

ARTICULO ORIGINAL

Caracterización de cepas de *Leishmania*, por medio de la técnica de PCR-RFLP de la región del *Spliced Leader Miniexon (SLME)*, aisladas de humanos y caninos en Paraguay**Characterization of *Leishmania* strains using PCR-RFLP of Spliced Leader Miniexon (SLME) in human and canine isolates in Paraguay****Chena L^{I,II}, *Nara E^I, Canese A^{III}, Oddone R^{III,IV}, Morán M^{II}, Russomando G^I**^IDpto de Biología Molecular y Genética. Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud. UNA. Paraguay^{II}Departamento de Parasitología. Laboratorio Central de Salud Pública, MSP y BS. Paraguay^{III}Programa Nacional de Control de Leishmaniosis. SENEPA. MSP y BS. Paraguay^{IV}Dpto de Producción Bioquímica. Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud. UNA. Paraguay**RESUMEN**

La leishmaniosis es una enfermedad parasitaria con varias formas clínicas, desde lesiones cutáneas leves hasta enfermedades fatales con comprometimiento visceral. Existen varias técnicas moleculares como por ejemplo la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) que amplifica diferentes secuencias blanco, una de ellas es la región SLME (*spliced leader miniexon*), el producto se corta con enzimas de restricción (PCR-RFLP), permitiendo la identificación de las especies de *Leishmania*. Este trabajo fue realizado con el objetivo de caracterizar las cepas de *Leishmania*, empleando una PCR-RFLP de la región SLME, aisladas de humanos y caninos, provenientes de distintas zonas del país. Se analizaron 12 aislados de humanos y 40 de caninos debidamente codificados. Se empleó un par de cebadores para la región SLME, los productos amplificados fueron cortados con las enzimas *Hae* III y *Nco* I (RFLP) y los patrones de bandas analizados. Se detectó en un primer paso la presencia de parásitos del subgénero *Viannia* en 7 aislados de humanos y correspondientes al subgénero *Leishmania* en 5 aislados de humanos y 40 de caninos. La RFLP según los patrones de bandas permitió identificar a *L. braziliensis* en aislados de leishmaniosis tegumentaria y *L. chagasi* en los casos de leishmaniosis visceral. Es importante resaltar que este trabajo es el primero en el país en realizar la caracterización molecular a nivel de especies de *Leishmania* y los hallazgos descritos tienen una implicación a nivel epidemiológico, contribuyendo con las estrategias de vigilancia y control de la enfermedad. Adicionalmente, se sugiere el uso de otros marcadores genéticos para identificar genotipos o perfiles genéticos diferentes, entre cepas de estas especies.

Palabras claves: *Leishmania*, genotipificación, PCR-RFLP, miniexón.**ABSTRACT**

Leishmaniasis is a parasitic disease with various clinical forms from minor skin lesions to fatal diseases with visceral compromise. There are several molecular techniques such as the polymerase chain reaction (PCR) that amplifies specific target sequences like the SLME (*spliced leader miniexon*) region. Subsequently, the PCR products are digested with specific restriction enzymes (PCR-RFLP) allowing the identification of *Leishmania* species. This study was carried out in order to characterize *Leishmania* strains by using a PCR-RFLP of the SLME region in human and canine isolates from different regions of the

*Autor Correspondiente: **Dra. Eva Nara**, Dpto. de Biología Molecular y Genética. Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud. UNA. Paraguay. Email: megunara@hotmail.com. Fecha de recepción: abril de 2012, Fecha de aceptación: mayo 2012.

country. We analyzed 12 human isolates and 40 dog isolates properly codified. Two primers for SLME region were used and the amplified products were digested with the *Hae* III and *Nco* I (RFLP) enzymes, then the banding patterns were analyzed. In 7 human isolates, parasites from the *Viannia* subgenus were detected while in 5 human isolates and 40 dog isolates, parasites from the *Leishmania* subgenus were identified. RFLP, according to the restriction banding patterns, allowed the identification of *L. braziliensis* species in the tegumentary leishmaniasis isolates and *L. chagasi* in visceral leishmaniasis isolates. This is the first study conducting molecular characterization of *Leishmania* species in the country, and its findings have implications at the epidemiological level by contributing to the improvement of surveillance strategies for the disease control. Additionally, the use of other genetic markers is suggested in order to identify genotypes or different genetic profiles among the strains of these species.

