza, por *bootstrap* de 100 repeticiones.

Para los análisis de diversidad genética obtenidos a partir de MLMT, se utilizó inicialmente una plantilla de Excel, que se convirtió en un archivo de texto (.txt), después con la ayuda del programa MSA4.05 (Institute of Population Genetics, versión 4.05, 2007), la extensión del archivo se convierte a formato genepop (.gen). El formato .gen fue leído en el programa Populations-1.2.32 (Olivier Langella, versión 1.2.30, 1999), en él se realizó un análisis de los datos basado en distancias (Cavalli-Sforza and Edwards) e incluyendo una prueba de intervalos de confianza por *bootstrap* de 100 repeticiones, la estimación de los dendogramas se hizo con los métodos UPGMA y *Neighbor joining*, obteniendo un archivo con formato mega (.tre), que se visualizó en MEGA6.

7. RESULTADOS

7.1. Descripción general de las comunidades y los participantes del estudio.

El reclutamiento de participantes se realizó en comunidades de transmisión endémica de la leishmaniasis cutánea en los departamentos de Risaralda y Nariño, Colombia, en el periodo transcurrido entre Febrero de 2011 y Agosto de 2012. En el municipio de Pueblo Rico, Risaralda, se incluyeron 105 participantes, 83 de la vereda Itaurí y 22 de La Cabaña. En el municipio de Tumaco se incluyeron 51 participantes, de ellos 28 fueron de la vereda San Juan, 16 de Achotal y siete de Restrepo, para un total de 156 participantes reclutados en el estudio. Las características sociodemográficas de las poblaciones de estudio se describen en la Tabla 5.

Tabla 5. Características demográficas y prueba de Montenegro en los participantes del estudio.

Sociodemográficas	Pueblo Rico Nº (%) n=105	Tumaco Nº (%) n=51	TOTAL Nº (%) n=156	*p*
Género				
Masculino	49 (46,7)	26 (51,0)	75 (48,1)	0,256[b]
Femenino	56 (53,3)	25 (49,0)	81 (51,9)	
Grupo de Edad				
0 - 10	19 (18,1)	2 (3,9)	21 (13,5)	
11 – 20	23 (21,9)	10 (19,6)	33 (21,1)	0,032[c]
21 – 50	39 (37,1)	19 (37,3)	58 (37,2)	
> 50	24 (22,9)	20 (39,2)	44 (28,2)	
Etnia				
Afro-colombiano	7 (6,7)	38 (74,5)	45 (28,8)	
Mestizo	88 (83,8)	11 (21,6)	99 (63,5)	0,000[c]
Indígena	10 (9,5)	2 (3,9)	12 (7,7)	
Prueba de Montenegro /LST				
Positiva	80 (76,2)	36 (70,6)	116 (74,4)	
Negativa	17 (16,2)	13 (25,5)	30 (19,2)	0,204[b]
No dato[a]	8 (7,6)	2 (3,9)	10 (6.4)	

[a] Sin prueba de Montenegro y con antecedentes de LC.
[b] Prueba estadística: Chi^2
[c] Prueba estadística: F-Fisher

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los participantes para la característica de género (p = 0.2559), pero si para la etnia (p = 0.000) y la edad (p = 0.032), lo que es consecuente con lo encontrado en cada uno de los sitios de estudio, una población en su mayoría Mestiza para Pueblo Rico y Afro para Tumaco, además de las divergencias en los grupos de edad. El 76% (n=80) y 71% (n=36) de la población de las comunidades de Pueblo Rico y Tumaco, respectivamente, presento evidencia inmunológica de exposición a *Leishmania,* no hay diferencias estadísticamente significativas (p = 0.204), en relación a LST en estas comunidades (Tabla 5).

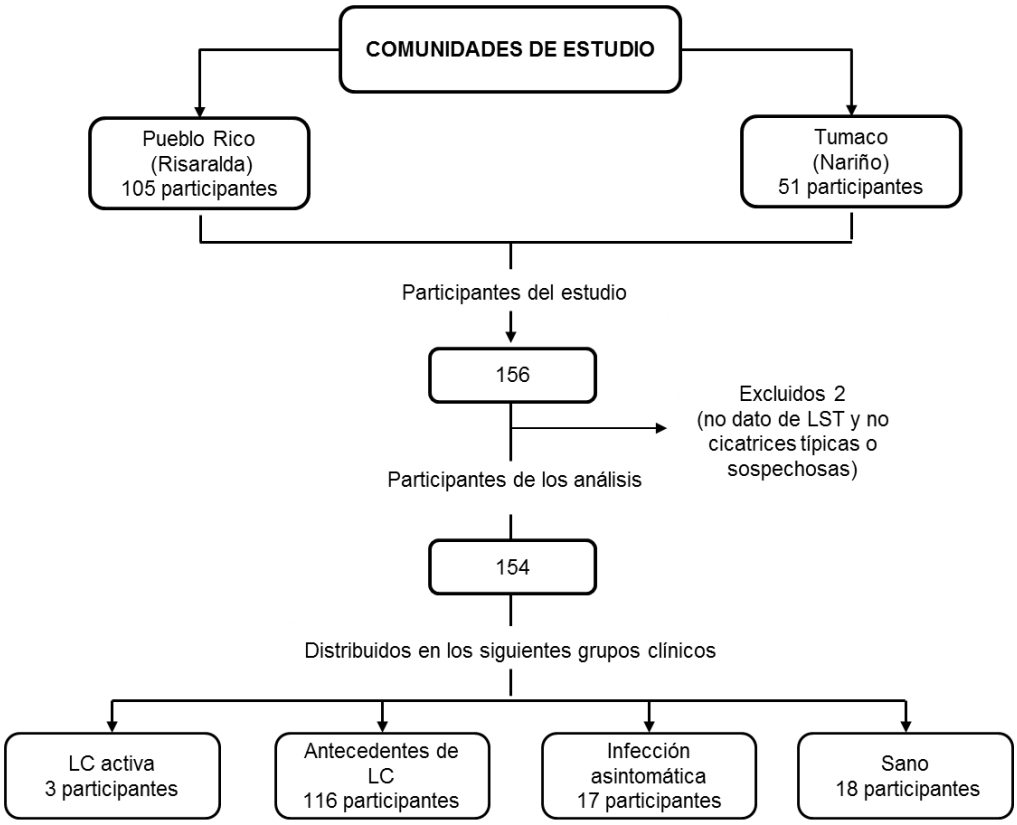


Figura 11. Distribución de los participantes de estudio por grupos clínicos. (LC: Leishmaniasis cutánea, LST: Prueba de Montenegro)

Como se muestra en la Tabla 5, el 74% de la población de estudio presentó evidencia inmunológica de exposición previa a *Leishmania*. Del total de individuos con potencial de infección persistente (individuos con infección asintomática e individuos con antecedentes de LC, n=133), 116 individuos presentaron antecedentes de LC (LST+ y cicatrices sospechosas o compatibles(1) con leishmaniasis cutánea) y 17 individuos con infección

asintomática (LST+, sin síntomas clínicos, sin cicatrices típicas y sin historia de LC) (Figura 11). Se excluyen dos participantes de los análisis, porque no tienen dato de prueba de LST y no presentaron cicatrices típicas o sospechosas.

En los sitios de estudio, se resalta que el 75% de los participantes presentaron antecedentes de la enfermedad, sin embargo el número de participantes con LC activa, fue del 2%.

7.2 Demostración parasitológica de infección persistente en individuos con evidencia inmunológica de exposición a *Leishmania.*

Para la detección molecular de *Leishmania* se obtuvieron muestras de sangre e hisopados de mucosas nasal, conjuntiva y amígdala de los participantes. Se obtuvieron y analizaron un total de 647 muestras. La calidad del ADN extraído de las muestras de estudio se evaluó con una PCR para el gen *GAPDH* humano, donde de las 647 muestras, 504 (78%) fueron *GAPDH* positivas. Al menos una muestra de cada participante fue *GAPDH* positiva. De las 143 muestras *GAPDH* negativas el 62% correspondió a muestras de aspirado de cicatriz, seguido de muestras de hisopado de conjuntiva (33%). Las muestras *GAPDH* negativas fueron excluidas de los análisis, dado que la calidad de ADN no fue la adecuada, para las muestras de aspirados de cicatriz, todas se excluyeron de los análisis porque presentaron *GAPDH* negativo.

La evidencia de persistencia de *Leishmania* se obtuvo a través de la detección del kADN mediante PCR/*Southern Blot* (SB) del kADN en las muestras clínicas de cada uno de los participantes del estudio.

En la Figura 12 se observa una imagen representativa del *Southern blot* de un grupo de muestras de hisopados de mucosas y monocitos sanguíneos de participantes con antecedentes de la enfermedad. Se observa la positividad de la PCR/SB del kADN, al definirse una banda a la altura de la sonda de 700 pb de kADN de *L. panamensis* LS94.

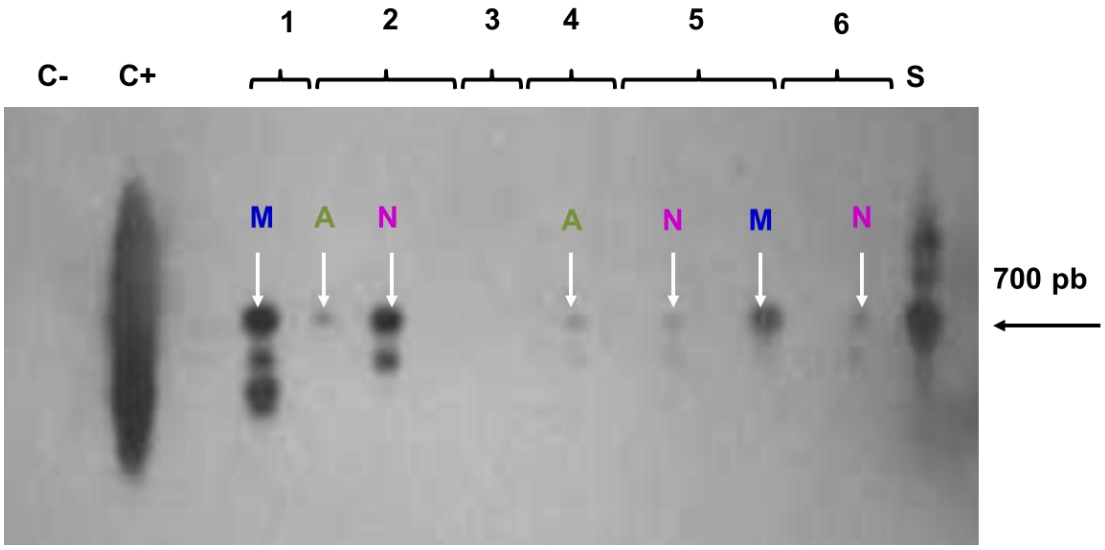


Figura 12. *Southern blot* del ADN de muestras de hisopados de mucosas y monocitos de seis individuos con antecedentes de leishmaniasis cutánea del municipio de Pueblo Rico (Risaralda). C-: Control negativo; C+: Control positivo; M: Monocitos; A: Hisopado de amigadlas; N: Hisopado de mucosa nasal y S: Sonda de *L. panamensis*. Las flechas blancas, representan la hibridación de la sonda con el ADN transferido en la membrana. Las bandas menores a los 700 pb, corresponden a amplificaciones inespecíficas del kADN tras verificación por secuenciación.

La proporción de individuos con evidencia molecular de infección persistente fue del 42% (Tabla 6), siendo más frecuente en los participantes con historia previa de LC (51 de 116), que en los individuos con infección asintomática (5 de 17). Diecinueve individuos presentaron más de una muestra kADN positiva. También se detectó el kADN, en tres de 18 participantes sanos, con LST negativo y en los tres participantes con LC activa, que se incluyeron como controles positivos.

Tabla 6. Detección de kADN de *Leishmania* en los diferentes grupos clínicos y sitios de estudio.

Grupo clínico		Pueblo Rico	Tumaco	Total[b] n/N (%)
		n/N[a] (% de individuos kADN +)	n/N[a] (% de individuos kADN +)	
Infección persistente	Antecedentes de LC	37/80 (46)	14/36 (39)	51/116 (44)
	Asintomáticos (LST +)	2/5 (40)	3/12 (25)	5/17 (29)
Subtotal Infección persistente		39/85 (46)	17/48 (35)	56/133 (42)
Sano (LST-)		2/15 (13)	1/3 (33)	3/18 (17)
LC activa		3/3 (100)	0/0 (0)	3/3 (100)
Total		44/103 (43)	18/51 (35)	62/154 (40)

[a] n/N: Número de individuos con al menos una muestra kADN positiva/Número total de participantes en cada zona de estudio.
[b] Total n/N: Número de individuos con al menos una muestra kADN positiva en sitios de estudio/Número total de participantes en los dos sitios de estudio.

La frecuencia de positividad de kADN en los diferentes tejidos muestreados en los participantes con infección subclínica fue mayor en las muestras de monocitos sanguíneos (26%, 33 de 127), que en los hisopados de las mucosas, en donde la frecuencia de positividad fue del 14% para la mucosa nasal (21 de 145), 14% para la amígdala (18 de 129) y 7% para la conjuntiva (6 de 82).

A nivel de sitios de estudio se observa una diferencia en el tipo de muestra con mayor frecuencia de positivad en la PCR/SB del kADN. En Pueblo Rico la muestra con mayor porcentaje de positividad fueron los monocitos sanguíneos y en Tumaco los hisopados de conjuntiva y de amígdala (Figura 13).

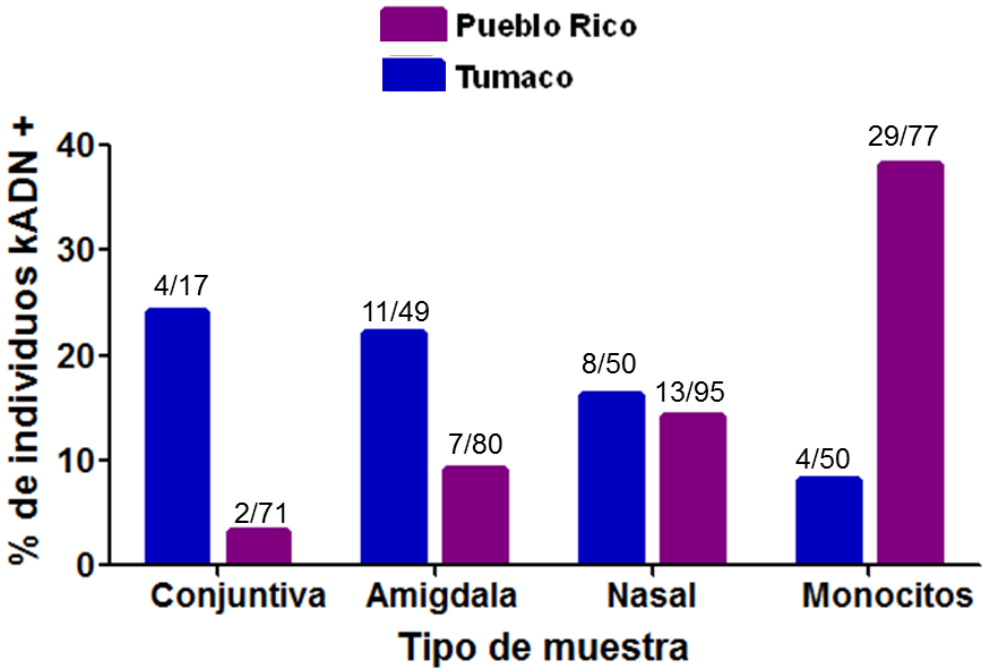


Figura 13. Distribución de muestras kADN positivas por tipo de muestra. El porcentaje de las muestras kADN positivas fue calculado basado en el total del número de muestras analizadas por tejido, los números sobre cada columna representan el N° de muestras positivas para el kADN/Total de muestras por tejido.

7.3 Persistencia de *Leishmania* y cuantificación de carga parasitaria en individuos con infección persistente.

La detección del kADN de *Leishmania* mediante PCR/SB no demuestra necesariamente viabilidad del parásito. Por esto también se evaluó la presencia y se cuantificaron los transcritos del gen 7SL ARN de *Leishmania*(41), con el fin de establecer si en individuos con evidencia inmunológica y molecular de infección subclínica, el parásito persiste silentemente.

Se extrajo ARN de todas las muestras kADN positivas (n=84), de 62 participantes del estudio. La calidad del ARN se evaluó mediante amplificación de los transcritos del gen humano de la proteína de unión a la caja TATA (TBP) a través de qRT-PCR. La amplificación de TBP fue exitosa en 76 (90%) de las 84 muestras. Se amplificó el

transcrito del 7SL ARN en 48 muestras, obtenidas de 33 participantes con infección subclínica (40 muestras), dos participantes sanos (dos muestras) y de los tres participantes con LC activa (seis muestras). Esto permitió establecer la viabilidad de *Leishmania* en en tejidos aparentemente sanos en el 23% (35 de 151) de la población sin lesiones activas. Veintiocho muestras fueron TBP positivas y 7SL ARN negativas y ocho muestras fueron TBP negativas y 7SL ARN negativas. Los monocitos sanguíneos presentaron la mayor frecuencia de positividad para 7SL ARN (23 de 33), seguida del hisopado de amígdala (nueve de 18), hisopado de mucosa nasal (ocho de 21) e hisopado de conjuntiva (dos de seis).

La carga parasitaria en monocitos sanguíneos y en hisopados de mucosas fue similar (Figura 14A), con un rango de 0,0001 a 22 parásitos por reacción. Sin embargo, la carga parasitaria normalizada para el número de células humanas obtenidas en cada muestra fue mayor en los hisopados de mucosa, en comparación con los monocitos sanguíneos, debido a que fue mayor la cuantificación absoluta de células humanas en las muestras de monocitos sanguíneos (Figura 14B-C).

Para las muestras que fueron TBP positivas/7SL ARN negativas, se estimó la carga parasitaria basado en los volúmenes de reacción y el número de copias del minicírculo del kADN (10.000 copias por parásito)(76) y del 7SL ARN (250 copias por parásito)(81). Basada en una estimación de máxima verosimilitud(92), se calculó un número de 0.0001 parásitos por reacción y 0.00357 parásitos por muestra.

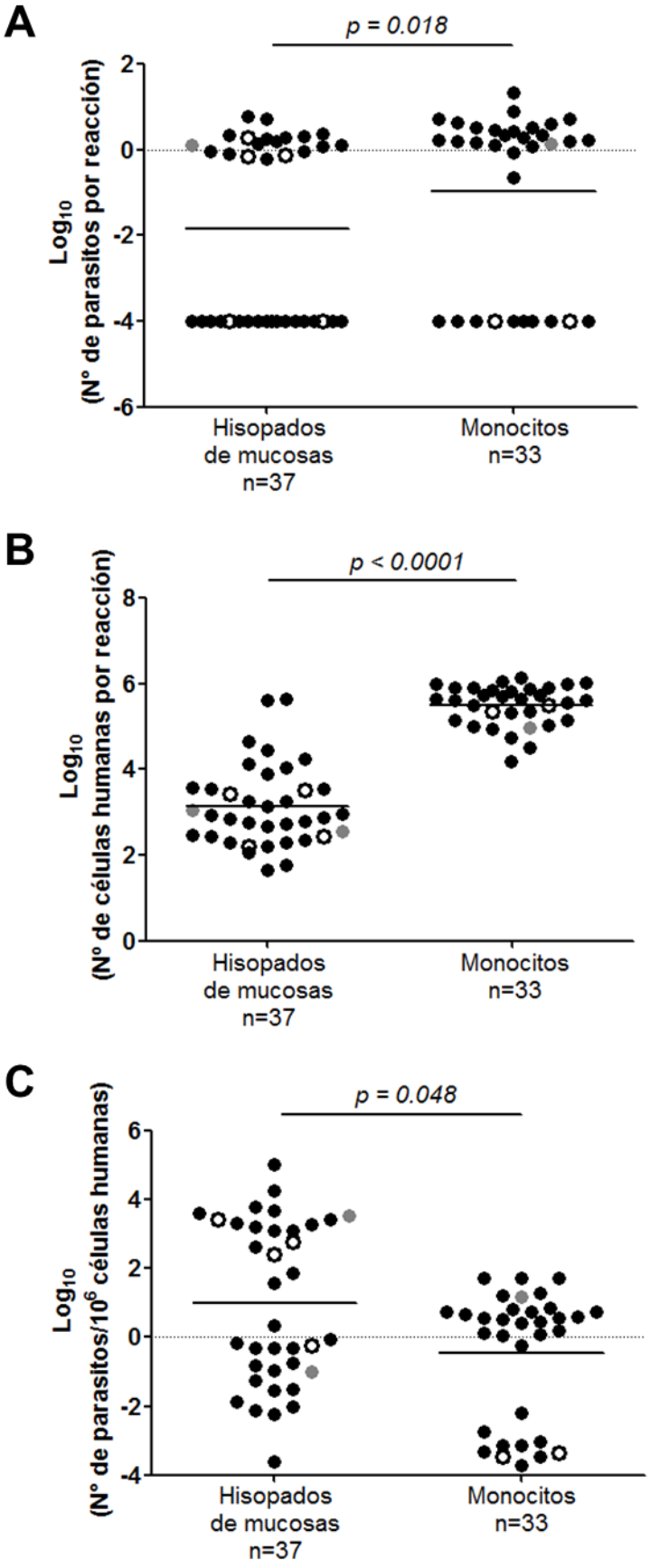

A
p = 0.018
Log10
(Nº de parasitos por reacción)
2
0
-2
-4
-6
Hisopados de mucosas n=37
Monocitos n=33
B
p < 0.0001
Log10
(Nº de células humanas por reacción)
8
6
4
2
0
Hisopados de mucosas n=37
Monocitos n=33
C
p = 0.048
Log10
(Nº de parasitos/10^6 células humanas)
6
4
2
0
-2
-4
Hisopados de mucosas n=37
Monocitos n=33

Figura 14. Viabilidad de *Leishmania* y carga parasitaria en muestras kADN positivas de participantes sin leishmaniasis cutánea activa. Se analizan los datos de las muestras TBP positivas y 7SL ARN positivas (42) y las muestras TBP positivas y 7SL ARN negativas (28). Cuantificación absoluta de *Leishmania* mediante la amplificación 7SL ARN (A), células humanas por amplificación de TBP (B), y carga parasitaria relativa normalizada para el número de células humanas por muestra (C) obtenidos a partir de muestras de hisopados de mucosa nasal, amígdalas y de conjuntivas (n = 37) y de monocitos sanguíneos (n = 33). Los círculos negros representan los participantes con antecedentes de LC; los círculos abiertos, individuos con infección asintomática y los círculos grises, individuos sin evidencia clínica de historia de LC y LST-. Se muestran los valores p obtenidos de pruebas de Mann-Whitney de dos colas.

7.4 Genotipificación del kADN, una herramienta para explorar la variabilidad o diversidad genética de *Leishmania* en la infección subclínica.

7.4.1 Diseño, sensibilidad y especificidad del método.

La caracterización de parásitos asociados a infección asintomática está limitada, entre otros, por las bajas cargas parasitarias encontradas en tejidos aparentemente sanos (Figura 14), y por la dificultad en el aislamiento de los microorganismos. Con el fin de sobrellevar esta limitante, se desarrolló un método de análisis de diversidad genética de *Leishmania* basado en la amplificación y secuenciación de la región conservada del kADN (Figura 15).

La región conservada del kADN, presenta tres bloques conservados y unas regiones polimórficas, no hipervariables, entre los bloques, que pueden ser explotadas para análisis de diversidad genética(11). La variabilidad entre especies y entre cepas de una misma especie en las secuencias flanqueantes de los bloques conservados 1 y 2 (Figura 15), sugiere una potencial utilidad de esta secuencia para análisis de diversidad genética en *Leishmania.*

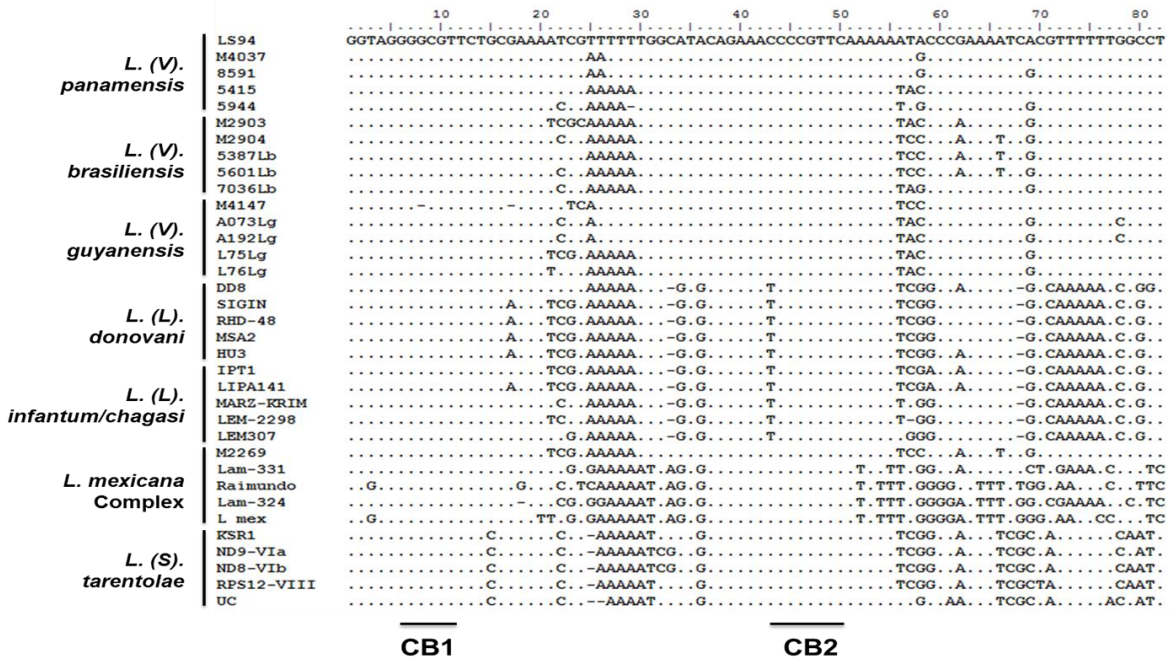


Figura 15. Polimorfismos en las regiones inter-bloque del kADN de *Leishmania*. Fueron analizadas secuencias de cinco cepas de siete especies de *Leishmania* por alineamiento múltiple, usando ClustalW. BC: Bloque conservado.

En colaboración con Rafael Góngora, Asistente de Investigación del CIDEIM, se diseñaron diferentes paneles de cebadores (datos no mostrados en este trabajo) sobre el kADN de *Leishmania*, que permitieron amplificar tanto el minicírculo completo como la región conservada. En el proceso de estandarización del sistema de la PCR anidada, se definió la combinación de cebadores tanto externos como internos (Figura 10), que permitiera la amplificación del blanco en muestras con baja carga parasitaria. El límite de detección de la primera PCR fue de 1,33 x 10^{-1} parásitos y de la PCR anidada fue de 1,33 x 10^{-3} parásitos por reacción, sugiriendo su utilidad para el análisis de muestras con bajas cargas parasitarias como aquellas provenientes de individuos con infección asintomática o subclínica persistente (Figura 16).

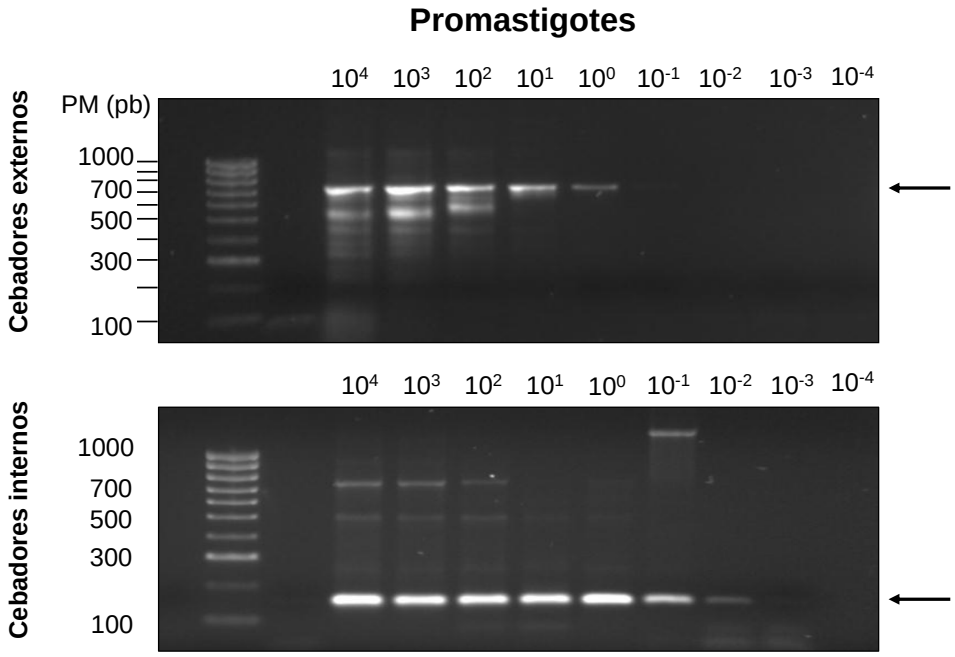


Figura 16. Sensibilidad de la PCR anidada para el kADN de *Leishmania*. Curva de sensibilidad con diluciones seriadas de ADN de promastigotes, desde 1,33 x 10^4 a 1,33 x 10^{-4}. En el panel superior se muestra la sensibilidad para el PCR con los cebadores externos y en el panel inferior la sensibilidad para la PCR anidada. Las flechas indican los productos esperados de 700bp y 180 pb para la PCR externa e interna, respectivamente. PM: Peso molecular.

Dado que esta metodología fue diseñada para el análisis de muestras clínicas, evaluamos la especificidad de la herramienta y el potencial de reactividad cruzada con ADN humano utilizando muestras de la línea celular THP1 y PBMCs de un donante sano. Se confirmó que los cebadores usados para la PCR anidada, no amplifican ADN humano bajo las condiciones establecidas (Figura 17).

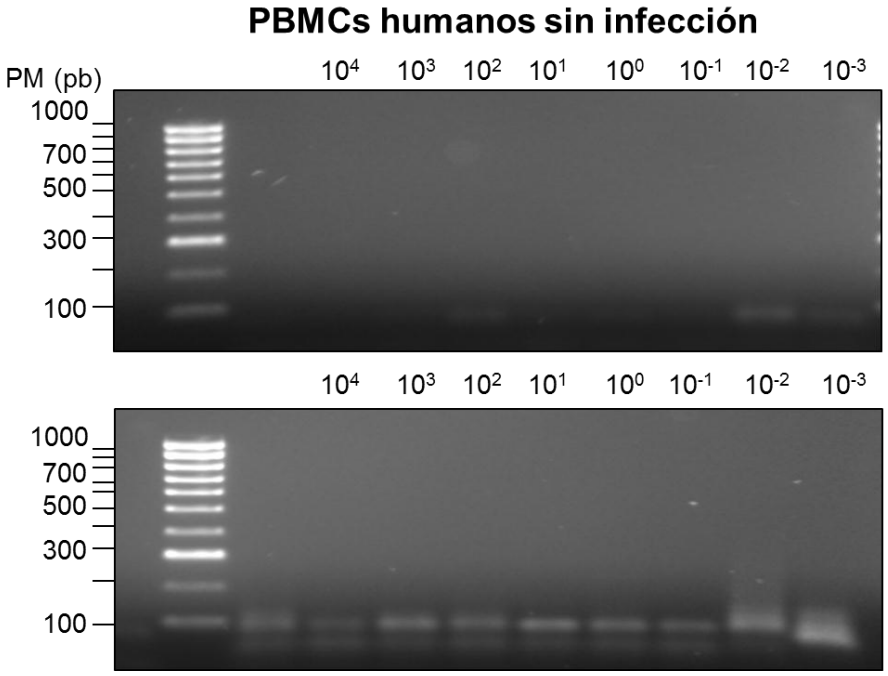


Figura 17. Especificidad de la PCR del kADN de *Leishmania* en PBMCs de donantes sanos. Curva de especificidad con diluciones seriadas de ADN de PBMCs sin infección, desde 1,33 x 10^4 a 1,33 x 10^{-3}. En el panel superior se muestra la especificidad para la PCR con los cebadores externos y en el panel inferior la especificidad para la PCR anidada. PM: Peso molecular.

Es conocido que existe variabilidad en la población de minicírculos de kADN aun dentro de un mismo parásito(79). Con el fin de conocer si el proceso de amplificación y secuenciación del kADN era reproducible, y establecer si el proceso de PCR introducía variabilidad en la secuencia amplificada, se realizó un duplicado técnico de la PCR anidada y posterior secuenciación en muestras de ADN de 13 cepas de *L*. (*Viannia*) (Figura 18). De acuerdo al resultado obtenido, la PCR y el proceso de secuenciación pueden introducir en la secuencia un cambio de máximo una base (frecuencia esperada teniendo en cuenta la tasa de error de la Taq Polimerasa, observado en tres de las 13 secuencias analizadas. Estos resultados confirman la reproducibilidad de la herramienta obteniendo homologías de secuencia entre el 99 y 100%.

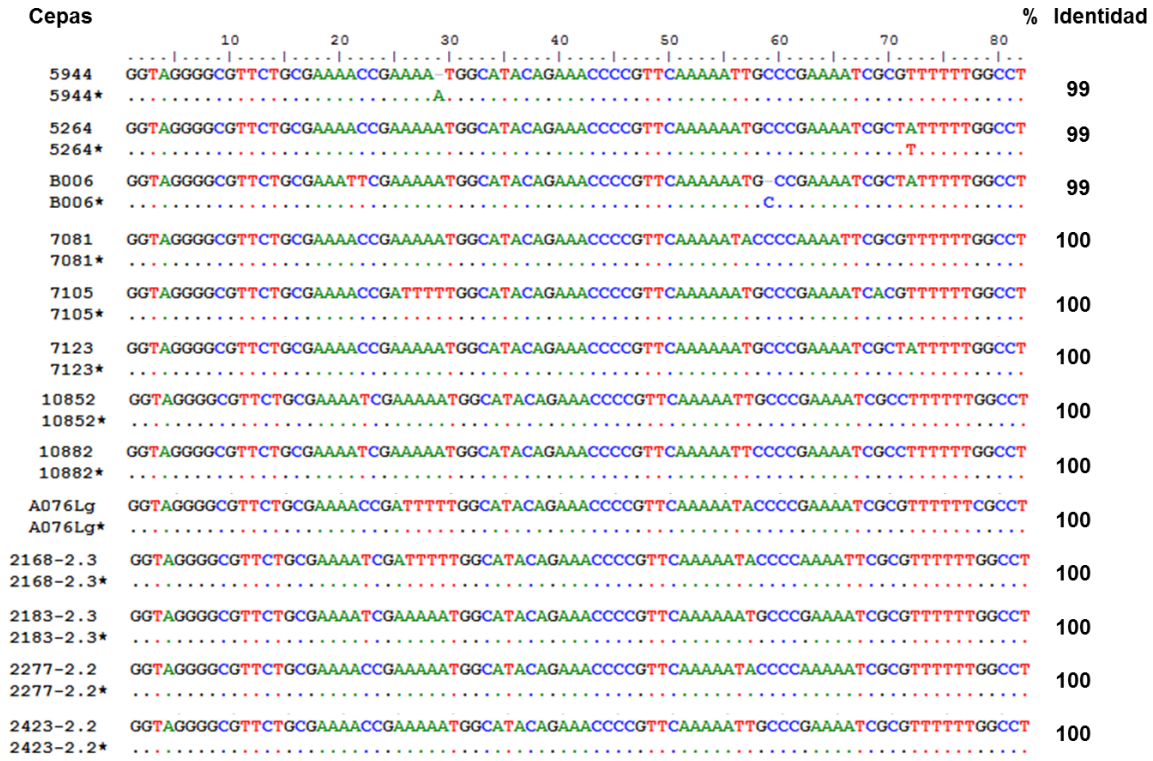


Figura 18. Re-secuenciación del kADN en cepas clínicas de *L.* (*Viannia*). Los códigos de las cepas están denotados en el extremo izquierdo de los alineamientos. "*" identifica a la réplica técnica de PCR y reacción de secuenciación de cada cepa. El alineamiento de los pares de secuencias se realizó en BioEdit v7.2.5.

7.4.2 Implementación de la secuenciación del kADN para el análisis de variabilidad o diversidad genética de cepas clínicas de *Leishmania* (*Viannia*).

Para evaluar la utilidad de la secuenciación de la región conservada del kADN en el análisis de diversidad genética de *Leishmania,* se realizó un análisis comparativo con tipificación de microsatélites multilocus (MLMT), una de las metodologías moleculares más robustas para el análisis de diversidad genética(11,91,93), utilizando aislados clínicos y cepas de referencia.

Se analizaron 46 cepas de *Leishmania*, obtenidas del BioBanco de CIDEIM, 34 cepas de *L. panamensis*, nueve de *L. guyanensis* y tres cepas de referencia (*L. panamensis* MHOM/PA/1971/LS94, *L. braziliensis* MHOM/BR/1975/M2903 y *L. guyanensis* MHOM/BR/1975/M4147). Se realizó un análisis comparativo de las distancias genéticas obtenidas en la secuenciación del kADN y los perfiles de MLMTs (Figura 19).

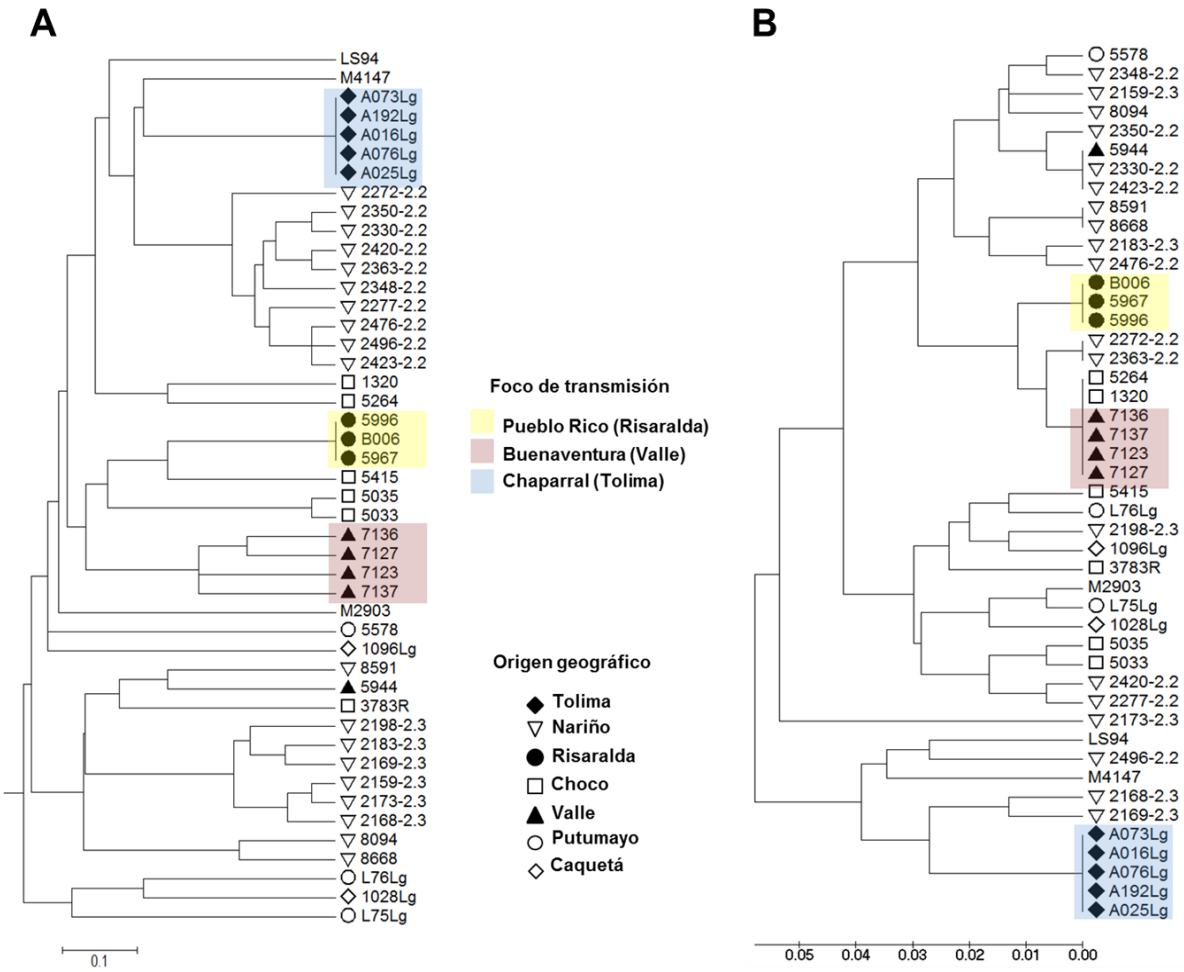


Figura 19. Análisis de la diversidad genética utilizando genotipificación de kADN, permite la agrupación de las cepas aisladas dentro de focos de transmisión durante los brotes de infección. Dendogramas construidos con UPGMA, distancias genéticas calculadas a partir de datos de MLMT (A) y genotipificación de kADN (B). Los dendogramas se construyeron también por *Neighbor joining* (imágenes no mostradas), dando agrupaciones similares. Las figuras geométricas representan el origen geográfico de las cepas en el territorio colombiano. Los grupos sombreados representan las cepas aisladas de los focos de transmisión durante brotes de infección.

En el grupo de cepas analizadas se incluyeron tres grupos de cepas aisladas de pacientes que provienen de un mismo foco de transmisión, delimitado por tiempo y ubicación: tres cepas de *L. panamensis* aisladas de participantes con LC activa del municipio de Pueblo Rico obtenidas en el año 2012 (cepas identificadas como 5996, B006 y 5967), cinco cepas de *L. guyanensis* aisladas de pacientes del municipio de Chaparral, en el departamento del Tolima durante el brote registrado en el año 2006 (A073, A192,

A016, A076 y A075), y cuatro cepas de *L. panamensis* provenientes de pacientes del municipio de Buenaventura, departamento del Valle, obtenidas en el año 2012 (7136, 7127, 7123 y 7137). Se observó que se conserva la agrupación de las cepas aisladas de los focos de transmisión, tanto en secuenciación de kADN, como en MLMT (Figura 19). Sin embargo otros grupos como los representados por los zimodemas 2.2 y 2.3 de *L. panamensis*, no se agruparon por la genotipificación del kADN.

7.4.3 Genotipificación del kADN en individuos con infección subclínica y en flebotomíneos colectados de los sitios de estudio.

La PCR anidada se realizó sobre todas las muestras kADN positivas de los participantes de este estudio (n= 84) y de los flebotomíneos colectados (n=24). Se obtuvo un producto de amplificación y una secuencia de buena calidad en 50 de ellas, correspondientes a 28 participantes con infección subclínica (26 con antecedentes de LC y dos con infección asintomática) y en 18 de los flebotomíneos con positividad del kADN.

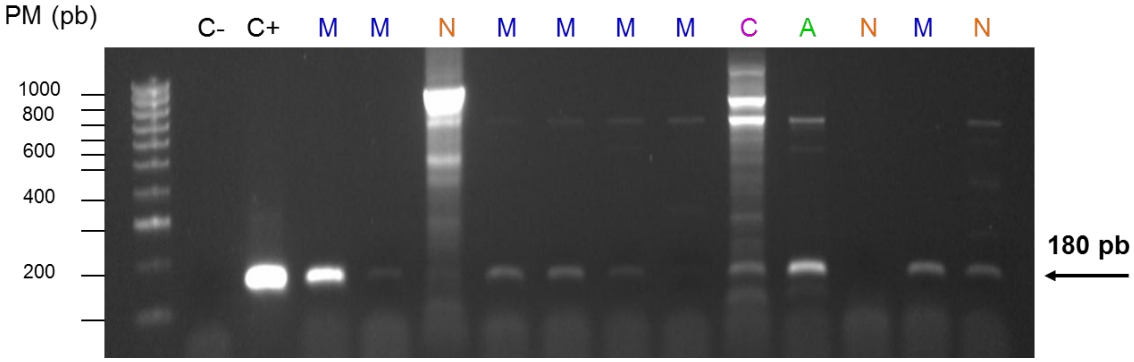


Figura 20. PCR anidada del kADN con los cebadores internos, en muestras de 12 participantes del estudio (10 de Pueblo Rico y dos de Tumaco). C-: Control negativo; C+: Control positivo, *L. panamensis* LS94; M: Monocitos; N: Hisopado de mucosa nasal; C: Hisopado de conjuntiva y A: Hisopado de amígdala. La flecha representa el tamaño del producto de amplificación del PCR anidado, de aproximadamente 180 pb.

De las muestras de los individuos con infección persistente, 20 corresponden a muestras de monocitos sanguíneos, cinco a hisopados de amígdalas, cuatro a hisopados de mucosa nasal y tres de conjuntiva (una imagen representativa de los productos de amplificación del PCR anidado en muestras clínicas se presenta en la Figura 20).

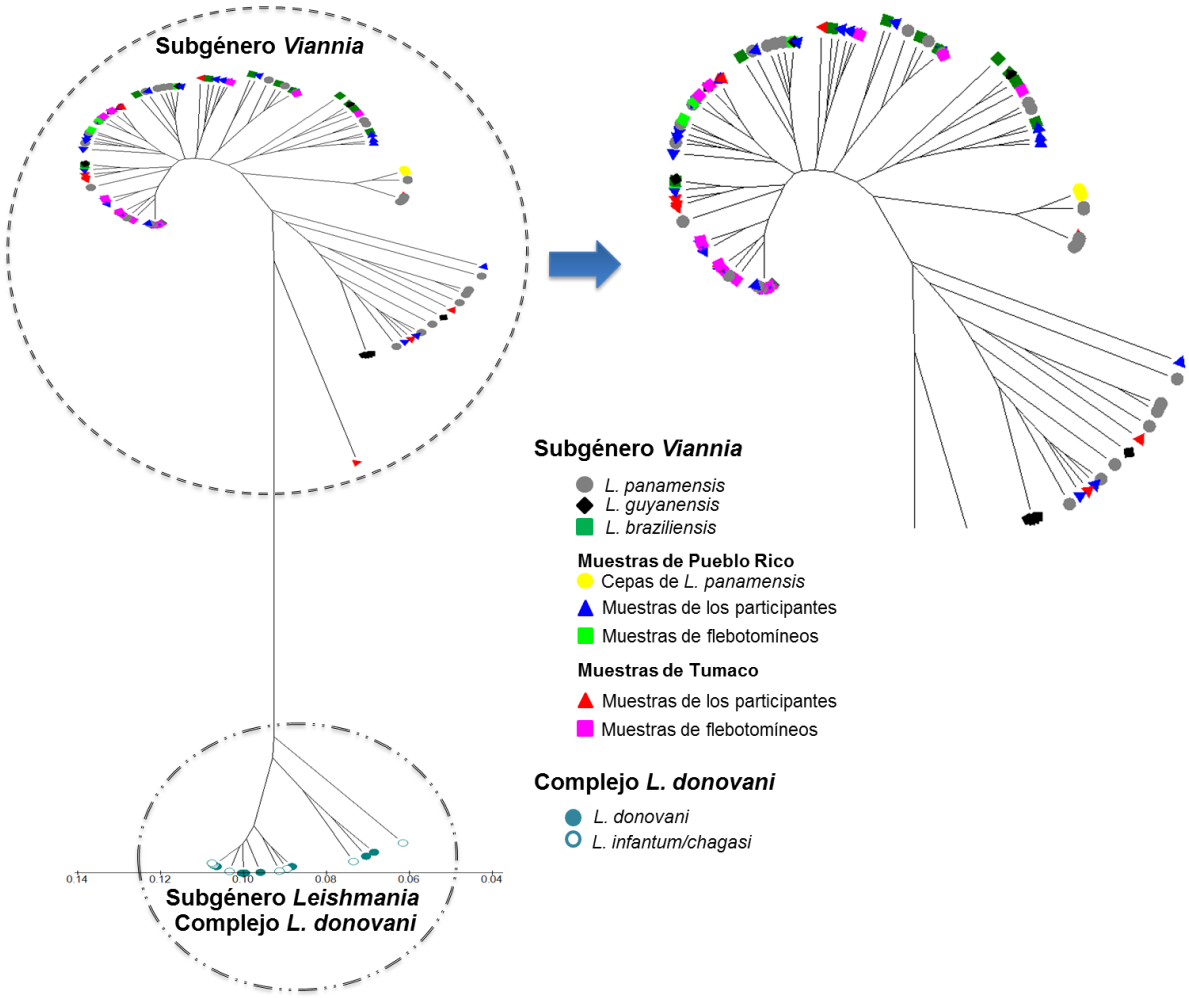


Figura 21. Análisis de la diversidad genética de *Leishmania* en individuos con infección subclínica y flebotomíneos con infección por *Leishmania*. Las distancias genéticas se estimaron por agrupación jerárquica utilizando el modelo Jukes –Cantor, con distribución G y el método UPGMA. Las secuencias de las tres cepas de *L. panamensis* aisladas en Pueblo Rico se representan como círculos amarillos llenos. Las secuencias de las muestras obtenidas de los participantes del estudio se muestran en triángulos y las de los flebotomíneos en cuadrados.