Keywords: *Leishmania*, genotyping, PCR-RFLP, minixon.

INTRODUCCIÓN

La leishmaniosis es una enfermedad parasitaria endémica en muchas áreas tropicales y subtropicales de América, constituyendo un importante problema de salud pública (1), es considerada por la Organización Mundial de la Salud como una de las cinco enfermedades infecto parasitarias de mayor relevancia (2). Es causada por protozoarios del género *Leishmania*, que son transmitidos por flebótomos entre animales y el hombre que al interactuar en el hábitat puede adquirir la enfermedad (3,4).

Se encuentra asociada con un amplio espectro de manifestaciones clínicas que pueden variar desde lesiones cutáneas ulcerosas que cicatrizan, la leishmaniosis cutánea (LC); las no ulcerosas o difusas que no curan fácilmente, la leishmaniosis cutáneo difusa (LCD); hasta notorias desfiguraciones en la forma mucosa, leishmaniosis mucocutánea (LMC) y una forma sistémica fatal, la leishmaniosis visceral (LV) (1,5,6). Estas manifestaciones clínicas están sujetas no solamente al estado inmunológico del paciente sino también a especies particulares del parásito, presencia de ciertas especies de flebótomos y reservorios involucrados (4,5,7).

Debido a la amplia variedad de especies de *Leishmania* y formas clínicas de la enfermedad, un correcto diagnóstico con la identificación de la especie de *Leishmania* involucrada es importante para realizar un pronóstico de la situación, el manejo más adecuado del paciente o de la población afectada que además permite posteriormente hacer un análisis epidemiológico de la distribución geográfica del parásito (6).

En el Paraguay, la zona endémica, para la forma tegumentaria abarca principalmente los departamentos de San Pedro, Caaguazú, Canindeyú y Alto Paraná, que juntos poseen casi el 80% de los casos totales del país (8) y para la forma visceral el 75% de los casos registrados en los últimos años pertenecían al departamento Central y el 25% restante distribuidos en Asunción, Cordillera, Paraguari, Alto Paraná, Guaira e Itapúa (9).

Con el empleo de técnicas moleculares como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés: *polymerase chain reaction*) se ofrece una alternativa de buena sensibilidad y especificidad que permite identificar el género y complejos de *Leishmania* (7). Últimamente se han desarrollado varios ensayos basados en PCR, que utilizan diferentes blancos de amplificación, como el gen cromosómico que codifica la unidad pequeña ribosomal (SSU por sus siglas en inglés *small subunit*) rARN (10), secuencias repetitivas (11), espaciadores internos transcritos (ITS, por sus siglas en inglés *internal transcribed spacers*), ubicado entre los genes genómicos ribosomales que codifican las unidades pequeña y grande (12), el gen del locus de la glicoproteína de superficie gp63 (13), al igual que las secuencias repetitivas de los minicírculos del ADN del kinetoplasto (kADN) (14).

También se ha diseñado una técnica de genotipificación que consiste en la amplificación mediante una PCR de una región del *spliced leader minixon* (SLME) que se presenta

como repeticiones en *tandem* (100 a 200 copias) en el género *Leishmania* y otros protozoarios del orden *Kinetoplastida*. Esta técnica de PCR que utiliza un único par de cebadores combinada con una restricción enzimática (PCR-RFLP, por sus siglas en inglés: *polymerase chain reaction – restricted fragments length polymorfism*) permite analizar los patrones que son característicos para cada especie (6).