Para el análisis de diversidad genética se incluyeron además de las secuencias de las muestras de los participantes del estudio, las secuencias de las tres cepas aisladas de los pacientes con LC activa, secuencias de 33 cepas de *L. panamensis*, 10 de *L. guyanensis* y 12 de *L. braziliensis* (Tabla 2). Para efectos de análisis, se utilizaron como

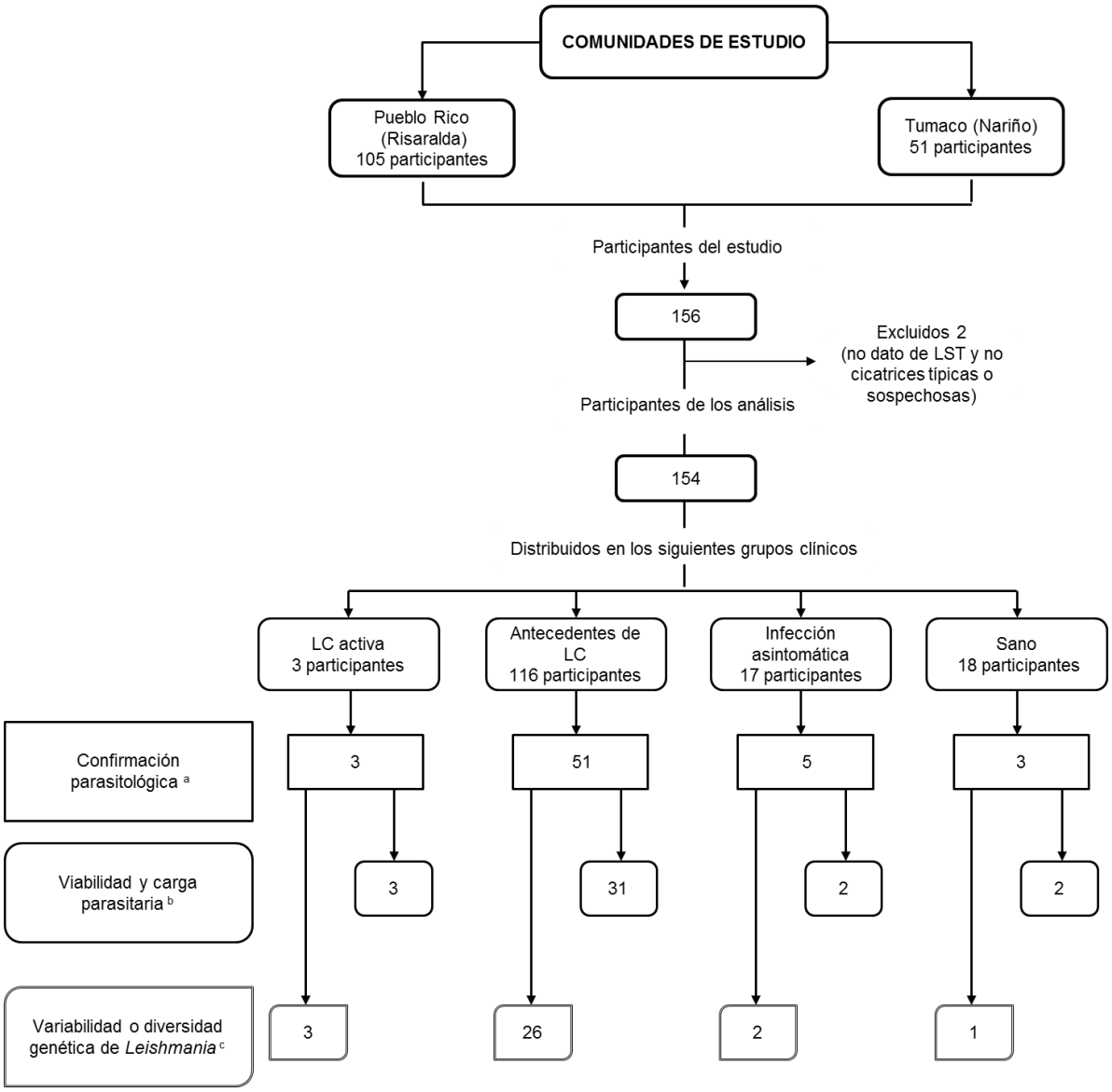
un grupo externo ("outgroup") las secuencias de nueve cepas de *L. donovani* y ocho de *L infantum/L. chagasi,* obtenidas del GenBank (Tabla 3).

Como se muestra en la Figura 21, las distancias genéticas revelan un agrupamiento de las cepas de *L.* (*Viannia*) y de las muestras clínicas de los participantes del estudio con infección persistente y los flebotomíneos en el clúster del subgénero *Viannia.* Cuatro de los flebotomíneos con secuencias positivas (una *Warileya rotundipennis*, una *Nyssomyia trapidoi* y dos *Psychodopygus panamensis*) fueron colectados en el municipio de Pueblo Rico, mientras que las 14 restantes se colectaron en el municipio de Tumaco (14 *Psychodopygus panamensis*).

No fue posible discernir alguna relación entre las cepas circulantes de pacientes con infección activa (círculos amarillos, Figura 21) en Pueblo Rico y las muestras clínicas de los participantes con infección subclínica persistente.

7.5 Resumen de los resultados encontrados en las comunidades de estudio.

La magnitud de la población con evidencia inmunológica de exposición a *Leishmania* en los sitios seleccionados para el estudio, alcanza un 86% (133/154), en contraste con los caso activos que solo representan un 2% (3/154) (Figura 22). El uso de metodologías moleculares, para el abordaje de la infección asintomática y subclínica y de su posible papel en la transmisión, evidenció que en el 42% (56/133) de los participantes con evidencia inmunológica de exposición a *Leishmania*, fue posible confirmar la presencia del parásito persistente. De ellos, en el 59% (33/56) se presenta evidencia de viabilidad parasitaria y se cuantificó la carga parasitaria, y en el 50% (28/56) se obtuvo una secuencia del kADN del parásito. Estos resultados demuestran la factibilidad de estudiar molecularmente las poblaciones de parásitos circulantes en individuos con infección subclínica y resalta un reservorio de parásitos viables con potencial contribución en la transmisión y endemicidad de la leishmaniasis cutánea.



[a] Participantes con al menos una muestra positiva para PCR/SB del kADN de *Leishmania.*
[b] Participantes con al menos una muestra positiva para qRT PCR de 7SL ARN de *Leishmania*.
[c] Participantes con al menos una secuencia obtenida de las muestras PCR/SB del kADN positivas.

Figura 22. Confirmación, carga, viabilidad y diversidad de *Leishmania* en los participantes del estudio. LC: Leishmaniasis cutánea.

8. DISCUSIÓN.

Las infecciones asintomáticas son comunes a todos los agentes infecciosos, constituyendo un componente variable del espectro de desenlaces clínicos(94–97). La frecuencia de estas infecciones asintomáticas varía de acuerdo con la patogenicidad del agente y la susceptibilidad de la población expuesta. El impacto de la infección asintomática en la transmisión y endemicidad de leishmaniasis cutánea causada por especies del subgénero *Viannia* ha sido poco estudiada. Investigaciones sobre la prevalencia de la infección basadas en pruebas inmunológicas (conversión de la prueba de Montenegro), revelaron que el 90% de las infecciones en un foco de transmisión de *L. panamensis* en el municipio de Tumaco, Colombia, eran asintomáticas(1), mientras que sólo el 17% de las infecciones fueron asintomáticas en un foco de transmisión de *L. peruviana* en Perú(2). Estos resultados demuestran que aunque variable, la magnitud de individuos con infección asintomática en focos endémicos de transmisión es alta. Sin embargo, las pruebas de reactividad inmunológica no discriminan entre exposición previa al parásito o infección persistente(9). Con el fin de dar respuesta a este vacío en el conocimiento, en este estudio buscamos demostrar parasitológicamente la persistencia de *Leishmania* en individuos con evidencia inmunológica de infección asintomática y en individuos con antecedentes de LC, y proveer herramientas moleculares para explorar su potencial rol en la transmisión y endemicidad de la leishmaniasis cutánea causada por *L.* (*Viannia*).

En este estudio, la reactividad a LST proporcionó un marcador inmunológico de exposición a *Leishmania* en individuos con infecciones inicialmente asintomáticas o infección persistente siguiente a una resolución clínica de la leishmaniasis cutánea. La reactividad a leishmanina inducida por la infección, ya sea sintomática o asintomática es normalmente de larga duración(98). La confirmación parasitológica de infección por *Leishmania* ha sido tradicionalmente dada por la detección de amastigotes en muestras clínicas, o el aislamiento del agente causal de las lesiones(13). No obstante, la sensibilidad de estos métodos limita la confirmación parasitológica de infección asintomática dada las bajas cargas parasitarias esperadas(4,35). La detección de

moléculas de ADN y ARN del parásito provee evidencia de presencia y viabilidad, respectivamente(41,55). A diferencia de la estabilidad y la larga vida media del ADN, la labilidad y la corta vida media del ARN ha permitido correlacionar su presencia con la viabilidad de los organismos(11,39). En este estudio, la amplificación del kADN y la detección moléculas de ARN del transcrito del gen 7SL ARN del parásito evidencian la presencia y viabilidad de *Leishmania,* dando una demostración molecular y parasitológica de infección asintomática y subclínica persistente. En este estudio se detectó la presencia de *Leishmania* en el 42% de los individuos con infección asintomática o con antecedentes de LC, y confirmamos su viabilidad en el 59% de estos participantes. Aunque la relevancia de las infecciones subclínicas para la salud pública es poco conocida(99), la detección de *Leishmania* en ausencia de la enfermedad en residentes de focos endémicos de transmisión de leishmaniasis cutánea, da una idea de la magnitud de la población humana que está albergando los parásitos. Sin embargo, teniendo en cuenta que el muestreo que realizamos se llevó a cabo sólo una vez, y que la distribución de los parásitos en los tejidos y la carga parasitaria tienden a variar con el tiempo(100) y con el estado de salud de cada individuo, el población infectada es probablemente subestimada. Estudios prospectivos permitirán establecer la real magnitud de individuos con infección persistente.

La importancia del estudio de las manifestaciones subclínicas de la infección por *Leishmania* radica en que estos individuos pueden representar una población a riesgo de desarrollar la enfermedad por activación de la infección, y además actuar como un posible reservorio oculto y amplio de parásitos potencialmente disponibles a vectores antropofílicos(35). En enfermedades infecciosas de tipo bacteriano, infecciones asintomáticas se han vinculado a futuras manifestaciones sintomatológicas con componentes de cronicidad y recurrencia(95,96). De forma similar, la leishmaniasis mucocutánea ha sido considerada como una manifestación crónica secundaria de la leishmaniasis cutánea en América Latina(101), o incluso una manifestacion sintomatica de una infeccion asintomatica persistente(102). La evidencia directa de la reactivación, como una causa de la persistencia de leishmaniasis, fue proporcionada por análisis bioquímicos y genotípicos de las cepas de *Leishmania* aisladas a partir de lesiones primarias y de lesiones que aparecen después de la resolución completa de las lesiones primarias(103). Estudios poblacionales en áreas endémicas para leishmaniasis cutánea han identificado

la reactividad a LST, además de la presencia de cicatrices compatibles con la historia de leishmaniasis cutánea, como factores de riesgo importantes para el desarrollo de nuevas lesiones activas(1,2,8). Nuestros resultados demuestran la presencia a largo plazo de *Leishmania* viable en monocitos sanguíneos y tejidos de mucosas en individuos con infección asintomática y en individuos con antecedentes de LC, sugiriendo la persistencia indefinida de *Leishmania* en el hospedero humano, tanto después de la infección sintomática como de la asintomática, sin causar una patología asociada a su presencia(1,8,37,104). Las diferencias encontradas en las frecuencias de detección de *Leishmania* en los diferentes tipos de tejidos en cada uno de los sitios de estudio, siendo monocitos sanguíneos más frecuentemente positivos en Pueblo Rico y tejidos mucosos en Tumaco, sugiere potenciales diferencias en el tropismo de las cepas circulantes en los diferentes focos endémicos.

A través de modelos matemáticos, Miller et. al., han demostrado recientemente que una baja proporción de individuos con infección asintomática con altas parasitemias (3,2%) en áreas endémicas para leishmaniasis visceral en Etiopía, fueron los responsables de la infección del 62% de los flebótomos(63). Estudios realizados sobre la infectividad de perros asintomáticos e incluso vacunados para *Lu. longipalpis*, el principal vector de leishmaniasis visceral en las Américas, mostraron que tanto los perros asintomáticos, como los perros vacunados, pueden ser una fuente de parásitos para los vectores(105). Adicionalmente, estudios enfocados a las iniciativas de eliminación de la malaria muestran que los portadores asintomáticos, además de estar en riesgo de desarrollar la enfermedad a través de la reactivación de la infección(106,107), pueden transmitir la infección a los mosquitos(108,109), como se evidencia en un estudio realizado sobre la contribucion de la infeccion asitomática en la transmision de la malaria donde la tasa de infeccion en *An. darlingi* fue del 1.2% para mosquitos alimentados de portadores asintomaticos y 22% de los portadores sintomaticos(110). Estos resultados apoyan la posibilidad de que las personas con infección persistente puedan ser reservorios para vectores antropofílicos en las áreas endémicas para *L.* (*Viannia*). La importancia de comprender el papel de la infección subclínica en la incidencia y transmisión de la leishmaniasis ha sido reconocida recientemente por la Organización Mundial de la Salud como un área de interés prioritario para la investigación(10).

Los estudios de diversidad poblacional de parásitos circulantes en áreas endémicas para leishmaniasis se han realizado principalmente sobre cepas aisladas de pacientes con infección activa(91,111). Sin embargo las poblaciones de *Leishmania* circulantes en los individuos con infección subclínica, que representan una proporción importante de la población endémica, son desconocidas y por ende comprender su posible contribución en la transmisión de la enfermedad se ve limitado.

Existe una restricción metodológica para la caracterización genotípica y fenotípica de parásitos causantes o asociados a la infección asintomática, dada la baja carga parasitaria de las muestras clínicas(100). Hasta la fecha, los estudios de diversidad y caracterización genética en *Leishmania*, han implementado metodologías como la tipificación multilocus de secuencias (MLST)(112) y la tipificación multilocus de microsatélites (MLMT)(93,113,114). No obstante, estas así como otras metodologías basadas en la amplificación de blancos moleculares, han sido implementables cuando se dispone de altas cantidades de ADN del parásito(11). Para abordar esta limitante, se desarrolló una estrategia para el análisis de la diversidad genética a partir de la genotipificación de la región conservada del kADN de *Leishmania*, haciendo uso de una PCR anidada y posterior secuenciación del producto de amplificación. Las regiones polimórficas dentro de los bloques conservados de los minicírculos del kADN de *Leishmania* fueron seleccionadas como blancos para el análisis. La selección de este blanco molecular se basa en dos características: 1) el número de copias del kADN (>10.000 copias por parásito)(76) permite diseñar un método de alta sensibilidad y las regiones polimórficas entre los bloques conservados no son hipervariables, a diferencia de la región variable del kADN(76), lo que permite establecer relaciones y diferencias genotípicas.

La sensibilidad de esta estrategia permitió la amplificación y secuenciación del kADN de *Leishmania* en el 4% de las muestras de hisopados de mucosas y el 17% de las muestras de monocitos sanguíneos, en los individuos con evidencia inmunológica de la infección persistente. La genotipificación del kADN de los parásitos en muestras de estos individuos demuestra la factibilidad de abordar la caracterización genotípica de *Leishmania* en infecciones asintomáticas. Previos estudios de filogenia molecular en tripanosomátidos apoyan la utilidad del kADN en la identificación de parásitos a nivel de

género y/o subgénero(115,116). En el análisis comparativo de genotipificación por kADN y MLMT en un grupo de cepas de *L.* (*Viannia*) mostró que los grupos formados por las cepas aisladas de focos de transmisión de la enfermedad (delimitados por un tiempo y un espacio definido), se conservaban en las dos metodologías. Sin embargo, cepas fenotípicamente diferentes (cepas de *L. panamensis* pertenecientes al zimodemas 2.2 y 2.3) que agruparon diferencialmente por MLMT no lo hicieron del mismo modo por genotipificación del kADN, potencialmente como resultado de una mayor tasa de evolución del kADN en comparación con la de los microsatélites para MLMT. La micro-heterogeneidad de secuencias de kADN(117,118) y la diferencia del tamaño del genoma del parásito que se cubre con análisis por MLMT vs. genotipificación del kADN podrían impedir discernimiento de relaciones entre parásitos potencialmente relacionados. La metodología desarrollada reveló que las poblaciones circulantes de parásitos en las áreas endémicas, tanto de los participantes con infección persistente, como de los flebotomíneos, pertenecen al subgénero *Viannia.*

Los análisis de distancias genéticas no permitieron establecer relaciones entre las cepas aisladas de individuos con la enfermedad activa, los flebotomíneos y los parásitos persistentes durante la infección subclínica. Esto puede ser debido a la variación espacio-temporal en las poblaciones de parásitos que circulan durante décadas de transmisión en los focos (ej. no es factible establecer el momento en el que individuos con infección subclínica fueron expuestos al parásito), por una limitante en el tamaño de muestra alcanzado (ej. el número limitado de casos activos (3) en el foco de transmisión de Risaralda y el número de flebotomíneos colectados), o por potenciales limitantes discriminatorias de la metodología de genotipificación. Estudios prospectivos podrían esclarecer este interrogante permitiendo el seguimiento en un tiempo determinado de esta población de individuos y establecer su relación en el ciclo de transmisión. Es posible que una combinación de herramientas y blancos moleculares permitan mayor nivel de discriminación, logrando superar las limitaciones descritas(11).

Los resultados de este estudio proporcionan confirmación parasitológica de infección asintomática y subclínica en residentes de áreas endémicas para la leishmaniasis cutánea en Colombia, y un enfoque metodológico para investigar el impacto de la infección subclínica en la epidemiología de la enfermedad y en la salud pública. La herramienta de

genotipificación del kADN establece una prueba de principio de la posibilidad de realizar análisis de diversidad genética en poblaciones de parásitos que antes eran inaccesibles e inexploradas, y las bases para desarrollar un análisis más robusto de las relaciones entre estas poblaciones de parásitos.

9. CONCLUSIONES

Una alta proporción de la población con antecedentes de leishmaniasis cutánea o evidencia inmunológica de infección en las comunidades investigadas, albergan infecciones persistentes.

Dada la sensibilidad de un muestreo en una sola oportunidad, la inestabilidad de la parasitemia y la distribución tisular de parásitos en el hospedero mamífero, la proporción de la población con infección persistente es probablemente mayor.

La población que alberga infecciones persistentes constituye un reservorio sustancial de *Leishmania,* que podría contribuir a la transmisión de la leishmaniasis en un entorno doméstico.

La PCR anidada y la genotipificación con base en el kADN permiten realizar análisis de poblaciones de parásitos hasta ahora inaccesibles e inexploradas y aporta las bases para desarrollar análisis más robustos de las poblaciones involucrados en la transmisión doméstica.

10. BIBLIOGRAFIA.

1. Weigle K, Santrich C, Martinez F, Valderrama L, Saravia NG. Epidemiology of cutaneous leishmaniasis in Colombia: a longitudinal study of the natural history, prevalence, and incidence of infection and clinical manifestations. J Infect Dis. 1993;168:699–708.

2. Davies C, Llanos-Cuentas E, Pyke S, Dye C. Cutaneous leishmaniasis in the Peruvian Andes: an epidemiological study of infection and immunity. Epidemiol Infect. 1995;114:297–318.

3. Bittar R, Nogueira R, Vieira-Gonçalves R, Pinho-Ribeiro V, Mattos MS, Oliveira-Neto M, et al. T-cell responses associated with resistance to *Leishmania* infection in individuals from endemic areas for *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis*. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2007;102:625–30.

4. Bañuls A, Bastien P, Pomares C, Arevalo J, Fisa R, Hide M. Clinical pleiomorphism in human leishmaniases, with special mention of asymptomatic infection. Clin Microbiol Infect. 2011;17:1451–61.

5. Amela C, Nieto J, Gonzalez F, Castillo J, Lucientes J, Alvar J. Infectivity of dogs naturally infected with *Leishmania infantum* to colonized *Phelobotomus perniciosus*. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1994;88:491–3.

6. Dietze R, Barros G, Teixeira L, Harris J, Michelson K, Falqueto A, et al. Effect of eliminating seropositive canines on the transmission of visceral leishmaniasis in Brazil. Clin Infect Dis. 1997;25:1240–2.

7. Silva G, Miranda dos Santos A, Cardoso de Aquino D, Moura da Silva A, Mendes A. Factors associated with asymptomatic infection in family members and neighbors of patients with visceral leishmaniasis. Cad Saude Pública-Rio Janeiro. 2012;28(12):2306–14.

8. Muñoz G, Davies CR. *Leishmania panamensis* transmission in the domestic environment: the results of a prospective epidemiological survey in Santander, Colombia. Biomedica. 2006;26 Suppl 1:131–44.

9. David C, Craft N. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. Dermatol Ther. 2009;22:491–502.

10. WHO. Control of the leishmaniasis: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniases. 2010;949.

11. Schönian G, Kuhls K, Mauricio I. Molecular approaches for a better understanding of the epidemiology and population genetics of *Leishmania*. Parasitology. 2011;138:405–25.

12. Centers for Disease Control and Prevention. Parasites - Leishmaniasis [Internet]. Enero 2015. Available from: http://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/

13. Weigle K, Saravia NG. Natural history, clinical evolution, and the host-parasite interaction in New World cutaneous Leishmaniasis. Clin Dermatol. 14:433–50.

14. Reithinger R, Dujardin J, Louzir H, Pirmez C, Alexander B, Brooker S, et al. Cutaneous leishmaniasis. Clin Dermatol. 2007;25:203–11.

15. Murray H. Prevention of relapse after chemotherapy in a chronic intracellular infection: mechanisms in experimental visceral leishmaniasis. J Immunol. 2005;174:4916–23.

16. Goto H, Lindoso J. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. Expert Rev Anti Infect Ther. 2010;8:419–33.

17. Zea D, Prager M, Figueroa R, Miranda M. Complicación mucosa de la leishmaniasis cutánea. Biomedica. 2009;29:9–11.

18. Quinnell R, Courtenay O. Transmission, reservoir hosts and control of zoonotic visceral leishmaniasis. Parasitology. 2009;136:1915–34.

19. Ready P. Epidemiology of visceral leishmaniasis. Clin Epidemiol. 2014;6:147–54.

20. Den Boer M, Argaw D, Jannin J, Alvar J. Leishmaniasis impact and treatment access. Clin Microbiol Infect. 2011;17:1471–7.

21. Desjeux P, Alvar J. *Leishmania*/HIV co-infections: epidemiology in Europe. Ann Trop Med Parasitol. 2003;97 Suppl 1(1):3–15.

22. Alvar J, Aparicio P, Aseffa A, Den Boer M, Cañavate C, Dedet J, et al. The relationship between leishmaniasis and AIDS: The second 10 years. Clin Microbiol Rev. 2008;21(2):334–59.

23. Desjeux P. Leishmaniasis: Current situation and new perspectives. Comp Immunol Microbiol Infect Dis. 2004;27:305–18.

24. Reyburn H, Rowland M, Mohsen M, Khan B, Davies C. The prolonged epidemic of anthroponotic cutaneous leishmaniasis in Kabul, Afghanistan: “Bringing down the neighbourgood.” Trans R Soc Trop Med Hyg. 2003;97:170–6.

25. Rubiano L, Miranda M, Muvdi Arenas S, Montero L, Rodríguez-Barraquer I, Garcerant D, et al. Noninferiority of miltefosine versus meglumine antimoniate for cutaneous leishmaniasis in children. J Infect Dis. 2012;205:684–92.

26. Belo V, Werneck G, Barbosa D, Simões T, Nascimento B, da Silva E, et al. Factors Associated with Visceral Leishmaniasis in the Americas: A Systematic Review and Meta-Analysis. PLoS Negl Trop Dis. 2013;7(4).

27. Nascimento E, Martins D, Monteiro G, Barbosa J, Ximenes M, Maciel B, et al. Forum: geographic spread and urbanization of visceral leishmaniasis in Brazil. Postscript: new challenges in the epidemiology of *Leishmania chagasi* infection. Cad saude publica / Minist da Saude, Fund Oswaldo Cruz, Esc Nac Saude Publica. 2008;24(12):2964–7.

28. Peñuela M, Sánchez A. Una mirada a la epidemiología y al control de la Leishmaniasis zoonótica en Colombia. Biosalud. 2007;6:99–111.

29. Guía protocolo para la vigilancia en salud pública de leishmaniasis. Ministerio de Protección Social Republica de Colombia [Internet]. 2006;1–27. Available from: http://www.ins.gov.co/lineas-de-accion/Subdireccion-Vigilancia/sivigila/Protocolos\nSIVIGILA/PRO\nLeishmaniasis.pdf

30. Saravia NG, Segura I, Holguin AF, Santrich C, Valderrama L, Ocampo C. Epidemiologic, genetic, and clinical associations among phenotypically distinct populations of *Leishmania* (*Viannia*) in Colombia. Am J Trop Med Hyg. 1998;59(1):86–94.

31. Saravia NG, Weigle K, Navas C, Segura I, Valderrama L, Valencia AZ, et al. Heterogeneity, geographic distribution, and pathogenicity of serodemes of *Leishmania* (*Viannia*) in Colombia. Am J Trop Med Hyg. 2002;66(6):738–44.

32. Echeverry M, Milena S, Trujillo G. Guía de atención de la leishmaniasis. 2000.

33. Sivigila. Casos por evento en Departamentos y Municipios Año 2012. Instituto Nacional de Salud [Internet]. 2012. Available from: SIVIGILA. Vigilancia Rutinaria; 2012.

34. Sivigila. Sistema de vigilancia en salud publica - Instituto Nacional de Salud [Internet]. 2013. Available from: http://www.ins.gov.co/lineas-de-accion/Subdireccion-Vigilancia/sivigila/Estadsticas SIVIGILA/TABLAS_2013_A_SEM 52.pdf

35. Michel G, Pomares C, Ferrua B, Marty P. Importance of worldwide asymptomatic carriers of *Leishmania infantum* (*L. chagasi*) in human. Acta Trop. 2011;119:69–75.

36. Le Fichoux Y, Quaranta J, Aufeuvre J, Lelievre A, Marty P, Suffia I, et al. Occurrence of *Leishmania infantum* parasitemia in asymptomatic blood donors living in an area of endemicity in southern France. J Clin Microbiol. 1999;37(6):1953–7.

37. Riera C, Fisa R, Udina M, Gállego M, Portus M. Detection of *Leishmania infantum* crytic infection in asymptomatic blood donors living in an endemic area (Eivissa, Balearic Island, Spain) by different diagnostic methods. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2004;98:102–10.

38. Reesink HW. European strategies against the parasite transfusion risk. Transfus Clin Biol. 2005;12:1–4.

39. Prina E, Roux E, Mattei D, Milon G. *Leishmania* DNA is rapidly degraded following parasite death: an analysis by microscopy and real-time PCR. Microbes Infect. 2007;9:1307–15.

40. De La Llave E, Lecoeur H, Besse A, Milon G, Prina E, Lang T. A combined luciferase imaging and reverse transcription polymerase chain reaction assay for the study of *Leishmania* amastigote burden and correlated mouse tissue transcript fluctuations. Cell Microbiol. 2011;13:81–91.

41. Romero I, Téllez J, Suárez Y, Cardona M, Figueroa R, Zelazny A, et al. Viability and burden of *Leishmania* in extralesional sites during human dermal leishmaniasis. PLoS Negl Trop Dis. 2010;4(9).

42. Mebrahtu Y, Hendricks L, Oster C, Lawyer P, Perkins P, Pamba H, et al. *Leishmania donovani* parasites in the nasal secretions, tonsillopharyngeal mucosa, and urine centrifugates of visceral leishmaniasis patients in Kenya. Am J Trop Med Hyg. 1993;48(4):530–5.

43. Figueroa R, Lozano L, Romero I, Cardona M, 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.

44. García-García J, Martín-Sánchez J, Gállego M, Rivero-Román A, Camacho A, Riera C, et al. Use of noninvasive markers to detect *Leishmania* infection in asymptomatic human immunodeficiency virus-infected patients. J Clin Microbiol. 2006;44(12):4455–8.

45. Fernández O, Diaz-Toro Y, Ovalle C, Valderrama L, Muvdi S, Rodríguez I, et al. Miltefosine and Antimonial Drug Susceptibility of *Leishmania* (*Viannia*) Species and Populations in Regions of High Transmission in Colombia. PLoS Negl Trop Dis. 2014;8(5).

46. Hide M, Marion E, Pomares C, Fisa R, Marty P, Bañuls A. Parasitic genotypes appear to differ in leishmaniasis patients compared with asymptomatic related carriers. Int J Parasitol. 2013;43(5):389–97.

47. Follador I, Araújo C, Bacellar O, Araújo C, Carvalho L, Almeida R, et al. Epidemiologic and immunologic findings for the subclinical form of *Leishmania braziliensis* infection. Clin Infect Dis. 2002;34:E54–8.

48. Trujillo C, Robledo S, Franco J, Velez I, Erb K, Patiño P. Endemically exposed asymptomatic individuals show no increase in the specific *Leishmania* (*Viannia*) *panamensis*-Th1 immune response in comparison to patients with localized cutaneous leishmaniasis. Parasite Immunol. 2002;24(May):455–62.

49. Díaz Y, Rojas R, Valderrama L, Saravia NG. T-bet, GATA-3, and Foxp3 expression and Th1/Th2 cytokine production in the clinical outcome of human infection with *Leishmania* (*Viannia*) species. J Infect Dis. 2010;202(3):406–15.

50. Monteiro H, Barnosa A, Lopes dos Santos S, Volpini Â, Marques M, Romanha A. Use of PCR-RFLP to identify *Leishmania* species in naturally-infected dogs. Vet Parasitol. 2006;140:231–8.

51. Quaresma P., Murta S, de Castro Ferreira E, da Rocha-Lima A, Prates A, Ferreira C. Molecular diagnosis of canine visceral leishmaniasis: Identification of *Leishmania* species by PCR-RFLP and quantification of parasite DNA by real-time PCR. Acta Trop. 2009;111:289–94.

52. Reithinger R, Lambson B, Barker D, Davies C. Use of PCR to detect *Leishmania* (*Viannia*) spp. in dog blood and bone marrow. J Clin Microbiol. 2000;38(2):748–51.

53. Garcia L, Membrive N, Membrive U, Rodrigues G, Reis N, Campana M, et al. PCR in the investigation of canine American tegumentary leishmaniasis in northwestern Paraná State, Brazil. Cad saude publica / Minist da Saude, Fund Oswaldo Cruz, Esc Nac Saude Publica. 2006;22(3):571–8.

54. Reithinger R, Davies C. American cutaneous leishmaniasis in domestic dogs: an example of the use of the polymerase chain reaction for mass screening in epidemiological studies. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2002;96.

55. Vergel C, Palacios R, Cadena H, Posso C, Valderrama L, Perez M, et al. Evidence for *Leishmania* (*Viannia*) parasites in the skin and blood of patients before and after treatment. J Infect Dis. 2006;194(3):503–11.

56. Schubach A, Haddad F, Oliveira-Neto M, Degrave W, Pirmez C, Grimaldi G, et al. Detection of *Leishmania* DNA by polymerase chain reaction in scars of treated human patients. J Infect Dis. 1998;178:911–4.

57. Garrote J, Gutiérrez M, López R, Dueñas M, Zarzosa P, Canavate C, et al. Seroepidemiologic study of *Leishmania infantum* infection in Castilla-Leon, Spain. Am J Trop Med Hyg. 2004;71(4):403–6.

58. Biglino A, Bolla C, Concialdi E, Trisciuoglio A, Romano A, Ferroglio E. Asymptomatic *Leishmania infantum* infection in an area of Northwestern Italy (Piedmont region) where such infections are traditionally nonendemic. J Clin Microbiol. 2010;48(1):131–6.

59. Picado A, Ostyn B, Singh SP, Uranw S, Hasker E, Rijal S, et al. Risk factors for visceral leishmaniasis and asymptomatic *Leishmania donovani* infection in India and Nepal. PLoS One. 2014;9(1):1–8.

60. Custodio E, Gadisa E, Sordo L, Cruz I, Moreno J, Nieto J, et al. Factors associated with *Leishmania* asymptomatic infection: Results from a cross-sectional survey in highland Northern Ethiopia. PLoS Negl Trop Dis. 2012;6(9).

61. Mary C, Faraut F, Lascombe L, Dumon H. Quantification of *Leishmania infantum* DNA by a Real-Time PCR Assay with high sensitivity. 2004;42(11):5249–55.

62. Costa C, Gomes R, Silva M, Garcez L, Ramos P, Santos R, et al. Competence of the human host as a reservoir for *Leishmania chagasi*. J Infect Dis. 2000;182:997–1000.

63. Miller E, Warburg A, Novikov I, Hailu A, Volf P, Seblova V, et al. Quantifying the Contribution of Hosts with Different Parasite Concentrations to the Transmission of Visceral Leishmaniasis in Ethiopia. PLoS Negl Trop Dis. 2014;8(10):e3288.

64. Martins L, Alexandrino A, Guimarães G. Detection of *Leishmania braziliensis* DNA in American tegumentary leishmaniasis patients. Rev Saude Publica. 2010;44(3):571–4.

65. Weirather J, Jeronimo S, Gautam S, Sundar S, Kang M, Kurtz M, et al. Serial quantitative PCR assay for detection, species discrimination, and quantification of *Leishmania* spp. in human samples. J Clin Microbiol. 2011;49:3892–904.

66. Marfurt J, Nasereddin A, Niederwieser I, Charles L, Beck H, Felger I, et al. Identification and differentiation of *Leishmania* species in clinical samples by PCR amplification of the miniexon sequence and subsequent Restriction fragment length polymorphism analysis. Society. 2003;41(7):3147–53.

67. Freitas-Lidani K, Messias-Reason I, Ishikawa E. A comparison of molecular markers to detect *Lutzomyia longipalpis* naturally infected with *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum*. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2014;109(June):442–7.

68. Castilho T, Shaw J, Lucile M, Floeter-Winter L. New PCR assay using Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase for identification of *Leishmania* species. J Clin Microbiol. 2003;41(2):540–6.

69. Moreno T, Marcelo L, Camargo A, Mcmahon-Pratt D, Shaw J, Floeter-Winter L. A Real-Time Polymerase Chain Reaction assay for the identification and quantification of American *Leishmania* species on the basis of Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase. Trop Med. 2008;78(101):122–32.

70. Tupperwar N, Vineeth V, Rath S, Vaidya T. Development of a real-time polymerase chain reaction assay for the quantification of *Leishmania* species and the monitoring of systemic distribution of the pathogen. Diagn Microbiol Infect Dis. 2008;61:23–30.

71. Cardoso da Graça G, Volpini A, Sierra G, Paes De Oliveira M, Hueb M, Porrozzi R, et al. Development and validation of PCR-based assays for diagnosis of American cutaneous leishmaniasis and identification of the parasite species. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2012;107(August):664–74.

72. Foulet F, Botterel F, Buffet P, Morizot G, Rivollet D, Deniau M, et al. Detection and identification of *Leishmania* species from clinical specimens by using a real-time PCR assay and sequencing of the cytochrome b gene. J Clin Microbiol. 2007;45(7):2110–5.

73. Stevenson L, Fedorko D, Zelazny A. An enhanced method for the identification of *Leishmania* spp. using real-time polymerase chain reaction and sequence analysis of the 7SL RNA gene region. Diagn Microbiol Infect Dis. Elsevier B.V.; 2010;66(4):432–5.

74. Van der Meide W, Schoone G, Faber W, Zeegelaar J, de Vries H, Özbel Y, et al. Quantitative nucleic acid sequence-based assay as a new molecular tool for detection and quantification of *Leishmania* parasites in skin biopsy samples. J Clin Microbiol. 2005;43(11):5560–6.

75. Bhattarai N, Dujardin J, Rijal S, De Doncker S, Boelaert M, Van der Auwera G. Development and evaluation of different PCR-based typing methods for discrimination of *Leishmania donovani* isolates from Nepal. Parasitology. 2010;137:947–57.

76. Rogers W, Wirth D. Kinetoplast DNA minicircles: regions of extensive sequence divergence. Proc Natl Acad Sci. 1987;84:565–9.

77. Lukes J, Guilbride D, Votýpka J, Zíková A, Benne R, Englund P, et al. Kinetoplast DNA network : Evolution of an improbable structure. Eukaryot Cell. 2002;1(4):495–502.

78. Vergel C, Walker J, Saravia NG. Amplification of human DNA by primers targeted to *Leishmania* kinetoplast DNA and post-genome considerations in the detection of parasites by a polymerase chain reaction. Am J Trop Med Hyg. 2005;72(4):423–9.

79. Yurchenko V, Merzlyak E, Kolesnikov A. Structure of *Leishmania* Minicircle Kinetoplast DNA Classes. J Clin Microbiol. 1999;37(5):1656–8.

80. Onafuwa-Nuga A, Telesnitsky A, King S. 7SL RNA, but not the 54-kd signal recognition particle protein, is an abundant component of both infectious HIV-1 and minimal virus-like particles. RNA. 2006;12:542–6.

81. Michaeli S, Podell D, Agabian N, Ullu E. The 7SL RNA homologue of *Trypanosoma brucei* is closely related to mammalian 7SL RNA. Mol Biochem Parasitol. 1992;51:55–64.

82. Zelazny A, Fedorko D., Li L, Neva F., Fischer S. Evaluation of 7SL RNA gene sequences for the identification of *Leishmania* spp. Am J Trop Med Hyg. 2005;72(4):415–20.

83. Ben-Shlomo H, Levitan A, Shay N, Goncharov I, Michaeli S. RNA editing associated with the generation of two distinct conformations of the trypanosomatid *Leptomonas collosoma* 7SL RNA. J Biol Chem. 1999;274(36):25642–50.

84. González EG. Microsatélites: sus aplicaciones en la conservación de la biodiversidad. Graellsia. 2003;59:377–88.

85. Jarne P, Lagoda P. Microsatellites, from molecules to populations and back. Trends Ecol Evol. 1996;11:424–9.

86. Young D. A review of the bloodsucking Psychodid flies of Colombia: (Diptera: Phlebotominae and Sycoracinae) (Bulletin / University of Florida. Agricultural Experiment Station). 1979.

87. Young D, Duncan M. Guide to the identification and geographic distribution of *Lutzomyia*, sanflies in Mexico, the West Indies, Central and South America (Diptera: Psychodidae). Associated Publishers American Entomological Institute. 1994.

88. Galati E. Phlebotominae (Díptera, Psychodidae) Clasificación, Morfología, Terminología E Identificación De Adultos. 2009.

89. Ferro C, Marín D, Góngora R, Carrasquilla M, Trujillo J, Rueda N, et al. Phlebotomine vector ecology in the domestic transmission of American cutaneous leishmaniasis in Chaparral, Colombia. Am J Trop Med Hyg. 2011;85(5):847–56.

90. Moreno M, Ferro C, Rosales M, Rubiano L, Delgado M, Cossio A, et al. First report of *Warileya rotundipennis* (Psychodidae: Phlebotominae) naturally infected with *Leishmania* (*Viannia*) in a focus of cutaneous leishmaniasis in Colombia. Acta Trop. 2015;In Press.

91. Oddone R, Schweynoch C, Schönian G, De Sousa C, Cupolillo E, Espinosa D, et al. Development of a multilocus microsatellite typing approach for discriminating strains of *Leishmania* (*Viannia*) species. J Clin Microbiol. 2009;47:2818–25.

92. Solomon A, Holland M, Burton M, West S, Alexander N, Aguirre A, et al. Strategies for control of trachoma: Observational study with quantitative PCR. Lancet. 2003;362:198–204.

93. Gouzelou E, Haralambous C, Antoniou M, Christodoulou V, Martinković F, Zivičnjak T, et al. Genetic diversity and structure in *Leishmania infantum* populations from southeastern Europe revealed by microsatellite analysis. Parasit Vectors. 2013;6:342.

94. Cucunubá Z, Guerra Á, Rahirant S, Rivera J, Cortés L, Nicholls R. Asymptomatic *Plasmodium* spp. infection in Tierralta, Colombia. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2008;103:668–73.

95. Maciel B, Dias J, Romano C, Sriranganathan N, Brendel M, Rezende R. Detection of *Salmonella enteritidis* in asymptomatic carrier animals: comparison of quantitative real-time PCR and bacteriological culture methods. Genet Mol Res. 2011;10(4):2578–88.

96. Aryee E, Bailey R, Natividad-Sancho A, Kaye S, Holland M. Detection, quantification and genotyping of Herpes Simplex Virus in cervicovaginal secretions by real-time PCR: a cross sectional survey. Virol J. 2005;2:61.

97. Da Silva-Nunes M, Moreno M, Conn JE, Gamboa D, Abeles S, Vinetz JM, et al. Amazonian malaria: Asymptomatic human reservoirs, diagnostic challenges, environmentally driven changes in mosquito vector populations, and the mandate for sustainable control strategies. Acta Trop. Elsevier B.V.; 2012;121(3):281–91.

98. Silveira F, Lainson R, Crescente J, de Souza A, Campos M, Gomes C, et al. A prospective study on the dynamics of the clinical and immunological evolution of human *Leishmania* (*L.*) *infantum chagasi* infection in the Brazilian Amazon region. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2010;104:529–35.

99. Singh O, Hasker E, Sacks D, Boelaert M, Sundar S. Asymptomatic *Leishmania* infection: A new challenge for leishmania control. Clin Infect Dis. 2014;58:1424–9.

100. Dos Santos Marques L, Gomes L, Marques da Rocha I, Marques da Silva T, Oliveira E, Franco M, et al. Low parasite load estimated by qPCR in a cohort of children living in urban area endemic for Visceral Leishmaniasis in Brazil. PLoS Negl Trop Dis. 2012;6(12):1–7.

101. Marsden P. Mucosal leishmaniasis. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1986;80:859–76.

102. Walton B, Chinel L. Onset of espundia after many years of occult infection with *Leishmania braziliensis*. Am J Trop Med Hyg. 1973;22:696–8.

103. Saravia NG, Weigle K, Segura I, Giannini S, Pacheco R, Labrada L, et al. Recurrent lesions in human *Leishmania braziliensis*. Lancet. 1990;(3):398–402.

104. Veland N, Espinosa D, Valencia B, Ramos A, Calderon F, Arevalo J, et al. Polymerase chain reaction detection of *Leishmania* kDNA from the urine of Peruvian patients with cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. Am J Trop Med Hyg. 2011;84(4):556–61.

105. Almeida I, Cardoso de Aquino D, Kuppinger O, Cruz M, Salgado M, Soeiro D, et al. *Leishmania* infection in humans, dogs and sandflies in a visceral leishmaniasis endemic area in Maranhão, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2011;106:207–11.

106. Nsobya S, Parikh S, Kironde F, Lubega G, Kamya M, Rosenthal P, et al. Molecular evaluation of the natural history of asymptomatic parasitemia in Ugandan children. J Infect Dis. 2004;189:2220–6.

107. Lindblade K, Steinhardt L, Samuels A, Kachur S, Slutsker L. The silent threat: asymptomatic parasitemia and malaria transmission. Expert Rev Anti Infect Ther. 2013;11:623–39.

108. Bousema T, Okell L, Felger I, Drakeley C. Asymptomatic malaria infections: detectability, transmissibility and public health relevance. Nat Rev Microbiol. Nature Publishing Group; 2014;12(12):833–40.

109. Kirchgatter K, Tubaki R, Malafronte R, Alves I, Lima G, Guimarães L, et al. *Anopheles* (*Kerteszia*) *cruzii* (Diptera: Culicidae) in peridomiciliary area during asymptomatic malaria transmission in the Atlantic Forest: molecular identification of blood-meal sources indicates humans as primary intermediate hosts. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 2014;56(5):403–9.

110. Alves F, Gil L, Marrelli M, Ribolla P, Camargo E, Pereira Da Silva L. Asymptomatic carriers of *Plasmodium* spp. as infection source for malaria vector mosquitoes in the Brazilian Amazon. J Med Entomol. 2005;42(5):777–9.

111. Oryan A, Shirian S, Tabandeh M, Hatam G, Randau G, Daneshbod Y. Genetic diversity of *Leishmania major* strains isolated from different clinical forms of cutaneous leishmaniasis in southern Iran based on minicircle kDNA. Infect Genet Evol. Elsevier B.V.; 2013;19:226–31.

112. Boité M, Mauricio I, Miles M., Cupolillo E. New insights on Taxonomy, Phylogeny and Population genetics of *Leishmania* (*Viannia*) parasites based on Multilocus Sequence Analysis. PLoS Negl Trop Dis. 2012;6(11).

113. Kuhls K, Keilonat L, Ochsenreither S, Schaar M, Schweynoch C, Presber W, et al. Multilocus microsatellite typing (MLMT) reveals genetically isolated populations between and within the main endemic regions of visceral leishmaniasis. Microbes Infect. 2007;9:334–43.

114. Kuhls K, Cupolillo E, Silva S., Schweynoch C, Côrtes Boité M, Mello M., et al. Population structure and evidence for both clonality and recombination among Brazilian strains of the subgenus *Leishmania* (*Viannia*). PLoS Negl Trop Dis. 2013;7(10).

115. Yurchenko V, Kolesnikov A, Lukes J. Phylogenetic analysis of Trypanosomatina (Protozoa: Kinetoplastida) based on minicircle conserved regions. Folia Parasitol (Praha). 2000;47:1–5.

116. Disch J, Pedras M, Orsini M, Pirmez C, De Oliveira M, Castro M, et al. *Leishmania* (*Viannia*) subgenus kDNA amplification for the diagnosis of mucosal leishmaniasis. Diagn Microbiol Infect Dis. 2005;51:185–90.

117. Pacheco R, Martinez J, Valderrama L, Momen H, Saravia NG. Genotypic polymorphisms in experimental metastatic dermal leishmaniasis. Mol Biochem Parasitol. 1995;69:197–209.

118. Spithill T, Grumont R, Mitchell G. Characterization of isolates and clones of *Leishmania* by analysis of kinetoplast DNA. J Cell Biochem. 1984;24:J Cell Biochem.

11. ANEXOS

ANEXO 1. Participación en el II Congreso Colombiano de Biología Computacional y Bioinformática. Manizales, Septiempre-2013. Modalidad: Presentación oral.

Tipificación multilocus de microsatélites (MLMT) y secuenciación del DNA del kinetoplasto como herramientas para el análisis de diversidad poblacional de *Leishmania panamensis*.

Rafael Góngora[1], Mariana Rosales[1], Emily Adams[2], Nancy Gore Saravia[1], María Adelaida Gómez[1*]

[1] Centro Internacional de Entrenamiento e Investigaciones Médicas - CIDEIM. Cali, Colombia.

[2] Royal Tropical Institute - KIT. Amsterdam, Netherlands.

RESUMEN

Introducción: En Colombia, la mayoría de los casos de leishmaniasis cutánea reportados son causados por *Leishmania panamensis.* Mediante MLMT se ha demostrado una alta heterogeneidad intra-especie en *L. braziliensis,* inclusive en cepas aisladas de una misma región endémica y una similitud genética en cepas de *L. guyanensis.* Se desconoce la variabilidad genética en *L. panamensis*. La utilidad y aplicabilidad de MLMT en el análisis poblacional de *L. Viannia* se restringe a parásitos propagados de muestras clínicas o muestras con alta cantidad de DNA del parásito. Los objetivos de este trabajo fueron 1) evaluar la diversidad genética de cepas clínicas de *L. panamensis* circulantes en Colombia mediante MLMTs, y 2) diseñar una herramienta molecular de alta sensibilidad para el análisis de variabilidad genética de *L. panamensis* a partir de muestras clínicas.

Métodos: La diversidad genética de 61 cepas clínicas de *L. panamensis* de los departamentos de Antioquia, Chocó, Risaralda, Valle, Cauca, Nariño, Putumayo, Caquetá

y Meta se evaluó mediante la amplificación de 14 microsatélites distribuidos en 13 cromosomas a partir de ADN total de promastigotes. El tamaño de los microsatélites se determinó por migración de los productos de PCR en geles de agarosa al 4.5%. Mediante análisis de secuencia in-silico se diseñó una herramienta para la evaluación de diversidad genética de *L. panamensis* basada en la secuenciación de la región conservada del kDNA. Los productos de amplificación del kDNA de 22 de las 61 cepas clínicas de *L. panamensis* fueron secuenciados y analizados en BioEdit. Las distancias genéticas se estimaron y visualizaron utilizando los software MSA 4.05, POPULATIONS y MEGA 5.1.

Resultados: La genotipificación por MLMTs reveló un alto grado de diversidad genética en *L. panamensis* representado por al menos siete *clusters,* similar a lo observado con *L. braziliensis.* Aunque se evidencio una alta variabilidad entre cepas aisladas dentro de los departamentos (Ej. Nariño y Choco), se mantiene una similitud entre cepas aisladas en un mismo foco de transmisión (Ej. Risaralda – Pueblo Rico, Buenaventura-Sagrada Familia y Puerto Merizalde). A partir de la secuenciación de la región conservada del minicírculo de kDNA el análisis de diversidad genética reveló concordancias con los grupos de mayor similitud genética definidos por MLMTs.

Conclusiones: Estos resultados demuestran la utilidad de MLMTs en el análisis de poblaciones de cepas clínicas de *L. panamensis,* sin embargo su poder discriminatorio se limita por la cantidad de DNA disponible para realizar el PCR. El diseño y validación de la novedosa herramienta de tipificación a partir del análisis de secuencias del minicírculo del kADN, permitirá la evaluación de diversidad genética de *L. panamensis* a partir de muestras clínicas con baja carga parasitaria.

Financiado por COLCIENCIAS 2229-519-28948
Swiss National Science Foundation.

ANEXO 2. Participación en ASTMH 62nd Annual Meeting. Washington, DC. USA. Noviembre 13-17, 2013. Modalidad: Poster.

ABSTRACT 787

Parasitological confirmation of asymptomatic infection in endemic areas for cutaneous Leishmaniasis in Colombia.

Mariana Rosales[1], Luisa Rubiano[1], Alexandra Cossio[1], María Adelaida Gómez[1], Nancy Gore Saravia[1]

[1] Centro Internacional de Entrenamiento e Investigaciones Médicas, CIDEIM Cali Colombia

Asymptomatically infected individuals in endemic areas for cutaneous leishmaniasis (CL) can be a hidden and large reservoir of parasites available for anthropophilic vectors. Viable *Leishmania* persist indefinitely after clinical resolution of disease. Whether parasites persist during asymptomatic infection and its impact on disease transmission is unknown. We aimed to parasitologically confirm asymptomatic infection and the relative parasite burden in mucosal tissues and peripheral blood of inhabitants of communities endemic for CL in Colombia.

Individuals from 4 communities in Nariño and Risaralda were included. Participants were categorized as uninfected, asymptomatically infected; healed CL or active CL. Blood monocytes, lesion and scar aspirates, and nasal mucosa, conjunctiva and tonsil swabs were obtained from participants. Detection of *L. Viannia* kDNA was performed by PCR, and parasite viability confirmed by 7SLRNA RT-qPCR.

In communities of Risaralda the population was predominantly represented by individuals with history of CL (67%). kDNA positivity was found in 43% of individuals. Samples with the highest frequency of kDNA positivity were blood monocytes (37%) and nasal swabs (15%). Communities in Nariño were largely composed of uninfected individuals (63%) followed by those with history of CL (25%) and asymptomatic infection (9%), of which 27% were kDNA positive; swabs of tonsil (24%) and nasal mucosa (15%) were the most

frequently positive samples. Samples with highest parasite burden were tonsil and nasal mucosal swabs.

Parasite persistence in individuals without clinical signs of infection highlights their potential in transmission. High frequency of kDNA positive blood samples in individuals with history of CL supports their previously unrecognized role as a source of parasite acquisition by the vector. Parasite detection in mucosal tissues may identify potential risk of disease activation. Understanding of parasite persistence in asymptomatic infection and healed CL in transmission is needed for the development of community-targeted control strategies.

Parasitological confirmation of asymptomatic infection in endemic areas for cutaneous Leishmaniasis in Colombia.

Mariana Rosales[1], Luisa Rubiano[1], Alexandra Cossio[1], María Adelaida Gómez[1], Nancy Gore Saravia[1]

[1] Centro Internacional de Entrenamiento e Investigaciones Médicas (CIDEIM), Cali, Colombia

*mrosales@cideim.org.co

ABSTRACT

Introduction. Asymptomatically infected individuals in endemic areas for cutaneous leishmaniasis (CL) can be a hidden and large reservoir of parasites available for anthropophilic vectors. Viable *Leishmania* persist indefinitely after clinical resolution of disease. Whether parasites persist during asymptomatic infection and its impact on disease transmission is unknown.

Objective. We aimed to parasitologically confirm asymptomatic infection and the relative parasite burden in mucosal tissues and peripheral blood of inhabitants of communities endemic for CL in Colombia.

Methods. Individuals from 4 communities in Nariño and Risaralda were included. Participants were categorized as Montenegro test negative (presumptively uninfected), asymptomatically infected (Montenegro test positive), healed CL or active CL. Blood monocytes, lesion and scar aspirates, and nasal mucosa, conjunctiva and tonsil swabs were obtained from participants. Detection of *L. Viannia* kDNA was performed by PCR, and parasite viability confirmed by 7SLRNA RT-qPCR.

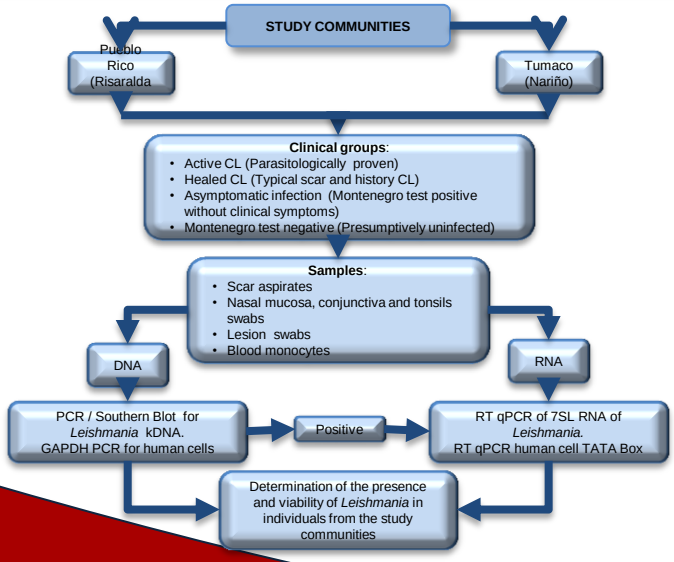
Results. In communities of Risaralda the population was predominantly represented by individuals with history of CL (67%). kDNA positivity was found in 43% of individuals. Samples with the highest frequency of kDNA positivity were blood monocytes (38%) and nasal swabs (17%). Communities in Nariño were largely composed of presumptively uninfected individuals (63%) followed by those with history of CL (25%) and asymptomatic infection (9%), of which 27% were kDNA positive. Swabs of tonsils (21%) and conjunctiva (19%) were the most frequently positive samples. Samples with highest parasite burden were tonsil and nasal mucosal swabs.

Conclusions. High frequency of kDNA positive blood samples in individuals with history of CL supports their previously unrecognized role as a source of parasite acquisition by the vector. Parasite detection in mucosal tissues may identify potential risk of disease activation. Understanding of parasite persistence in asymptomatic infection and healed CL in transmission is needed for the development of community-targeted control strategies.

BACKGROUND

In patients with visceral and cutaneous leishmaniasis, the detection of *Leishmania* in mucosal tissues and blood has demonstrated the persistence of the parasite in extralesional sites. In endemic areas for cutaneous leishmaniasis, there are a significant number of individuals with immunological evidence of asymptomatic infection. However, the persistence of viable parasites in these individuals and tissue distribution is still unknown. This information could provide insights into natural history and the involvement of asymptomatically infected individuals in disease transmission.

EXPERIMENTAL STRATEGY



RESULTS

Persistence of *Leishmania* in mucosal tissues and blood monocytes, in individuals without clinical signs of disease.

The distribution of kDNA positive samples by tissue site and clinical groups from individuals of communities in Pueblo Rico and Tumaco.

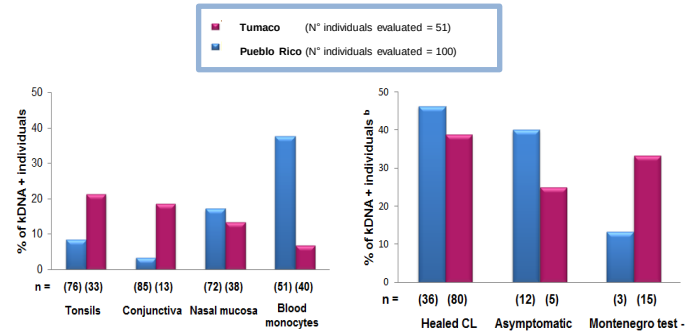


Figure 1. Figure 1. Frequency of distribution of kDNA positive samples by sample type. Percent values for kDNA positive samples were calculated based on the total number of samples analyzed per tissue site.[a]

Figure 2. Detection of *Leishmania* kDNA by clinical group and study site.

[a] We verified the quality of the DNA by PCR amplification of the human GAPDH gene. GAPDH was not successfully amplified in lesion scar aspirates, or 40/569 other samples. Therefore these samples were excluded from the analyzes.
[b] at least one kDNA+ sample

Confirmation of *Leishmania* viability by qRT-PCR of the 7SLRNA gene transcript and quantitation of parasite burden in kDNA positive mucosal tissues and blood monocytes.

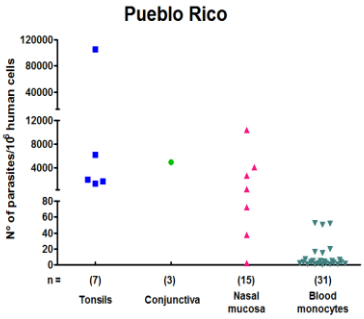


Figure 3. Parasite burden distribution by type of sample in Pueblo Rico. Threshold of detection was 100 parasites per reaction.

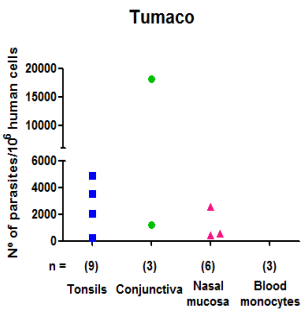


Figure 4. Parasite burden distribution by type of sample in Tumaco. Threshold of detection was 100 parasites per reaction

CONCLUSIONS

- Detection of *Leishmania* in mucosal tissues and blood monocytes in individuals without clinical signs of disease proves that *Leishmania* are present during asymptomatic infection and persist even after resolution of disease.
- The presence of viable parasites and quantification of parasite burden in these tissues raise concerns on the possibility of activation/reactivation of disease, and as a putative source of parasites available for uptake by the vector.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was funded by COLCIENCIAS contract # 2229-519-28948 and the Swiss National Science Foundation. We thank the personal of the Clinical Unit of CIDEIM in Cali and Tumaco, who provided clinical and laboratory support for the study.

ANEXO 3. Manuscrito "First report of *Warileya rotundipennis* (Psychodidae: Phlebotominae) naturally infected with *Leishmania* (*Viannia*) in a focus of cutaneous leishmaniasis in Colombia".

En prensa en Abril de 2015, revista Acta Trópica.

Acta Tropica xxx (2015) xxx–xxx

Contents lists available at ScienceDirect

Acta Tropica

journal homepage: www.elsevier.com/locate/actatropica

First report of *Warileya rotundipennis* (Psychodidae: Phlebotominae) naturally infected with *Leishmania* (*Viannia*) in a focus of cutaneous leishmaniasis in Colombia

Mabel Moreno[a], Cristina Ferro[b], Mariana Rosales[a], Luisa Rubiano[a], Marcela Delgado[c], Alexandra Cossio[a], Maria Adelaida Gómez[a], Clara Ocampo[a], Nancy Gore Saravia[a,*]

[a] Centro Internacional de Entrenamiento e Investigaciones Médicas (CIDEIM), Carrera 125 No. 19-225 Avenida La María-Pance, Cali Código Postal 760031, Colombia
[b] Grupo de Entomología, Instituto Nacional de Salud (INS), Avenida Calle 26 No 51-20-Zona 6 CAN, Bogotá, DC, Colombia
[c] Secretaría de Salud Departamental de Risaralda, Calle 19 No. 13-17, Pereira, Risaralda, Colombia

ARTICLE INFO

Article history:
Received 9 April 2015
Accepted 17 April 2015
Available online xxx

Keywords:
Domestic transmission
Warileya rotundipennis
Leishmania (*Viannia*)
La Cabaña

ABSTRACT

The expansion of transmission of cutaneous leishmaniasis from sylvatic ecosystems into peri-urban and domestic settings has occurred as sand flies have adapted to anthropogenic environmental modifications. Assessment of the intradomiciliary presence of sand flies in households of the settlement "La Cabaña", in the Department of Risaralda, Colombia, revealed an abundance of *Warileya rotundipennis*. This unexpected observation motivated further analyses to evaluate the participation of this species in the transmission of cutaneous leishmaniasis. Collections using CDC light traps were conducted during two consecutive nights in May and August 2011.The total of 667 sand flies collected were classified into five species: *W. rotundipennis* ($n = 654$; 98.05%), *Nyssomyia trapidoi* ($n = 7$; 1.04%); *Lutzomyia (Helcocyrtomyia) hartmanni* ($n = 3$; 0.44%); *Lutzomyia lichyi* ($n = 2$; 0.29%) and *Psychodopygus panamensis* ($n = 1$; 0.14%). The striking predominance of *W. rotundipennis* within households during both wet (May) and dry (August) seasons, anthropophilic behavior demonstrated by human blood in 95.23% (60/63) evaluable blood-engorged specimens, and natural infection (5/168–3%) with genetically similar parasites of the *Leishmania (Viannia)* subgenus observed in a patient in this community, support the involvement of *W. rotundipennis* in the domestic transmission of cutaneous leishmaniasis in "La Cabaña".

© 2015 Published by Elsevier B.V.

1. Introduction

Domestic transmission of leishmaniasis has become frequent phenomena in Colombia and other countries of Latin America (Peterson and Shaw, 2003; Valderrama-Ardila et al., 2010; Ampuero et al., 2005; Gage et al., 2008; Maroli et al., 2013; Ferro et al., 2011). The expansion of transmission of dermal leishmaniasis beyond sylvatic habitats occurs as sand flies adapt to altered habitats (Peterson and Shaw, 2003; Valderrama-Ardila et al., 2010) and is manifest by the frequent and geographically widespread presence of sand flies within human dwellings and prevalence of cutaneous leishmaniasis in children (Ampuero et al., 2005; Gage et al., 2008; Maroli et al., 2013). Entomological captures conducted to confirm the intradomiciliary presence of sand flies during investigation of the burden of *Leishmania* infection in a community experiencing domestic transmission of cutaneous leishmaniasis revealed a predominant abundance of *Warileya rotundipennis*. This unexpected finding motivated the examination of the potential contribution of this sand fly species to transmission of cutaneous leishmaniasis in this community.

2. Materials and methods

2.1. Study area

The study was conducted in the settlement "La Cabaña" within the municipality of Pueblo Rico, Risaralda, Colombia. This community is located at an altitude of 340 meters above sea level on

* Corresponding author. Tel.: +57 25555087.
E-mail addresses: mmoreno@cideim.org.co (M. Moreno), crisferrovela@gmail.com (C. Ferro), mrosales@cideim.org.co (M. Rosales), lrubiano@cideim.org.co (L. Rubiano), marcela.delgado@risaralda.gov.co (M. Delgado), acossio@cideim.org.co (A. Cossio), mgomez@cideim.org.co (M.A. Gómez), claraocampo@cideim.org.co (C. Ocampo), saravian@cideim.org.co (N.G. Saravia).

http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2015.04.017
0001-706X/© 2015 Published by Elsevier B.V.

UNCORRECTED PROOF

Please cite this article in press as: Moreno, M., et al., First report of *Warileya rotundipennis* (Psychodidae: Phlebotominae) naturally infected with *Leishmania* (*Viannia*) in a focus of cutaneous leishmaniasis in Colombia. Acta Trop. (2015), http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2015.04.017

the pacific slope of the western range of the Andes (4°58′43.12″N; 75°49′43.32″W) where average annual temperature is 25 °C with an average of 4000 cm^3 rainfall. Sugar cane cultivation and coffee plantations intervene primary forest. Clinical evidence of prior cutaneous leishmaniasis and immunological evidence of subclinical or asymptomatic infection was present among male and female inhabitants of all age groups from infants to elderly adults of all households in the study area and *L. V. panamensis* was isolated from one active case.

2.2. Phlebotomine sampling

Eight of the nine houses in this community were evaluated for the indoor presence of sand flies using a CDC miniature light trap placed in an inhabited dormitory for two consecutive nights. Malfunction of a light trap resulted in exclusion of the ninth house. All traps were placed at a height of 1.5 m and activated from 18:00 to 06:00 h. Two independent collections were carried out in May during the rainfall season, and August during the dry season of 2011. Concomitantly, a CDC light trap was installed on two consecutive nights in the woods near house no. 4.

2.3. Species identification

After immobilization with triethylamine (TEA: 04885-1; Fischer Scientific, Pitsburgh, PA) phlebotomines were separated from other insects as described (Ferro et al., 2011), and placed in 70% alcohol until processed for identification and analyses of blood source and *Leishmania* infection by polymerase chain reactions (PCR). Initial taxonomic characterization was based on external morphological features described by Young and Galati keys (Young, 1979; Galati, 2003). Species identities were confirmed by clarifying 2 to 4 individuals in 10% KOH and phenol. Some specimens were mounted in Canada balsam and phenol 1:1 over glass slides for each morphological species and identified based on technique of Fairchild and Hertig (1948), Young and Duncan (1994). Distinctive morphological features of *W. rotundipennis* include unarmed cibarium; broader wings with rounded tip; complete interocular suture; slight curvature of R2 + 3 wing veins and terminal antennal segments (Young, 1979).

2.4. Blood source analysis

Field-collected blood-engorged phlebotomines were stored in separate vials in 70% ethanol. DNA was isolated using the DNeasy extraction kit (Qiagen) according to the manufacturer's protocol. Blood source identification was carried out using cytochrome B (*cytB)* primers as described (Molaei et al., 2006, 2008). The PCR conditions for blood source identification were those previously described (Ferro et al., 2011).

2.5. Leishmania *infection*

DNA from female specimens of *W. rotundipennis* and *N. trapidoi* was processed for evaluation of *Leishmania* infection. PCR amplification of *Leishmania* kDNA using the LV and B1 primer set and southern blot analysis were conducted as previously described (Vergel et al., 2005).

2.5.1. *Identification of* Leishmania *subgenus*

kDNA-positive samples were processed for identification of *Leishmania* subgenus by sequence analysis of the conserved block of *Leishmania* kDNA. Amplification products were obtained using a nested PCR reaction with the external primers, LVp1-Fw (5′-GAC ATG CCT CTG GGT AGG GGC GTT C-3′) and LVp1-Rv (5′-GGG TGG TAC GAT TTT GAC CCT AA-3′), and internal primers LVp1-Fw and LVp5-Rv (5′-CTG GGA TGC GCG GCC CAC TAT-3′). Two microliters of template DNA were used for the first PCR reaction under the following cycling conditions: 5 min at 95 °C, followed by 35 cycles, each of 1 min at 95 °C, 30 s at 62 °C and 30 s at 72 °C, and a final extension of 1 min at 72 °C (Rosales M, et al., submitted). PCR products were diluted 1:9 with ultrapure water and 2 μL of these dilutions were used as templates for the second PCR performed under the same cycling conditions described above, with an annealing temperature of 59 °C. PCR products were analyzed in a 1.2% agarose gel. Expected amplification products of 180 bp were purified and sequenced.

Table 1
Distribution of *W. rotundipennis* by location.

La Cabaña				
House	No. of males	No. of females		Total *Warileya*/ house
		With blood	Without blood	
1	211	44	17	272
2	141	8	47	196
3	36	3	6	45
4	18	14	4	36
5	2	0	0	2
6	0	7	3	10
7	60	8	3	71
8	3	0	0	3
Forest	15	0	4	19
Total	486	84	84	654

2.5.2. *Sequence analysis*

An 82 bp fragment spanning conserved blocks 1 to 2 from the *Leishmania* kDNA was analyzed. kDNA sequences from reference strains *L. V. panamensis* MHOM/PA/1971/LS94, *L. V. guyanensis* MHOM/BR/1975/M4147, and *L. V. braziliensis* MHOM/BR/1975/M2903, 15 clinical strains of *L. Viannia* derived from cryopreserved strains from the CIDEIM BioBank, including a strain isolated from the patient with active cutaneous leishmaniasis in "La Cabaña", sequences amplified from infected sand flies, and 25 kDNA sequences from *L. donovani*, *L. infantum*, *L. mexicana*, *L. amazonensis* and *L. tarentolae* retrieved from NCBI GenBank were included in the analysis (Supplementary Table 1). Multiple sequence alignment was conducted in BioEdit v7.2.5. Genetic distances were estimated by hierarchical clustering using the UPGMA method with Jukes-Cantor model and G distribution with the program MEGA6.

3. Results

3.1. Warileya rotundipennis *was the most prevalent species within households*

Five sand fly species were collected within eight of the nine houses comprising La Cabaña settlement. Among the 667 sand flies collected, the predominant species was *Warileya rotundipennis* ($n = 654$; 98.05%), followed by *Nyssomyia trapidoi* ($n = 7$; 1.04%); *Lutzomyia (Helcocyrtomyia) hartmanni* ($n = 3$; 0.44%); *Lutzomyia lichyi* ($n = 2$; 0.29%) and *Psychodopygus panamensis* ($n = 1$; 0.14%). Although the density and species of sand flies differed among the collections from each house, *W. rotundipennis* were collected inside of all eight houses (Table 1). The morphological features that established the taxonomic identity of the specimens of *Warileya* collected in La Cabaña are photographically documented in Fig. 1. Sand flies collected in houses 1, 2 and 7 represented 82.41% of the total collection of *W. rotundipennis*. In addition, seven females of *N. trapidoi* were collected including 5 without a blood meal (4 from a light trap placed in nearby forest and 1 indoors within house

UNCORRECTED PROOF

Please cite this article in press as: Moreno, M., et al., First report of *Warileya rotundipennis* (Psychodidae: Phlebotominae) naturally infected with *Leishmania* (*Viannia*) in a focus of cutaneous leishmaniasis in Colombia. Acta Trop. (2015), http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2015.04.017

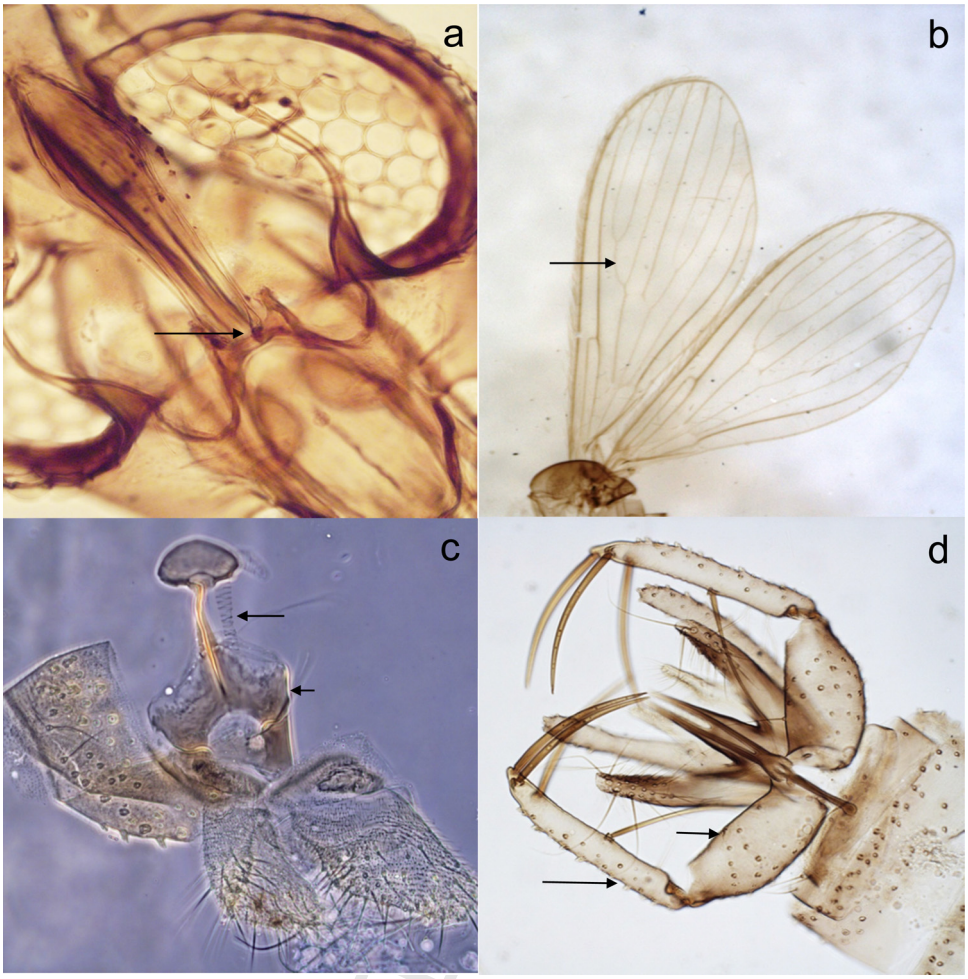


Fig. 1. Features establishing taxonomic identification of *Warileya rotundipennis*. (a) *Head*. Complete interocular suture and cibarium without bucal armadure. (b) *Wing*. Wide wing with rounded tip and slightly curved R2 + 3 wings vein. (c) *Female genitalia*. Spermatheca and genital fork. (d) *Male genitalia*. Style longer than the coxite.

no. 8); one gravid female was captured in the forest and 1 blood-engorged female was captured indoors within house no. 2). Three of these *N. trapidoi* specimens were individually processed by molecular techniques. The other four specimens were used for taxonomic confirmation.

3.2. Warileya rotundipennis *demonstrated high anthropophilia and predominance in intradomiciliary collections*

Collected *W. rotundipennis* were composed of 74.3% males and 25.7% females. Fifty percent of females (84/168) presented ingested blood. Blood sources were identified by DNA sequencing of the *CytB* gene amplified from 63 sand flies. Humans were the predominant blood source (60/63; 95.23%), followed by one blood source identified each from *Bos taurus* (1.58%), *Myotomys* sp (1.58%) and *Choloepus didactylus* (1.58%). *W. rotundipennis* captured during two independent collections carried out in May and August comprised 38.37% and 61.62%, respectively, of the total collection of this species. The number of males collected was consistently higher than that of females, reaching a proportion of 5:1 during the dry season (336 males vs. 67 females in August) and 1.5:1 during the wet season (150 males vs. 101 females in May).

3.3. Warileya rotundipennis *and* Nyssomyia trapidoi *were naturally infected with* Leishmania *(*Viannia*)*

The prevalence of infection of *W. rotundipennis* with *Leishmania* based on detection of *Leishmania* kDNA by PCR coupled with southern blot was 3% (5/168 females evaluated) (Figs. 2 and 3). Two of the five infected sand flies contained human blood and one had fed on a sloth; the other two infected sand flies were not blood engorged, confirming natural infection of *Warileya* with *Leishmania*. Positive sand flies were collected within houses number 1, 2 and 7 (Table 1).

Additionally, two of the three analyzed females of *N. trapidoi*, a recognized vector of *L. Viannia* species, were positive for *Leishmania* kDNA. The latter finding, confirms infection of this vector species in the forest setting of this community.

3.4. *Subgenus determination of the infecting* Leishmania

The electrophoretic mobility of the sequence amplified from reference strains of different species of *Leishmania* (Fig. 2) and that of the sequences amplified from *Warileya rotundipennis* (Fig. 3) and *N. trapidoi* specimens collected in the community "La Cabaña" supported the identity of the *Leishmania* infecting the vectors as that of a species of the *Viannia* subgenus.

In order to further substantiate the relationship between the *Leishmania* infecting the human population and the sand flies collected within households, specimens of *W. rotundipennis* and *N. trapidoi* that were positive for *Leishmania* kDNA by PCR-Southern blot were subsequently examined by sequence analysis of the conserved region of *Leishmania* kDNA. Among the kDNA positive sand fly specimens, analyzable sequences were obtained for one blood engorged *W. rotundipennis* and one gravid *N. trapidoi*. Genetic

Please cite this article in press as: Moreno, M., et al., First report of *Warileya rotundipennis* (Psychodidae: Phlebotominae) naturally infected with *Leishmania* (*Viannia*) in a focus of cutaneous leishmaniasis in Colombia. Acta Trop. (2015), http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2015.04.017

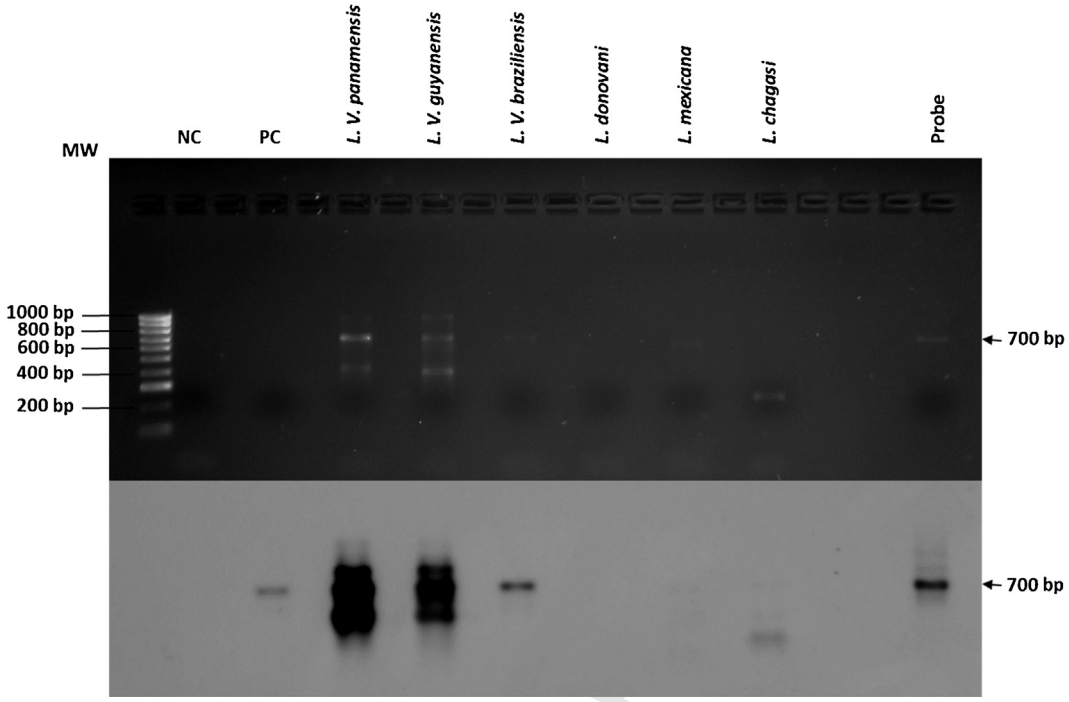


Fig. 2. Specificity of detection of *Leishmania* kDNA. Agarose electrophoresis of kDNA amplification products and southern blot hybridization using *L. V. panamensis* probe in *Viannia* and *Leishmania* subgenus reference strains. MW: Molecular weight marker; NC: Negative control (water); PC: Positive control (*L. V. panamensis*); strains of *Viannia* subgenus: *L. V. panamensis, L. V. braziliensis; L. V. guyanensis;* strains of *Leishmania* subgenus: *L. donovani; L. mexicana* and *L. chagasi.* A non-specific band (200–300 bp) was detected in the *L. chagasi* strain.

diversity analysis grouped both samples within the *L. Viannia* subgenus (Fig. 4) confirming that the sand flies harbored *Leishmania* belonging to the same subgenus as parasites obtained from patients.

4. Discussion

The genus *Warileya* Hertig 1948, native to the Americas, was first recognized during an entomological study by Hertig, Herrer and Puertas in 1937 in the Rimac Valley, Peru (Hertig, 1948). The reported distribution of the genus *Warileya* includes Costa Rica, Panama and Colombia (Fairchild and Hertig, 1959; Young and Chaniotis, 1972) at elevations between 35 and 690 m.a.s.l. Currently, the known distribution extends from Costa Rica to Bolivia (Young and Duncan, 1994) and consists of 9 species: *W. rotundipennis* Fairchild & Hertig 1951, *W. nigrossaculus* Fairchild & Hertig 1951, *W. fourgassiensis* Le Pont & Desjeux 1984, *W. hertigi* (Fairchild 1949), *W. phlebotomanica* Hertig 1948; *W. yungasi* Velasco & Trapido 1974 *W. lumbrerasi* Ogusuku, Pérez, Davies & Villaseca, 1996, *W. euniceae* Fernandez, Carbajal; Astete & Wooster, 1998 and *W. leponti* Galati & Caceres, 1999. In Colombia, two species of *Warileya* have been reported, *W. nigrossaculus* and *W. rotundipennis* (Bejarano, 2006). The latter species has been recorded in the departments of Antioquia, Chocó, Norte de Santander, Risaralda, Valle del Cauca (Bejarano, 2006) and Tolima (Contreras et al., 2012), all of which present endemic foci of cutaneous leishmaniasis.

The ubiquity and predominance of *W. rotundi*pennis, which represented 98% of the phlebotomines collected in the "La Cabaña" community during wet and dry seasons, together with the focal abundance in three houses, and higher proportion of males, suggests the presence of breeding sites near homes. The high frequency of human blood detected in blood engorged *Warileya* demonstrated the anthropophilic behavior of *W. rotundipennis*, and may be expected for captures within households. Blood meal analysis of sand flies captured indoors also demonstrated feeding of this sand fly species on a sloth, a known sylvatic reservoir host.

The amplification of *Leishmania* kDNA from *W. rotundipennis* with and without ingested blood demonstrates feeding of the

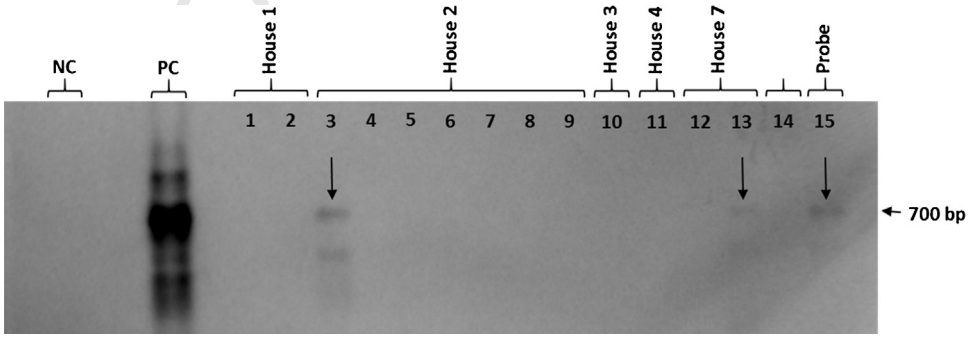


Fig. 3. Southern hybridization of DNA samples of *Warileya rotundipennis collected* in "La Cabaña". NC: Negative control (water); PC: Positive control (*L. V. panamensis*); Lane 1–2: *W. rotundipennis* (blood-engorged); Lane 3–9: *W. rotundipennis* (blood-engorged); Lane 10: *W. rotundipennis* (blood-engorged); Lane 11: *W. rotundipennis* (blood-engorged); Lane 12–13: *W. rotundipennis* (blood-engorged); Lane 14: No sample; Lane 15: *L. V. panamensis* probe.

Please cite this article in press as: Moreno, M., et al., First report of *Warileya rotundipennis* (Psychodidae: Phlebotominae) naturally infected with *Leishmania* (*Viannia*) in a focus of cutaneous leishmaniasis in Colombia. Acta Trop. (2015), http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2015.04.017

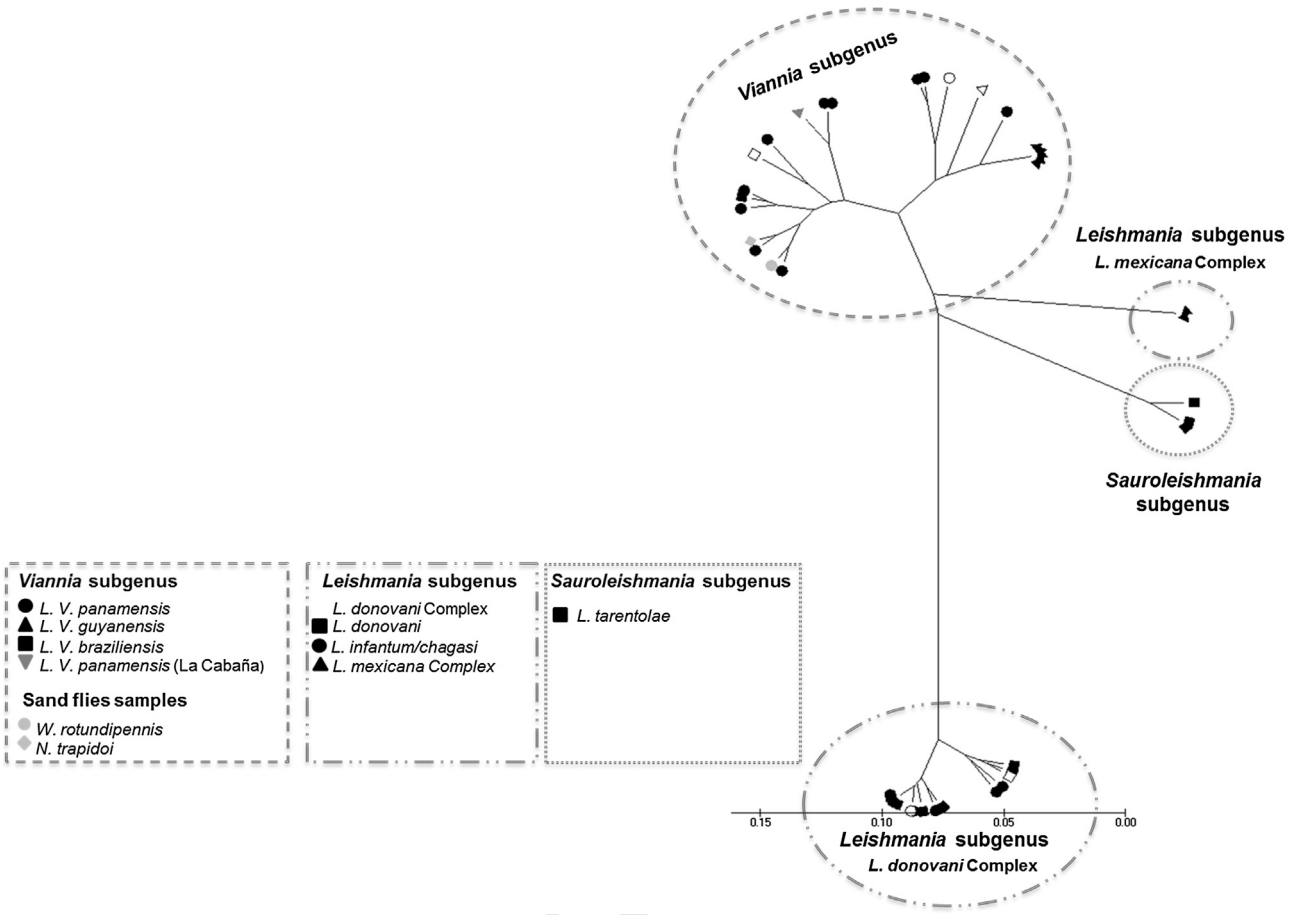


Fig. 4. Subgenus identification of *Leishmania* present in *W. rotundipennis* and *N. trapidoi* by genetic diversity analysis. An 82 bp sequence spanning conserved blocks 1 to 2 from *Leishmania* kDNA was used for multiple sequence alignment and analysis of genetic diversity. Genetic distances were estimated by hierarchical clustering using UPGMA method with Jukes-Cantor model and G distribution. The DNA samples of *W. rotundipennis*, *N. trapidoi* and a patient with cutaneous leishmaniasis from La Cabaña grouped within the *L. Viannia* subgenus. Open symbols represent sequences from reference strains of the corresponding subgenus. Subgenus clusters are delimited by the boxes and circles in dotted, dashed, dot-dashed line format.

putative vector species on infected hosts. The demonstration of *Leishmania* after elimination of the bloodmeal in collected sand fly specimens constitutes compelling evidence of infection. The presence of *Leishmania* in blood engorged sand flies is consistent with parasites being present in the bloodmeal taken on either or both humans and sloth, but could also indicate infection prior to the bloodmeal. In either case, the findings suggest the involvement of humans and a sylvatic reservoir in transmission cycle. The presence of parasites pertaining to the *Viannia* subgenus by kDNA amplification and sequence analysis concurred with the identity of parasites from inhabitants of "La Cabaña" thereby linking the infection in the putative vector with the parasite involved in transmission of cutaneous leishmaniasis in the human population (Fig. 4).

Among the five species of phlebotomines identified in this setting of domestic transmission of cutaneous leishmaniasis, *N. trapidoi* and *Ps. panamensis* have been previously incriminated as vectors of *Leishmania braziliensis* and *Leishmania panamensis*, respectively (Morales et al., 1981; Hashiguchi et al., 1985; Travi et al., 1988; Jaramillo et al., 1994; Rodriguez et al., 1999; Christensen et al., 1983). Although *N. trapidoi* was found infected with *Leishmania* of the *Viannia* subgenus in this study, the limited number of specimens of this species found inside of houses contrasted with the marked abundance of *W. rotundipennis.*

The use of molecular strategies has facilitated the analysis of the relationships among vectors and reservoirs involved in the transmission of leishmaniasis. The *Cyt*B gene has been widely used to identify blood meals (Berry et al., 2000; Svobodová et al., 2009). The detection of blood from sylvatic mammalian species among the blood engorged sand flies collected in the study site demonstrated that the methodology could discern diverse blood sources present in the area. Nevertheless, in order to fully understand the feeding behavior of this species, sand fly populations in peridomestic and forest settings will need to be examined. Although PCR-based detection of *Leishmania* kDNA is highly sensitive, kDNA does not allow identification at the species level for parasites of the *Viannia* subgenus. Southern blot hybridization using *Viannia*-subgenus specific probes, coupled to the use of genetic diversity analysis based on sequence polymorphisms within the conserved region of *Leishmania* kDNA allowed confident identification of parasites found within sand flies as pertaining to the *Viannia* subgenus.

The number of species of phlebotomines present in the tropics (350 species reported) challenges the incrimination of vector species in the innumerable and diverse settings of transmission of *Leishmania* (Young and Duncan, 1994; Arias et al., 1996). According to Killick-Kendrick (1990), there are four basic criteria for vector incrimination: (1) anthropophilic behavior; (2) abundance in the environment and at the time the disease is transmitted; (3) identification of the same species of parasite from the insect vector and the affected human population and (4) experimental infection and transmission of the parasite to a susceptible mammal. The first three criteria can be established through field studies and molecular analysis. However, experimental infection is difficult to achieve because of the diverse, commonly insurmountable challenges and

Please cite this article in press as: Moreno, M., et al., First report of *Warileya rotundipennis* (Psychodidae: Phlebotominae) naturally infected with *Leishmania* (*Viannia*) in a focus of cutaneous leishmaniasis in Colombia. Acta Trop. (2015), http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2015.04.017

logistics and costs of colonizing and maintaining of species of sand flies in foci of transmission.

Recognizing the limitations to achieving experimental infection and transmission (Killick-Kendrick, 1990), Killick–Kendrick further asserted that anthropophilia and infection with the same parasite in the human population were the most critical criteria in incriminating vector species in a given setting of transmission. Identification of species of *Leishmania* from vectors has also been constrained by the need to isolate the parasite from one or more of the small proportion of sand flies that are normally found to be infected, ranging from 0.001 to 2.26% for *Leishmania Viannia* transmission (Perez et al., 1994).

Molecular methods have since provided alternative approaches that obviate the need to isolate the parasite while also facilitating the evaluation of infection in sand flies within the natural context of transmission. Based on the previously mentioned and generally accepted criteria, the predominance of humans as blood source (anthropophilia), the abundance of *Warileya rotundipennis* within households in both wet and dry seasons, and their infection with *Leishmania* of the same subgenus affecting the human population fulfill all criteria for vector incrimination except experimental infection and transmission to a susceptible host. Hence, the evidence supports the participation of this previously unsuspected species in the transmission of cutaneous leishmaniasis in the domestic setting of "La Cabaña".

Financial support

This study was supported in part by contract No IZ70Z0131421 Q4 from the Swiss National Science Foundation and COLCIENCIAS Contract No. 252-2010. MM was supported by the Young Investigators and Innovators program of the National Administrative Department of Science, Technology and Innovation—COLCIENCIAS Contract 040-2012 (525-2011).

Acknowledgments

We gratefully acknowledge the technical and logistical support of the Secretary of Health of the Department of Risaralda in providing access to the area and assisting in the conduct of fieldwork, Dairo Marin for his support in the collection of sand flies and demographic, epidemiological and entomological surveys; Carlos Valderrama for assistance in georeferencing and the personnel of the CIDEIM Biostatistics' and Epidemiology Unit in for data management, and Maryori Vidarte and support staff of the CIDEIM BioBank for managing and typing *Leishmania* strains and Catalina Marceló, COLCIENCIAS young investigator - INS Entomology Laboratory, for assistance in the photographic documentation of morphological characteristics to support the identification of specimens of the genus *Warileya*.

References

Ampuero, J., Urdaneta, M., Macêdo, V.d.O., 2005. Factores de riesgo para la transmisión de leishmaniasis cutánea en niños de 0 a 5 años en un área endémica de *Leishmania (Viannia) braziliensis*. Cad Saúd Pública 21 (1), 161–170.

Arias, J., Beltrán, F., Desjeux, P., Walton, B., 1996. Epidemiología y control de la leishmaniasis en las Américas, por país o territorio. OPS cuaderno técnico, vol. 44. OPS. Q5

Bejarano, E.E., 2006. Lista actualizada de los psicódidos (Diptera: Psychodidae) de Colombia. Fol Entomol Mex 45 (1), 47–56.

Berry, E.A., Guergova-Kuras, M., Huang, L-s., Crofts, A.R., 2000. Structure and function of cytochrome bc complexes. Ann. Rev. Biochem. 69 (1), 1005–1075. Q6

Christensen, H.A., Fairchild, G.B., Herrer, A., Johnson, C.M., Young, D.G., Vásquez, A.M.d., 1983. The ecology of cutaneous leishmaniasis in the Republic of Panama. J. Med. Entomol. 20 (5), 463–484.

Contreras, M.A., Vivero, R.J., Bejarano, E.E., Carrillo, L.M., Vélez, I.D., 2012. Nuevos registros de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) en el área de influencia del río Amoyá en Chaparral, Tolima. Biomédica 32 (2), 263–268.

Fairchild, G., Hertig, M., 1948. An improved method for mounting small insects. Science (New York, NY) 108 (2792), 20–21.

Fairchild, G.B., Hertig, M., 1959. Geographic distribution of the Phlebotomus sandflies of Central America (Diptera: Psychodidae). Ann. Entomol. Soc. Am. 52 (2), 121–124.

Ferro, C., Marín, D., Góngora, R., Carrasquilla, M.C., Trujillo, J.E., Rueda, N.K., et al., 2011. Phlebotomine vector ecology in the domestic transmission of American cutaneous leishmaniasis in Chaparral, Colombia. Am. J. Trop. Med. Hyg. 85 (5), 847–856.

Gage, K.L., Burkot, T.R., Eisen, R.J., Hayes, E.B., 2008. Climate and vectorborne diseases. Am. J. Prev. Med. 35 (5), 436–450.

Galati, E.A.B., 2003. Morfologia e Taxonomía. In: Rangel, Elizabeth, Lainson, Ralph (Eds.), Flebotomineos do Brasil. Editora FIOCRUZ, Rio de Janeiro.

Hashiguchi, Y., Goméz, L.E., De Coronel, V.V., Mimori, T., Kawabata, M., 1985. Natural infections with promastigotes in man-biting species of sand flies in leishmaniasis-endemic areas of Ecuador. Am. J. Trop. Med. Hyg. 34 (3), 440–446.

Hertig, M., 1948. A new genus of bloodsucking Psychodids from Peru (Diptera: Psychodidae). Ann. Entomol. Soc. Am. 41, 8–16.

Jaramillo, C., Travi, B.L., Montoya, J., 1994. Vector competence of some Neotropical sandflies for the *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* complex. Med. Vet. Entomol. 8 (1), 1–7.

Killick-Kendrick, R., 1990. Phlebotomine vectors of the leishmaniases: a review. Med. Vet. Entomol. 4 (1), 1–24.

Maroli, M., Feliciangeli, M., Bichaud, L., Charrel, R., Gradoni, L., 2013. Phlebotomine sandflies and the spreading of leishmaniases and other diseases of public health concern. Med. Vet. Entomol. 27 (2), 123–147.

Molaei, G., Andreadis, T.G., Armstrong, P.M., Anderson, J.F., Vossbrinck, C.R., 2006. Host feeding patterns of *Culex* mosquitoes and West Nile virus transmission, northeastern United States. Emerg. Infect. Dis. 12 (3), 468.

Molaei, G., Andreadis, T.G., Armstrong, P.M., Diuk-Wasser, M., 2008. Host-feeding patterns of potential mosquito vectors in Connecticut, USA: molecular analysis of bloodmeals from 23 species of *Aedes*, *Anopheles*, *Culex*, *Coquillettidia*, *Psorophora*, and *Uranotaenia*. J. Med. Entomol. 45 (6), 1143–1151.

Morales, A., Corredor, A., Cáceres, E., Ibagos, A.L., de Rodríguez, C., 1981. Aislamiento de tres cepas de *Leishmania* a partir de *Lutzomyia trapidoi* en Colombia. Biomédica 1 (4), 198–207.

Perez, P., Enrique, J., Ogusuku, E., Inga, R., Lopez, M., Monje, J., Paz, L., et al., 1994. Natural *Leishmania* infection of *Lutzomyia* spp. in Peru. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 88 (2), 161–164.

Peterson, A.T., Shaw, J., 2003. Lutzomyia vectors for cutaneous leishmaniasis in Southern Brazil: ecological niche models, predicted geographic distributions, and climate change effects. Int. J. Parasitol. 33 (9), 919–931.

Rodriguez, N., Aguilar, C., Barrios, M., Barker, D., 1999. Detection of *Leishmania braziliensis* in naturally infected individual sandflies by the polymerase chain reaction. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 93 (1), 47–49.

Svobodová, M., Alten, B., Zídková, L., Dvořák, V., Hlavačková, J., Myšková, J., et al., 2009. Cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania infantum* transmitted by *Phlebotomus tobbi*. Int. J. Parasitol. 39 (2), 251–256.

Travi, B.L., Montoya, J., Solarte, Y., Lozano, L., Jaramillo, C., 1988. Leishmaniasis in Colombia. I: Studies on the phlebotomine fauna associated with endemic foci in the Pacific Coast region. Am. J. Trop. Med. Hyg. 39 (3), 261–266.

Valderrama-Ardila, C., Alexander, N., Ferro, C., Cadena, H., Marín, D., Holford, T.R., et al., 2010. Environmental risk factors for the incidence of American cutaneous leishmaniasis in a sub-Andean zone of Colombia (Chaparral, Tolima). Am. J. Trop. Med. Hyg. 82 (2), 243–250.

Vergel, C., Walker, J., Saravia, N.G., 2005. Amplification of human DNA by primers targeted to *Leishmania* kinetoplast DNA and post-genome considerations in the detection of parasites by a polymerase chain reaction. Am. J. Trop. Med. Hyg. 72 (4), 423–429.

Young, D.G., Chaniotis, B.N., 1972. The male of *Warileya nigrosacculus* (Diptera: Psychodidae). Flor. Entomol. 9, 7–9.

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, Gainesville, FL.

Young, D.G., 1979. A review of the bloodsucking psychodid flies of Colombia (Diptera: Phlebotominae and Sycoracinae). In: DTIC Document.

UNCORRECTED PROOF

Please cite this article in press as: Moreno, M., et al., First report of *Warileya rotundipennis* (Psychodidae: Phlebotominae) naturally infected with *Leishmania* (*Viannia*) in a focus of cutaneous leishmaniasis in Colombia. Acta Trop. (2015), http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2015.04.017

ANEXO 4. Manuscrito "Parasitological confirmation and analysis of Leishmania diversity in asymptomatic and subclinical infection following resolution of cutaneous leishmaniasis". Sometido a la revista PLOS Neglected Tropical Diseases en Febrero de 2015.

Parasitological confirmation and analysis of *Leishmania* diversity in asymptomatic and subclinical infection following resolution of cutaneous leishmaniasis.

Mariana Rosales[1], Rafael Gongora[1], Liliana Valderrama[1], Jimena Jojoa[1], Neal Alexander[1], Luisa Rubiano[1], Alexandra Cossio[1], Emily Adams[2], Nancy Saravia[1], María Adelaida Gomez[1*]

[1] Centro Internacional de Entrenamiento e Investigaciones Médicas-CIDEIM, Cali-Colombia

[2] Liverpool School of Tropical Medicine, Centre for Applied Health Research, Liverpool, United Kingdom

Running Title: *Leishmania* diversity in subclinical infections

* Corresponding author:

Maria Adelaida Gomez,

Tel: +57 (2) 5552164.

Fax: +57(2) 5552638

E-mail address: mgomez@cideim.org.co

ABSTRACT

Background: The contribution of individuals with subclinical infection to the transmission and endemicity of cutaneous leishmaniasis (CL) is unknown. Immunological evidence of exposure to *Leishmania* in residents of endemic areas has been the basis for defining the human population with asymptomatic infection. However, parasitological confirmation of subclinical infection is lacking.

Methods: We investigated the presence and viability of *Leishmania* in blood and non-invasive mucosal tissue samples from individuals with immunological evidence of subclinical infection in endemic areas for CL in Colombia. Detection of *Leishmania* kDNA was conducted by PCR-Southern Blot, and parasite viability was confirmed by amplification of parasite 7SLRNA gene transcripts. We developed a molecular tool for genetic diversity analysis of parasite populations causing persistent subclinical infection based on PCR amplification and sequence analysis of an 82bp region between kDNA conserved blocks 1 and 2.

Principal Findings: Persistent *Leishmania* infection was demonstrated in 40% (46 of 114) of leishmanin skin test (LST) positive individuals without active disease; parasite viability was established in 59% (27 of 46). Parasite burden quantified from circulating blood monocytes, nasal, conjunctiva or tonsil mucosal swab samples was comparable, and ranged between 0.2 to 22 parasites per reaction. kDNA sequences were obtained from samples from 28 individuals with subclinical infection, allowing genetic distance analysis that revealed diversity among sequences and clustering within the *L. Viannia* subgenus.

Conclusions: Our results provide parasitological confirmation of persistent infection among residents of endemic areas for CL who have experienced asymptomatic infection or recovered from CL, revealing a reservoir of infection potentially contributing to the endemicity and transmission of disease. kDNA genotyping establishes proof-of-principle of the feasibility of genetic diversity analysis in previously inaccessible and unexplored parasite populations in subclinically infected individuals.

AUTHOR SUMMARY

A variable and often high proportion of individuals residing in areas where cutaneous leishmaniasis is endemic are exposed to and become infected with *Leishmania* parasites, yet do not develop symptoms of disease. The role of this asymptomatically infected population in the transmission of disease is unknown, and could potentially interfere with the effectiveness of community or population-based control measures. Exposure to *Leishmania* is indirectly assessed by immunological tests; however, immunological evidence does not discriminate between historical exposure to the parasite and actual presence of parasites without causing clinical disease manifestations. We sought to

determine whether viable *Leishmania* are present in individuals with immunological evidence of asymptomatic infection. Our results showed that at least 40% of individuals having immunological evidence of subclinical infection harboured *Leishmania*. These individuals may be at risk of activation of disease, or could represent an unperceived reservoir of parasites for vector-borne transmission. Characterization of *Leishmania* causing asymptomatic infection has not been possible due to technical limits of detection of parasites in low grade infections. We developed a molecular method that allows genotypic analysis of parasites involved in subclinical infection and potentially provides a means to assess their involvement in transmission.

INTRODUCTION

Asymptomatic dermal or visceral leishmaniasis (VL) constitute a variable and sometimes high proportion of the naturally infected population in endemic foci of *Leishmania* transmission, ranging from 17 to 91% of incident infections [1-3]. Although xenodiagnosis has shown that sand flies can acquire infection from asymptomatic dogs in different settings of *L. infantum* transmission [4-6], and even from vaccinated dogs [7], the epidemiological impact of asymptomatic infection in the transmission of leishmaniasis is unknown. Parasite persistence and viability have been demonstrated after treatment and clinical resolution of disease [8,9], supporting the possibility that subclinically infected individuals can accumulate to constitute an important, unrecognized proportion of the population in endemic foci.

Prospective population-based studies of the natural history of cutaneous leishmaniasis (CL) in the Pacific coast and North-central regions in Colombia, and the Peruvian Andes showed that leishmanin skin test (LST) reactivity and presence of scars compatible with history of CL, were risk factors for development of new active lesions [1,3,10]. Hence, re-activation of prior infection, whether clinically apparent or subclinical, is a source of incident disease. Attention has only recently focused on understanding host, parasite, entomological and epidemiological determinants of subclinical infection in order to enlighten the development of strategies for disease prevention and control. [2].

Consensus criteria for subclinical or asymptomatic human infection are currently unavailable primarily due to lack of a means to differentiate immunologically sensitizing exposure to *Leishmania,* from persistent infection. Screening for delayed type hypersensitivity response to *Leishmania* antigen or *in vitro* expansion of memory T cells, and serological reactivity (in the case of asymptomatic VL) are used to define the infected population in endemic settings. However, immunological reactivity may not be indicative of a persistent infection. Parasitological demonstration of asymptomatic infection has not been achieved in the context endemic exposure to transmission of cutaneous leishmaniasis. Access to parasitological evidence of infection and quantitative data on infection may allow modeling to make projections of potential impact [11] and assessment

of the epidemiological contribution of persistent subclinical infection (following asymptomatic infection or successful treatment of symptomatic infection) to transmission.

Detection of parasite DNA and RNA by molecular methods have demonstrated respectively, the presence and viability of *Leishmania* after clinical cure [8,9], and in clinically normal mucosal tissues and peripheral blood monocytes during active disease [12]. To date, the development and use of molecular detection methods has been focused on determining the presence of *Leishmania,* and quantifying parasite burden in clinical samples. Robust molecular tools for in-depth analysis of *Leishmania* genome/transcriptome or genetic diversity such as next generation sequencing and multilocus microsatellite typing (MLMT) require isolation of, or abundant parasites in tissue samples for adequate performance and in order to obtain informative results. These requirements have impeded the analysis of samples with low parasite burden such as those from subclinically infected individuals. PCR-based methods targeting polymorphic high copy number coding or non-coding DNA sequences including kDNA, *GP63*, and cysteine peptidase b, among others [13], have partially overcome this impediment. However, standardized side-to-side comparisons between the novel and validated methods for diversity analysis including MLMT or isoenzyme typing have not been conducted.

This investigation sought to demonstrate the presence and viability of *Leishmania* in blood and non-invasive mucosal tissue samples from LST positive individuals without active disease, and to design a molecular tool for genetic diversity analysis of *Leishmania* involved in subclinical infection. Parasitological demonstration of subclinical infection in individuals residing in foci of transmission, and the feasibility of molecular characterization of *Leishmania* populations found in persistent subclinical infection, provide bases to evaluate the contribution of the human population in the persistence and dissemination of CL.

METHODS

Ethics statement. This study was approved and monitored by the Institutional Review Board for Ethical Conduct of Research Involving Human Subjects of the Centro Internacional de Entrenamiento e Investigaciones Médicas (CIDEIM) with approval code CIEIH1104, in accordance with national and international guidelines. All individuals voluntarily participated in the study. Written informed consent was obtained from each participant over 18 years of age. For children, informed consent was signed by the accompanying parent, and assent was signed by children over 7 years of age.

Study Design. This descriptive study was conducted in two phases. An initial exploratory phase to determine the feasibility of molecular detection of persistent subclinical infection, which evaluated the presence of *Leishmania* kDNA in blood and mucosal swab samples

from members of five family households of rural areas of Tumaco (Nariño, Colombia), endemic for *L. Viannia* infections. Families/households were selected based on the presence of one household member (index case) with a parasitologically confirmed prior history of active disease as well as presence of compatible scars and positive leishmanin skin test reaction (LST), at least one co-habitant with asymptomatic infection based on LST reactivity in the absence of active or healed lesions, and a minimum of four co-habitants. In the second phase a larger scale assessment was designed to 1) assess the demonstrable presence of *Leishmania* in immunologically defined asymptomatic infection, and 2) to evaluate the persistence, viability and genotypic diversity of *Leishmania* among asymptomatically infected individuals and those with subclinical infections following prior symptomatic CL. This study was conducted in areas of endemic transmission of cutaneous leishmaniasis in the departments of Nariño and Risaralda in Colombia.

Following LST evaluation, the presence of parasites was assessed by PCR-Southern Blot for *Leishmania* kDNA in blood monocytes, aspirates of lesion scars, and swab samples from nasal, tonsil, and conjunctival mucosa [14]. Parasite viability was determined by qRT-PCR of the *Leishmania* 7SLRNA transcript [12], and genetic diversity of *Leishmania* was assessed by genotyping of the conserved region of the kDNA as described below.

Study subjects. 184 subjects participated in this study: 103 participants were residents of a rural community in Pueblo Rico, Risaralda, and 81 participants resided in rural communities of the municipality of Tumaco, Nariño. Study groups were defined as follows: 1) Subclinical infection classified as a) individuals with clinical history of disease (n=121) confirmed by a typical scar of CL [1], and b) asymptomatic infection (n=32), defined as residents of an endemic area of transmission of dermal leishmaniasis, having a positive LST and no evidence or history of dermal lesions; and 2) healthy LST negative participants (n=28) defined as individuals from endemic (n=23) or non-endemic areas (n=5) without history of leishmaniasis. Individuals with active parasitological confirmed CL (n=3) served as positive controls.

Clinical samples. Blood monocytes, lesion/scar aspirates and duplicate swab samples from tonsil, conjunctiva and nasal mucosa were obtained from each participant one time. Blood monocytes were separated from a 10 mL sample of peripheral blood using 1-Step™ Monocytes following the manufacturer´s protocol (Accurate Chemical & Scientific co.). Monocytes and lesion/scar aspirate samples were stored in TRIzol® Reagent at -70°C until processing. Mucosal swab samples were obtained, stored at -20°C until processing, and DNA extracted as previously reported [12,14]. RNA and DNA were extracted from blood monocytes using the AllPrep DNA/RNA Minikit (Qiagen). RNA was extracted from swab samples using TRIzol® followed by RNA cleanup using RNeasy extraction Kit (Qiagen). Purified RNA was treated with DNAse I. All RNA samples were suspended in a final volume of 35µl of nuclease free water. Quantity and quality of nucleic acids were evaluated using a NanoDrop2000 spectrophotometer.

Leishmania strains and kDNA sequences. Reference strains and clinical strains isolated

from patients with CL were obtained from the CIDEIM BioBank (Supplemental Table 1). All strains were typed by monoclonal antibodies and/or isoenzyme electrophoresis. Promastigotes were maintained at 26°C in RPMI medium supplemented with 10% heat-inactivated foetal bovine serum (Gibco), 1% glutamine, 100 U/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin. Logarithmic phase promastigotes were harvested by centrifugation, washed in phosphate-buffered saline (PBS), and solubilized in lysis buffer for DNA extraction. For the analyses of genetic diversity we also included kDNA sequences obtained from NCBI Genbank as summarized in Supplemental Table 1.

PCR-Southern Blot and qRT-PCR. L. Viannia kDNA was amplified from 100ng of DNA samples by PCR using the LV-B1 primers followed by Southern blot hybridization as previously described [15]. A 242 bp product of the human *GAPDH* gene was targeted for amplification from all samples as a quality control procedure, using the primers Fw (5'- CTG GCC CTC TGC CCT CCT ACC A -3') and Rv (5'- TTC CAT CCA GCC TGG GGC GAA -3'). kDNA positive samples were evaluated by real time PCR to confirm the viability of parasites and estimate parasite burden using the *Leishmania* 7SLRNA transcript as previously described and using 10µl of the RNA sample [12]. Human Tata Box Binding protein (TBP) was amplified with the primer set TBP Fw (5'- CAC GAA CCA CGG CAC TGA TT -3') and TBP Rv (5`- TTT TCT TGC CAG TCT GGA -3'). Specificity of the qRT-PCR products was assessed by analysis of the melt peak curve. Parasite burden was calculated by extrapolation to a standard curve and normalized to the number of human cells based on TBP expression. Real time detection of amplification products was performed using SYBR® Green Master Mix (Applied Biosystems) on a BioRad® CFX-96 detection platform. For those kDNA positive samples that were below the limit of detection of the 7SLRNA qRT-PCR, a maximum likelihood estimate of 0.0001 parasites per reaction (0.00357 parasites per swab) was calculated based on the assumption of 10,000 minicircle kDNA copies and 250 copies of the 7SLRNA transcript per organism [16,17], and the samples volumes for each assay [18].

kDNA genotyping. Leishmania strains and kDNA positive samples from study participants were processed for genetic diversity analyses based on sequence comparison of the conserved region of *Leishmania* kDNA. A Nested PCR was designed to amplify the conserved block of *Leishmania* kDNA. The external primers LVp1 Fw (5´- GAC ATG CCT CTG GGT AGG GGC GTT C -3´) and LVp1 Rv (5´- GGG TGG TAC GAT TTT GAC CCT AA -3´) were used for the first PCR reaction. Internal primers LVp1 Fw and LVp5 Rv (5´- CTG GGA TGC GCG GCC CAC TAT -3´) were used in the second PCR reaction. Each 25 µL of the first PCR reaction mixture contained 0,8 mM of dNTP, 0,04 U/µL Taq polymerase, 2 µL template DNA, 2.2 mM $MgCl_2$, 1 X PCR buffer, and 0,4 nM of LVp1-Fw and LVp1-Rv primers. The cycling reaction was as follows: 95 ºC for 5 min, followed by 35 cycles, each of 1 min at 95 ºC, 62 ºC for 30 sec and 72 ºC for 30 sec, and a final extension of 1 min at 72 ºC. The products of the first PCR were diluted 1:10 with ultrapure water and 2 µL of this dilution was used as template for the second PCR, which was performed under the conditions described above, except for the use of LVp1-Fw and Lvp5-Rv primer set

and an annealing temperature of 59 ºC. PCR products were separated in 1.3% agarose gels and products of approximately 180 bp were extracted and purified for the sequencing reaction using the QIAquick gel extraction kit (Qiagen). Specificity of the tool was evaluated using total DNA extracted from human PBMCs obtained from healthy donors. Negative controls included within each reaction were PCR mix and human PBMCs DNA. An 82bp fragment spanning conserved blocks 1 to 2 from the kDNA was selected for the analysis based on sequence variability in the inter-block regions. Multiple sequence alignment was conducted in BioEdit v7.2.5. Genetic distances were estimated by hierarchical clustering using UPGMA and neighbor joining methods with Jukes-Cantor model and G distribution. MEGA6 was used to construct trees from resulting distance matrixes.

Multilocus Microsatellite Typing (MLMT). DNA was extracted from log-phase promastigotes using DNeasy® Blood & Tissue Kit (Qiagen, USA). Fourteen microsatellites distributed in 13 *Leishmania* chromosomes were amplified by PCR, as previously described [19]. The size of the microsatellites was determined by mobility of the PCR products in 4.5% agarose gels. Genetic distances were estimated using MSA4.05 software and Populations-1.2.32, and neighbor joining and UPGMA trees were constructed using MEGA6.

Statistical analysis. D'Agostino and Pearson omnibus test was applied to determine parametric or non-parametric distribution of quantitative data. Parasite burden data was Log transformed and data distribution was evaluated on the transformed data set. Mann Whitney U-Test was employed for statistical comparisons. Statistical significance was defined as $p<0.05$. Data were analyzed using Prism 5 software (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA).

RESULTS

Parasitological demonstration of persistent subclinical infection following asymptomatic infection or clinical resolution of cutaneous leishmaniasis.

Amplification of human *GAPDH* gene in 95% (114 of 120) of the DNA samples obtained from the 30 participants in the exploratory phase corroborated the quality of the extracted DNA. All *GAPDH* negative samples corresponded to swab samples from conjunctiva, reflecting the difficulty to obtain a quality sample from this potentially informative tissue. *GAPDH* negative samples were excluded from further analysis. Four of the 5 individuals (80%) with prior history of CL (index case), and 6 of 15 individuals (40%) with asymptomatic infection had one or more kDNA positive samples, Table 1. kDNA positive samples from the index case and from one or more asymptomatic cohabitants were found in three of the five households, Table 1 (a representative blot of samples from members of one household is shown in Figure 1). These findings validate the technical feasibility of

kDNA detection and amplification from mucosal and blood monocyte samples presumably having low parasite burden, such as those from individuals with subclinical infection.

Based on the results of the exploratory analyses we proceeded to evaluate 154 individuals residing in CL endemic communities in Tumaco and Risaralda for presence of *Leishmania* kDNA. Amplification of human *GAPDH* gene was achieved in at least one sample from each of the 154 participants, representing a total of 78% of samples (504 of 647). One time sampling of study participants, and PCR of *Leishmania* kDNA followed by Southern blot hybridization revealed parasite persistence in 40% (46/114) of LST positive individuals without active disease (Table 2). Nineteen (12.5%) individuals had more than one kDNA positive sample. Molecular demonstration of the presence of *Leishmania* was more frequent among individuals who had clinical evidence of prior symptomatic infection (44%, 51 of 116) than among LST positive asymptomatically infected individuals (29% of 17). kDNA positive samples (from blood monocytes, tonsil and nasal mucosa) were also detected in 3 of 18 skin test negative healthy individuals from endemic areas, and in the three positive control cases with active disease. Blood monocytes were the most frequently positive sample for kDNA, being positive in 26% (33 of 127) of the total population without active disease, followed by nasal and tonsil swabs that were positive in 14% (21 of 145 and 18 of 129, respectively).

Quantification of parasite burden and demonstration of *Leishmania* viability

We quantified the parasite burden and assessed the viability of *Leishmania* among kDNA positive samples by detection of RNA transcripts of the *Leishmania* 7SLRNA gene. Transcripts of 7SLRNA were amplified from 59% of LST+ individuals in whom *Leishmania* kDNA had been detected, from 6 of 10 individuals with clinical history of CL with negative or unavailable LST results, and from 2 of 3 LST- healthy individuals from whom *Leishmania* kDNA was amplified (Table 2). Amplification of the human TATA box binding protein (TBP) gene transcript was successful in 90% of 84 kDNA positive samples, supporting the quality and reliability of the amplified RNA. Twenty-eight kDNA positive samples were below the limit of detection of the 7SLRNA qRT-PCR (10 from blood monocytes and 18 from mucosal swab samples). Absolute parasite loads in blood monocytes were slightly higher than those from mucosal swab samples (Figure 2A). However, parasite burden normalized to the number of human cells obtained in each sample was higher in mucosa compared to blood monocytes (Figure 2C), due to the higher number of human cells in blood samples (Figure 2B). The presence of parasite RNA transcripts substantiates the viability of *Leishmania* within the sampled tissues and among a high proportion of individuals with subclinical infection.

Leishmania diversity revealed by kDNA genotyping

To explore relationships among *Leishmania* in individuals with subclinical infection, and parasite strains isolated from patients with active disease within the same foci of

transmission, we developed a nested PCR approach targeting a 180bp segment of the conserved region of *Leishmania* kDNA spanning blocks 1 to 3. The lower limit of detection of the nested PCR was 10^{-3} promastigotes per reaction (Figure 3A). No cross-reactivity with human DNA was detected (Figure 3B). Alignment of *L. donovani, L. infantum/chagasi, L. mexicana, L. tarentolae, L. V. braziliensis, L. V. guyanensis* and *L. V. panamensis* kDNA sequences (Table S1) showed that regions between conserved blocks 1 and 2 were polymorphic among species and strains of the same species (Figure 4).

Comparative analysis of the genetic distances generated from MLMT data and kDNA genotyping of 34 *L. V. panamensis* and 9 *L. V. guyanensis* strains isolated from diverse locations within the Colombian territory (Table S1), revealed clustering of strains obtained from individuals in foci of active transmission in which strains were isolated during outbreaks of infection, thus delimiting strains by time and location (Figure 5). Nevertheless, subgroups defined by MLMT such as zymodemes 2.2 and 2.3 of *L. V. panamensis* were not clustered by kDNA genotyping, in line with the higher variability and rate of evolution of kDNA compared to microsatellite sequences [13,20].

Considering the reported variability of kDNA sequences among clinical strains [16,21] and possible variations introduced during the PCR or sequencing reactions, to assess the reproducibility of the method we re-amplified and re-sequenced DNA samples from 13 strains belonging to different species of the *Viannia* subgenus obtained from CIDEIM BioBank. As shown in Supplemental Figure 1, 100% sequence identity was obtained in two independent technical replicas in sequences from 10 of the 13 strains, and 99% sequence identity (corresponding to a 1bp change) in sequences from the remaining 3 strains. These results support the reproducibility of the method for analysis of *Leishmania* genetic diversity using clinical samples and strains.

kDNA genotyping of samples from individuals with subclinical infection

The intra-species variability of the target sequence, and the high sensitivity and specificity of the method for *Leishmania* kDNA, support the potential of kDNA genotyping for the analysis of clinical samples with low parasite burden. We attempted to sequence amplification products from the 84 kDNA positive samples. Thirty-two of these, corresponding to samples from 28 subclinically infected participants (26 with prior history of CL) were successfully amplified by the nested PCR and able to be sequenced. kDNA sequences were also obtained from *L. V. panamensis* strains isolated from the three patients with active CL.

Sequences were analyzed alongside a panel of representative *L. V. panamensis, L. V. guyanensis* and *L. V. braziliensis* strains from diverse geographical origins within the Colombian territory, and database sequences from *L. donovani and L. infantum/chagasi* as outgroups. As shown in Figure 6, genetic distance revealed clustering of strains according to *Leishmania* subgenus. kDNA sequences from individuals with subclinical infection grouped within the *L. Viannia* cluster. However, the relationship between *L. V. panamensis*

strains currently circulating in the focus of transmission and parasites involved in subclinical infections that have persisted over many years could not be discerned.

DISCUSSION

Asymptomatic infections are common to all transmissible agents, constituting a variable segment of the spectrum of outcomes. The frequency of these inapparent infections varies according to the pathogenicity of the agent and the susceptibility of the exposed population. Investigations of the incidence of infection based on LST conversion revealed that 90% of incident infections in a focus of *L. V. panamensis* transmission in the municipality of Tumaco, Colombia, were asymptomatic [1], whereas only 17% of infections were asymptomatic in a focus of *L. V. peruviana* transmission in Peru [3]. In the current study, LST reactivity provided an immunological marker for asymptomatic and subclinical infections, which were defined respectively as infections that result in skin test conversion but not disease, and persistent infection following clinical resolution of disease. Leishmanin reactivity induced by infection, whether symptomatic or asymptomatic is typically long-lived and presumably sustained by antigen exposure. The amplification of kDNA and 7SLRNA transcripts from a high proportion of LST+ individuals supports this assumption. Although the relevance of asymptomatic and subclinical infections to public health is poorly understood, the detection of *Leishmania* in the absence of active disease in 40% of LST+ and a small proportion of LST- residents of endemic foci of transmission of CL provides an indication of the substantial magnitude of the population harboring parasites. However, considering that sampling was conducted only one time and that tissue distribution and burden of parasites are likely to vary over time as shown with sequential samples of asymptomatic *L. chagasi* infection [22], and with the health status of each individual, the actual infected population is probably underestimated.

Subclinical infections represent a risk for reactivation and the triggering of pathogenesis. The recurrent behavior of dermal leishmaniasis in Latin America was clinically recognized in mucosal disease, long considered a secondary manifestation of prior cutaneous disease [23] or even prior asymptomatic infection [24]. Direct evidence of re-activation as a cause of recurrent leishmaniasis was provided by biochemical and genotypic analyses of *Leishmania* strains isolated from primary lesions and from new lesions following complete resolution of primary lesions [21]. Population-based studies in areas of endemic transmission have identified LST reactivity and presence of scars compatible with history of CL as important risk factors for development of new active lesions [1,3,10], underscoring the role of asymptomatic and subclinical infection in the epidemiology and natural history of CL. Our results documenting the long-term presence of viable *Leishmania* in blood monocytes and unaffected mucosal tissues in individuals with asymptomatic and subclinical infection support the indefinite persistence of *Leishmania* in the human host.

Through mechanistic mathematical modeling, Miller et.al. have recently shown that a small proportion of asymptomatically infected individuals (3.2%) with the highest parasitemias in VL endemic areas in Ethiopia, were responsible for infection of an average 62% of infected sand fly vectors [11]. This, together with lessons learned from investigations of the infectivity of asymptomatic and even vaccinated dogs for *Lu. longipalpis*, the principal vector of VL in the Americas, and from malaria elimination initiatives showing that asymptomatic carriers, in addition to being at risk of developing disease via reactivation of infection [25], can transmit infection to mosquitos [26,27], strongly support the plausibility of subclinically infected individuals as reservoirs for anthroponotic transmission of *L. Viannia* species. The importance of understanding the role of subclinical infection in the incidence and propagation of leishmaniasis has been recently recognized as a priority research area by the World Health Organization Expert Committee on the Control of the Leishmaniases [28].

A limiting factor in the study of subclinical infection is the technical feasibility for phenotypic and genotypic characterization of *Leishmania* from samples having low parasite burdens. To address this we developed a strategy for analysis of genetic diversity based on nested PCR amplification and sequence genotyping of the conserved region of *Leishmania* minicircle kDNA. The sensitivity of this strategy allowed amplification of *Leishmania* kDNA from mucosal swab samples and blood monocytes from 20% of individuals presenting immunological evidence of subclinical infection. kDNA genotyping of parasites in samples from these individuals has demonstrated the plausibility of approaching genotypic characterization of *Leishmania* causing subclinical infection.

Polymorphic regions within the conserved blocks of *Leishmania* kDNA minicircles were selected as targets for analysis based on 1) sensitivity of the strategy due to high abundance of kDNA and 2) polymorphic though not hypervariable regions, enabling diversity analysis based on genotyping. The developed methodology revealed diversity among *Leishmania* causing subclinical infection in endemic foci of transmission of *L. V. panamensis,* and clustering within the *L. Viannia* subgenus*.* Nevertheless, the limited number of active cases (n=3) and the level of heterogeneity in the amplified sequences did not allow relationships to be discerned between strains isolated from individuals with active disease at the time of the study and *Leishmania* persisting in the absence of disease. This could be due to variation in parasite populations during decades of transmission within the sites, or limitations of the genotyping methodology. Although comparative analysis of kDNA and MLMT genotyping in a panel of strains of *L. Viannia* species showed clustering of strains isolated from disease outbreaks to be achieved by both methodologies, phenotypically distinguishable strains (eg. *L. V. panamensis* strains pertaining to zymodemes 2.2 and 2.3) clustered by MLMT but not kDNA typing; micro-heterogeneity of kDNA sequences could impede the discernment of relationships among closely related parasites [29,30].

Our results provide parasitological confirmation of persistent infection in the absence of disease among residents of endemic areas of CL and a methodological approach to investigate the epidemiology and public health impact of subclinical infections. The novel exploitation of kDNA genotyping establishes proof-of-principle of the feasibility of genetic diversity analysis in parasite populations previously inaccessible and unexplored, and bases for more robust analyses of the relationships among these parasite populations.

ACKNOWLEDGEMENTS

We gratefully acknowledge the support of Wilson Cortes and Mary Luz Hurtado of the CIDEIM Clinical Unit in Tumaco, and Maryori Vidarte, Alejandra Arcos, Pilar Vargas and Isabel Guasaquillo of the CIDEIM BioBank, for isoenzyme and monoclonal antibody typing of the clinical strains included in this study. We also acknowledge the generous collaboration of the participants and their families. We thank the Secretary of Health of the Department of Risaralda (Secretaría de Salud Departamental de Risaralda) and staff of the Pueblo Rico Hospital for their technical and logistical support.

REFERENCES

1. Weigle KA, Santrich C, Martinez F, Valderrama L, Saravia NG Epidemiology of cutaneous leishmaniasis in Colombia: a longitudinal study of the natural history, prevalence, and incidence of infection and clinical manifestations. J Infect Dis. 1993, 168: 699-708.
2. Singh OP, Hasker E, Sacks D, Boelaert M, Sundar S Asymptomatic Leishmania infection: a new challenge for Leishmania control. Clin Infect Dis. 2014, 58: 1424-1429.
3. Davies CR, Llanos-Cuentas EA, Pyke SD, Dye C Cutaneous leishmaniasis in the Peruvian Andes: an epidemiological study of infection and immunity. Epidemiol Infect. 1995, 114: 297-318.
4. Molina R, Amela C, Nieto J, San-Andres M, Gonzalez F, et al. Infectivity of dogs naturally infected with Leishmania infantum to colonized Phlebotomus perniciosus. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1994, 88: 491-493.
5. Michalsky EM, Rocha MF, da Rocha Lima AC, Franca-Silva JC, Pires MQ, et al. Infectivity of seropositive dogs, showing different clinical forms of leishmaniasis, to Lutzomyia longipalpis phlebotomine sand flies. Vet Parasitol. 2007, 147: 67-76.
6. Laurenti MD, Rossi CN, da Matta VL, Tomokane TY, Corbett CE, et al. Asymptomatic dogs are highly competent to transmit Leishmania (Leishmania) infantum chagasi to the natural vector. Vet Parasitol. 2013, 196: 296-300.
7. Fernandes CB, Junior JT, de Jesus C, Souza BM, Larangeira DF, et al. Comparison of two commercial vaccines against visceral leishmaniasis in dogs from endemic areas: IgG, and subclasses, parasitism, and parasite transmission by xenodiagnosis. Vaccine. 2014, 32: 1287-1295.

8. Vergel C, Palacios R, Cadena H, Posso CJ, Valderrama L, et al. Evidence for leishmania (viannia) parasites in the skin and blood of patients before and after treatment. J Infect Dis. 2006, 194: 503-511.
9. de Oliveira Camera P, Junger J, do Espirito Santo Silva Pires F, Mattos M, Oliveira-Neto MP, et al. Haematogenous dissemination of Leishmania (Viannia) braziliensis in human American tegumentary leishmaniasis. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2006, 100: 1112-1117.
10. Munoz G, Davies CR Leishmania panamensis transmission in the domestic environment: the results of a prospective epidemiological survey in Santander, Colombia. Biomedica. 2006, 26 Suppl 1: 131-144.
11. Miller E, Warburg A, Novikov I, Hailu A, Volf P, et al. Quantifying the contribution of hosts with different parasite concentrations to the transmission of visceral leishmaniasis in Ethiopia. PLoS Negl Trop Dis. 2014, 8: e3288.
12. Romero I, Tellez J, Suarez Y, Cardona M, Figueroa R, et al. Viability and burden of Leishmania in extralesional sites during human dermal leishmaniasis. PLoS Negl Trop Dis. 2011, 4.
13. Schonian G, Kuhls K, Mauricio IL Molecular approaches for a better understanding of the epidemiology and population genetics of Leishmania. Parasitology. 2011, 138: 405-425.
14. Figueroa RA, Lozano LE, Romero IC, Cardona MT, Prager M, et al. Detection of leishmania in unaffected mucosal tissues of patients with cutaneous leishmaniasis caused by leishmania (viannia) species. J Infect Dis. 2009, 200: 638-646.
15. Vergel C, Walker J, Saravia NG Amplification of human DNA by primers targeted to Leishmania kinetoplast DNA and post-genome considerations in the detection of parasites by a polymerase chain reaction. Am J Trop Med Hyg. 2005, 72: 423-429.
16. Noyes HA, Reyburn H, Bailey JW, Smith D A nested-PCR-based schizodeme method for identifying Leishmania kinetoplast minicircle classes directly from clinical samples and its application to the study of the epidemiology of Leishmania tropica in Pakistan. J Clin Microbiol. 1998, 36: 2877-2881.
17. Michaeli S, Podell D, Agabian N, Ullu E The 7SL RNA homologue of Trypanosoma brucei is closely related to mammalian 7SL RNA. Mol Biochem Parasitol. 1992, 51: 55-64.
18. Solomon AW, Holland MJ, Burton MJ, West SK, Alexander ND, et al. Strategies for control of trachoma: observational study with quantitative PCR. Lancet. 2003, 362: 198-204.
19. Oddone R, Schweynoch C, Schonian G, de Sousa Cdos S, Cupolillo E, et al. Development of a multilocus microsatellite typing approach for discriminating strains of Leishmania (Viannia) species. J Clin Microbiol. 2009, 47: 2818-2825.
20. Lymbery AJ, Thompson RC The molecular epidemiology of parasite infections: tools and applications. Mol Biochem Parasitol. 2012, 181: 102-116.
21. Saravia NG, Weigle K, Segura I, Giannini SH, Pacheco R, et al. Recurrent lesions in human Leishmania braziliensis infection--reactivation or reinfection? Lancet. 1990, 336: 398-402.
22. dos Santos Marques LH, Gomes LI, da Rocha IC, da Silva TA, Oliveira E, et al. Low parasite load estimated by qPCR in a cohort of children living in urban area endemic for visceral leishmaniasis in Brazil. PLoS Negl Trop Dis. 2012, 6: e1955.
23. Marsden PD Mucosal leishmaniasis ("espundia" Escomel, 1911). Trans R Soc Trop Med Hyg. 1986, 80: 859-876.

24. Walton BC, Chinel LV, Eguia y Eguia O Onset of espundia after many years of occult infection with Leishmania braziliensis. Am J Trop Med Hyg. 1973, 22: 696-698.
25. Lindblade KA, Steinhardt L, Samuels A, Kachur SP, Slutsker L The silent threat: asymptomatic parasitemia and malaria transmission. Expert Rev Anti Infect Ther. 2013, 11: 623-639.
26. Bousema T, Okell L, Felger I, Drakeley C Asymptomatic malaria infections: detectability, transmissibility and public health relevance. Nat Rev Microbiol. 2014, 12: 833-840.
27. Kirchgatter K, Tubaki RM, Malafronte Rdos S, Alves IC, Lima GF, et al. Anopheles (Kerteszia) cruzii (Diptera: Culicidae) in peridomiciliary area during asymptomatic malaria transmission in the Atlantic Forest: molecular identification of blood-meal sources indicates humans as primary intermediate hosts. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 2014, 56: 403-409.
28. Control of the leishmaniasis: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniases, Geneva, 22-26 March 2010.
29. Pacheco RS, Martinez JE, Valderrama L, Momen H, Saravia NG Genotypic polymorphisms in experimental metastatic dermal leishmaniasis. Mol Biochem Parasitol. 1995, 69: 197-209.
30. Spithill TW, Grumont RJ, Mitchell GF Characterization of isolates and clones of Leishmania by analysis of kinetoplast DNA. J Cell Biochem. 1984, 24: 103-112.

FIGURE LEGENDS

Figure 1*. Detection of Leishmania kDNA in samples from individuals with subclinical or asymptomatic infection who share a household with a historic symptomatic case of CL***.** Southern blot detection of *Leishmania* kDNA. Lanes 1-6: Tonsil swabs; Lanes 7-12: conjunctival swabs; Lanes 13-18: nasal mucosa swabs; Lanes 19-24: blood monocytes. HI: History of CL, H: Healthy, A: Asymptomatic. The arrow denotes the 700bp band corresponding to the full length amplification product of *Leishmania* kDNA. The lower band represents an unspecific kDNA PCR product as confirmed by sequencing.

Figure 2. *Leishmania viability and parasite burden in kDNA positive samples*. Absolute quantification of *Leishmania* by 7SLRNA amplification **(A),** human cell quantification by TBP amplification **(B),** and relative parasite burden normalized to the number of human cells per sample **(C)** obtained from swab samples of nasal, tonsil and conjunctiva mucosa (n=47) and blood monocytes (n=35). Black circles represent LST+ individuals with clinical history of CL; open circles, LST+ individuals with asymptomatic infection; and grey circles, health LST- individuals from endemic area for CL. *p* values obtained from two tailed Mann-Whitney tests are shown.

Figure 3. *Sensitivity and specificity of the nested PCR for Leishmania kDNA*. Serial dilution curves of DNA from *L. V. panamensis* promastigotes **(A)** and human PBMCs **(B).** The upper panel shows the first amplification product of 700 bp obtained with LVp1 primer sets (external primers) and the bottom panel shows the 180 bp product of the nested PCR obtained with LVp1-LVp5 primer sets (internal primers).

Figure 4. *Analysis of Leishmania genetic diversity*. An 82bp sequence spanning conserved blocks 1 and 2 from the *Leishmania* kDNA was used for multiple sequence alignment and analysis of genetic diversity. Five strains or retrieved sequences were analyzed for each *Leishmania* species. Strain details are summarized in Supplemental Table 1. CB: Conserved Block.

Figure 5. *Genetic diversity analysis using kDNA genotyping allows clustering of strains isolated within foci of transmission during outbreaks of CL*. UPGMA trees of distances calculated from MLMT data **(A)** and kDNA genotyping **(B)**. Figure labels depict the geographical origin of strains within the Colombian territory. The shadows denote groups of strains isolated from foci of transmission during outbreaks of infection.

Figure 6. *Analysis of Leishmania genetic diversity in individuals with infection in the absence of disease.* Genetic distances were estimated by hierarchical clustering using the UPGMA method with Jukes -Cantor model and G distribution. Sequences from the three *L.V. panamensis* strains isolated from the Risaralda focus of transmission are depicted as solid yellow circles. Sequences of samples obtained from study participants are shown in triangles.

TABLES

Table 1. Demonstration of feasibility of detecting asymptomatic infection among household members co-habitating with a prior symptomatic case using PCR-Southern blot of *Leishmania* kDNA.

	At least one kDNA positive sample		
Family/ household	**Index Case Clinical history of leishmaniasis and LST+ (n/N)[a]**	**Asymptomatic infection, LST+ (n/N)[a]**	**Healthy individual from endemic area, LST- (n/N)[a]**
1	0/1	0/4	0/0
2	1/1	2/2	0/2
3	1/1	3/4	0/0
4	1/1	1/2	0/2
5	1/1	0/3	0/1
Total	**4/5**	**6/15**	**0/5**

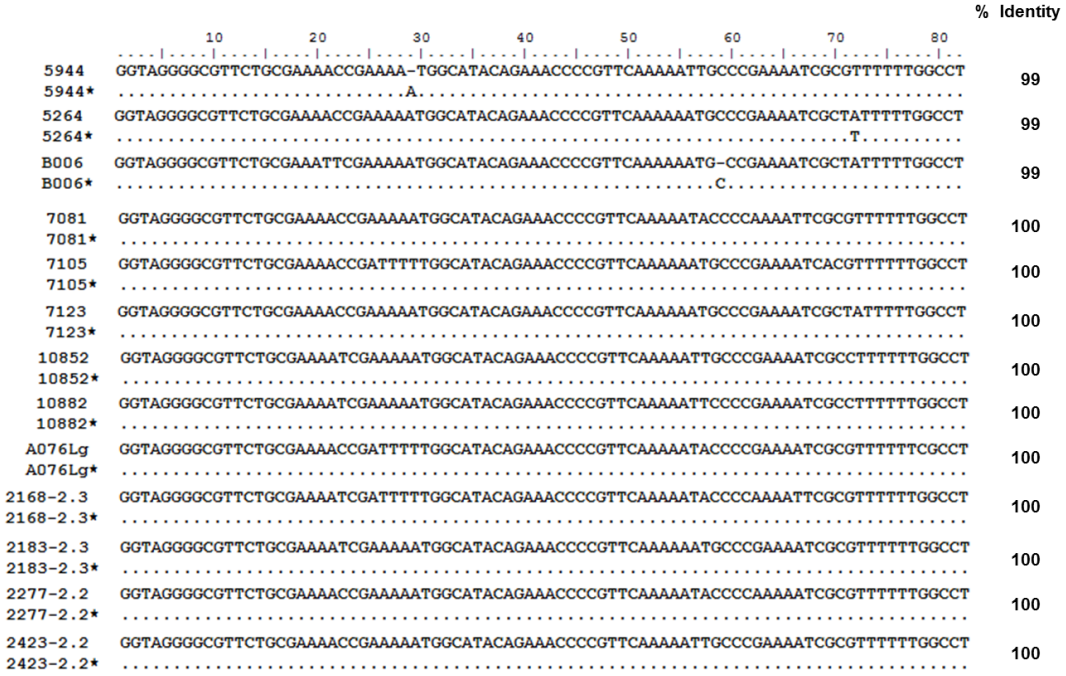
[a] Number of participants with at least one kDNA positive sample (n)/ Total number of participants (N)

Table 2. Detection of *Leishmania* kDNA and 7SLRNA gene transcript in clinical samples from subclinically infected individuals in endemic foci of CL.

Clinical group		**Number of participants**	**% of participants with at least one kDNA positive sample (n/N)[a]**	**% of kDNA+ participants with at least one 7SLRNA positive sample (n/N)[b]**
Subclinical infection	Clinical history of disease (LST +)	97	42% (41/97)	61% (25/41)
	Asymptomatic infection (LST +)	17	29% (5/17)	40% (2/5)
Subtotal		**114**	**40% (46/114)**	**59% (27/46)**
Clinical history of disease (LST -)		12	50% (6/12)	33% (2/6)
Clinical history of disease (No LST data)		7	57% (4/7)	100% (4/4)
Healthy LST- individuals from endemic area		18	17% (3/18)	67% (2/3)
Total		**151**	**39% (59/151)**	**59% (35/59)**

[a] Number of participants with kDNA positive sample (n)/ Total number of participants (N)
[b] Number of participants with 7SLRNA positive sample (n) / Total number of participants with kDNA positive samples.

SUPPORTING INFORMATION



Supplemental Figure 1. Verification of sequencing fidelity. Re-sequencing of kDNA from *L.Viannia* clinical strains shows <1% sequence variability introduced during the sequencing reaction. * Denotes the technical replica for each sequencing reaction.

Supplemental Table 1. *Leishmania* strains and GenBank kDNA sequences used in analyses of genetic diversity.

GenBank SEQUENCES

Species	Strain name	GenBank Accession Number	Identifier
L. L. donovani	MHOM/IN/80/DD8 [a]	AF167712.1	DD8
	MHOM/CN/80/STRAIN-A	AF168358.1	STRAIN-A
	MHOM/SD/95/SIGIN	AF169136.1	SIGIN
	MHOM/SD/97/RHD-48	AF169135.1	RHD-48
	MHOM/SD/95/MSA2	AF169134.1	MSA2
	MHOM/KE/75/MUTINGA-H9	AF184892.1	MUTINGA-H9
	MHOM/ET/67/HU3	AF103742.1	HU3
	MHOM/SD/97/RLD1	AF103737.1	RLD1
	MHOM/SD/85/A22	AF103736.1	A22
L. L. infantum/chagasi	MHOM/BR/74/PP75	AF103739.1	PP75
	MHOM/PA/79/WR317	AF169137.1	WR317
	MHOM/ES/81/LEM307	AF188701.1	LEM307
	MHOM/TN/80/IPT1 [a]	Z35274.1	IPT1
	MHOM/FR/91/LEM-2298	AF190475.1	LEM-2298
	MHOM/ES/97/LLM-710	AJ275335.1	LLM-710
	MHOM/ES/97/LLM-719	AJ275333.1	LLM-719
	MHOM/DZ/85/LIPA141	AF169133.1	LIPA141
	MHOM/SU/84/MARZ-KRIM	AF190476.1	MARZ-KRIM
L. mexicana Complex	*L. amazonensis* Lam-331	EU370875.1	Lam-331
	MHOM/BR/00/Raimundo	M21326.1	Raimundo
	L. amazonensis isolate Lam-324	EU370871.1	Lam-324
	NA	Z11555.1	L. mex
L. S. tarentolae	*L tarentolae LEIKPMNCA KSR1 strain C-1*	K01978.1	KSR1
	L tarentolae clone ND9-VIa	AF380753.1	ND9-VIa
	L tarentolae clone ND8-VIb	AF380752.1	ND8-VIb
	L tarentolae Strain UC	X04110.1	UC
	L tarentolae clone RPS12-VIII	AF380747.1	RPS12-VIII
L.V. braziliensis	MHOM/BR/75/M2904	XM_001568753.1	M2904
L.V. panamensis	MHOM/PA/75/M4037	AF118474.1	M4037

CLINICAL STRAINS

Species	Strain name	Identifier
L. V. braziliensis	MHOM/BR/1975/M2903 [a]	M2903
	MHOM/CO/08/5387R	5387Lb
	MHOM/CO/09/5601	5601Lb
	MHOM/CO/12/7036	7036Lb
L.V. guyanensis	MHOM/BR/1975/M4147 [a]	M4147
	MHOM/CO/06/A073	A073Lg
	MHOM/CO/08/A192	A192Lg
	MHOM/CO/06/A016	A016Lg
	MHOM/CO/06/A076	A076Lg
	MHOM/CO/06/A025	A025Lg
	MHOM/CO/83/L76	L76Lg
	MHOM/CO/NR/L75 [b]	L75Lg
	MHOM/CO/83/1028	1028Lg
	MHOM/CO/84/1096	1096Lg
L.V. panamensis	MHOM/PA/1971/LS94 [a]	LS94
	MHOM/CO/11/5996	5996
	MHOM/CO/12/B006	B006
	MHOM/CO/11/5967	5967
	MHOM/CO/85/2277	2277-2.2
	MHOM/CO/85/2476	2476-2.2
	MHOM/CO/85/2496	2496-2.2
	MHOM/CO/85/2423	2423-2.2
	MHOM/CO/85/2272	2272-2.2
	MHOM/CO/85/2350	2350-2.2
	MHOM/CO/85/2330	2330-2.2
	MHOM/CO/85/2420	2420-2.2
	MHOM/CO/85/2363	2363-2.2
	MHOM/CO/85/2348	2348-2.2
	MHOM/CO/84/2198	2198-2.3
	MHOM/CO/84/2159	2159-2.3
	MHOM/CO/84/2173	2173-2.3
	MHOM/CO/84/2168	2168-2.3
	MHOM/CO/84/2183	2183-2.3

	MHOM/CO/84/2169	2169-2.3
	MHOM/CO/87/1320	1320
	MHOM/CO/09/5578	5578
	MHOM/CO/06/8591	8591
	MHOM/CO/08/5415	5415
	MHOM/CO/11/5944	5944
	MHOM/CO/07/5264	5264
	MHOM/CO/05/8094	8094
	MHOM/CO/06/8668	8668
	MHOM/CO/05/5035	5035
	MHOM/CO/05/5033	5033
	MHOM/CO/03/3783	3783R
	MHOM/CO/12/7136	7136
	MHOM/CO/12/7123	7123
	MHOM/CO/13/7127	7127
	MHOM/CO/12/7137	7137
L. mexicana Complex	MHOM/BR/1973/M2269 [a]	M2269

[a] Reference strains.

[b] Isolation year not registered

ANEXO 5. Aprobación del Comité Institucional de Ética de Investigaciones en Humanos (CIEIH)-CIDEIM

CIDEIM

CIDEIM
Centro Internacional de Entrenamiento e Investigaciones Médicas
CIEIH
APROBADO

COMITE INSTITUCIONAL DE ETICA DE INVESTIGACIONES EN HUMANOS 27 ENE 2014

ACTA DE APROBACION

Reunión ordinaria celebrada el lunes 27 de enero de 2014

PROYECTO: "CARGA DE INFECCION HUMANA EN LA TRANSMISION DOMESTICA Y PERDIDA DE SUSCEPTIBILIDAD A MEDICAMENTOS EN LA LEISHMANIASIS CUTANEA" versión 3 junio 23 de 2011

Sometido por: Mariana Rosales. Estudiante Maestría Ciencias Básicas U. del Valle
Maria Adelaida Gomez. Tutora de la estudiante. CIDEIM

Fecha en que fue sometido: 6 de diciembre de 2013

El CENTRO INTERNACIONAL DE ENTRENAMIENTO E INVESTIGACIONES MEDICAS (CIDEIM), ha establecido el Comité Institucional de Ética de Investigación en Humanos (**CIEIH**), el cual está regido por la Resolución 008430 del 4 de octubre de 1993 del Ministerio de Salud de Colombia por la cual se establecen las normas científicas, técnicas y administrativas para la investigación en salud; los principios de la Asamblea Médica Mundial expuestos en su Declaración de Helsinki de 1964, última revisión en 2008; y el código de regulaciones federales, título 45, parte 46, para la protección de sujetos humanos, del departamento de salud y servicios humanos de los Institutos Nacionales de Salud de los Estados Unidos (Junio 18 de 1991).

Este Comité **certifica que**:

1.- Recibió el ACTA DE REUNION celebrada entre CIDEIM y el Director de Postgrado de la Escuela de Ciencias Básicas, Facultad de Salud, Universidad del Valle, en la cual *"se revisaron los procesos administrativos que deben cumplir los estudiantes de maestría y doctorado que realizan sus estudios en la U. del Valle..." "... teniendo en cuenta la Resolución 124 de junio 22 de 2007 por la cual se establece el reglamento interno académico administrativo del programa de postgrado en ciencias biomédicas de la Facultad de Salud emanado por la Vicerrectoría Académica de la U. del Valle y CIDEIM. Se obtuvieron las siguientes conclusiones:*

- *El registro de los proyectos es un trámite administrativo que permite contabilizar el tiempo de dedicación de los docentes de la Universidad del Valle con los estudiantes de maestría. Teniendo en cuenta que los estudiantes vinculados a CIDEIM son guiados y supervisados por un investigador (tutor) de CIDEIM, los proyectos de los estudiantes no requieren ser registrados ante la Universidad del Valle.*

- *Cuando el trabajo de grado que realiza el estudiante forma parte de un proyecto mayor de CIDEIM que ya cuenta con el aval del Comité de Ética de CIDEIM no será necesario solicitar un nuevo aval ético.*

- *Si durante el desarrollo del proyecto se introducen nuevos procedimientos con sujetos animales y humanos, que no están contemplados en el proyecto original, se debe solicitar un nuevo aval (enmienda) al Comité de Ética de CIDEIM sea al CIEIH (humanos) o CIEIA (animales).*

- *Si el trabajo de grado del estudiante de maestría hace parte de un proyecto mayor de CIDEIM, pero los objetivos que se pretende lograr no están relacionados con los planteados en el proyecto macro, el estudiante debe presentar un nuevo proyecto que deberá ser avalado por el CIEIH o CIEIA / CIDEIM. En todo caso, esta decisión la deberá tomar el tutor (investigador) del estudiante y ante la duda se sugiere elevar consulta ante los comités de ética.*

- *Cada estudiante de maestría debe tener un tutor (investigador) de CIDEIM no requiriendo tutor de la Universidad del Valle. El canal de comunicación entre la Universidad del Valle y*

Recibido Mariana R. 20 Marzo 2014

CIDEIM

CIDEIM
Centro Internacional de Entrenamiento e Investigaciones Médicas
CIEIH
APROBADO
27 ENE 2014

CIDEIM será el Director de la Escuela de Postgrado de Ciencias Básicas quien informará a los tutores (investigadores) de CIDEIM los cambios administrativos que se realicen, fechas o términos de cumplimiento y cualquier modificación que pueda afectar el proceso académico de los estudiantes de maestría.

2.- El proyecto "DEMOSTRACIÓN PARASITOLÓGICA DE INFECCIÓN PERSISTENTE POR LEISHMANIA EN ÁREAS ENDÉMICAS DE COLOMBIA" que desarrolla la estudiante Mariana Rosales, se encuentra enmarcado dentro del estudio "CARGA DE INFECCIÓN HUMANA EN LA TRANSMISIÓN DOMÉSTICA Y PERDIDA DE SUSCEPTIBILIDAD A MEDICAMENTOS EN LA LEISHMANIASIS CUTÁNEA" (Luisa Rubiano, IP) financiado por Colciencias, el cual contempla la vinculación de un estudiante de maestría. El protocolo de investigación y documentos relacionados a este proyecto han sido aprobados por el CIEIH en instancias anteriores y está actualmente vigente.

3.- Los objetivos de investigación del proyecto de la estudiante Mariana Rosales parten de los objetivos específicos definidos en el estudio "CARGA DE INFECCIÓN HUMANA EN LA TRANSMISIÓN DOMÉSTICA Y PERDIDA DE SUSCEPTIBILIDAD A MEDICAMENTOS EN LA LEISHMANIASIS CUTÁNEA" y además todos los procedimientos incluyendo el diseño experimental, el reclutamiento de participantes, muestras obtenidas, documentos como CRF, protocolo, consentimientos y bases de datos, son los mismos diseñados e implementados para el proyecto marco, y por cuyas normas y aprobaciones se ha regido el trabajo de la estudiante.

4.- El Comité de Ética de Investigacion con Humanos CIEIH / CIDEIM decide que el aval ético otorgado al proyecto marco se extiende al trabajo de grado que desarrolla Mariana Rosales.

5.- El Comité **informará** inmediatamente a las directivas institucionales:

a. Todo desacato de los investigadores a las solicitudes del Comité.
b. Cualquier suspensión o terminación de la aprobación por parte del Comité.

6.- El Comité **informará** inmediatamente a las directivas institucionales toda información que reciba acerca de:

a. Lesiones a sujetos humanos.
b. Problemas imprevistos que involucren riesgos para los sujetos u otras personas.
c. Cualquier cambio o modificación a este proyecto que haya sido revisado y aprobado por el Comité.

Firma: _____
Nombre: Gloria Inés Palma
Título: MD, PhD
Capacidad representativa: **Presidente**
Comité Institucional de Ética de Investigación en Humanos (CIEIH) CIDEIM

Firma: _____
Nombre: Jackeline Bravo Chamorro
Título: Enfermera Esp.
Capacidad representativa: **Secretaria**
Comité Institucional de Ética de Investigación en Humanos (CIEIH) CIDEIM