La caracterización molecular de aislados de *Leishmania*, no solamente ofrece un apoyo a las técnicas convencionales de diagnóstico, confirmando la presencia del agente causal de la enfermedad, sino que también permite realizar estudios epidemiológicos que brinden un mejor conocimiento de la variabilidad genética del parásito, de su distribución geográfica y de su relación con la patología que desarrolla.

Este trabajo tiene como objetivo la caracterización de cepas de *Leishmania* aisladas de pacientes humanos y caninos, empleando la técnica PCR-RFLP de la región SLME, provenientes de distintas zonas del país.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Cultivo in vitro de *Leishmania*: Las formas promastigotes de cultivo de *Leishmania* fueron aisladas en la fase líquida del medio de cultivo NNN, a 26° C. Una vez que se obtuvo el crecimiento de las formas promastigotes, se transfirió una alícuota a un medio bifásico NNN, cuyo sobrenadante era RPMI 1640 suplementado con suero bovino fetal al 20%. Finalmente, para una mayor multiplicación de los parásitos, estos se cultivaron en RPMI 1640 suplementado con suero bovino fetal al 20%. A los 7 días de incubación en RPMI 1640, los parásitos se cosecharon y separaron por centrifugación a 2.000 rpm lavándolos 4 veces con buffer salino-fosfato pH= 7,2 (PBS).

2. Muestras: Fueron utilizadas cepas de referencia de tres especies de *Leishmania*: *Leishmania (V.) braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903), *Leishmania chagasi* (MHOM/BR/1974/PP75) y *Leishmania (L.) amazonensis* (IFLA/BR/1967/PH8) (provistas por el Laboratorio de Pesquisa em Leishmaniose/LPL, Instituto Oswaldo Cruz-FIOCRUZ, Brasil); para las pruebas de sensibilidad y de capacidad de discriminación entre especies de *Leishmania* de las reacciones de PCR y como controles para comparación en las reacciones de caracterización.

Fueron estudiadas 52 cepas de *Leishmania* aisladas de 7 pacientes con leishmaniosis tegumentaria (LT), de 5 pacientes con leishmaniosis visceral humana (LVH) y de 40 perros con leishmaniosis visceral canina (LVC) en el periodo comprendido entre los años 2006 y 2008 (tabla 1).

Las cepas de *Leishmania* aisladas, de LT fueron obtenidas por cultivo de biopsia de la lesión de piel y provenían de casos ocurridos durante el brote en la localidad de Tava Yopoi y alrededores, distrito de Curuguaty, departamento de Canindeyú y fueron reportados anteriormente (15) (figura 1). Los aislados de LVH fueron obtenidos a través del aspirado de médula ósea y provenían de casos ocurridos en Asunción, capital del país y en distritos cercanos como Limpio, Fernando de la Mora y San Lorenzo del Departamento Central (figura 1). Las cepas de LVC fueron obtenidas de muestras de bazo de perros con diagnóstico serológico positivo para LVC, 12 provenían de las zonas de Asunción y distritos cercanos; como Fernando de la Mora, San Lorenzo, Ñemby y Luque del Departamento Central y 28 de los departamentos de Itapúa, Amambay, Guairá, Misiones y Cordillera (figura 2).

Tabla 1. Cepas aisladas de pacientes humanos y perros provenientes de zonas conocidas como endémicas de la enfermedad (2006-2008) (n= 52)

Código de paciente humano/canino	Origen/Tipo de muestra	Tipos de leishmaniosis	n
A54-A68	MB	LVC	15
A36-A44	MB	LVC	9
A2-A8	MB	LVC	7
A16-A22	MB	LVC	7
A26-A28	BLC	LC	3
A11-A12	MB	LVC	2
A23-A24	AMO	LVH	2
A31-A32	BLC	LC	2
A34-A35	BLC	LC	2
A1	AMO	LVH	1
A45	AMO	LVH	1
A69	AMO	LVH	1

AMO: aspirado de médula ósea, **MB:** muestra de bazo, **BLC:** biopsia de lesión cutánea, **LVH:** leishmaniosis visceral humana, **LVC:** leishmaniosis visceral canina, **LC:** leishmaniosis cutánea.

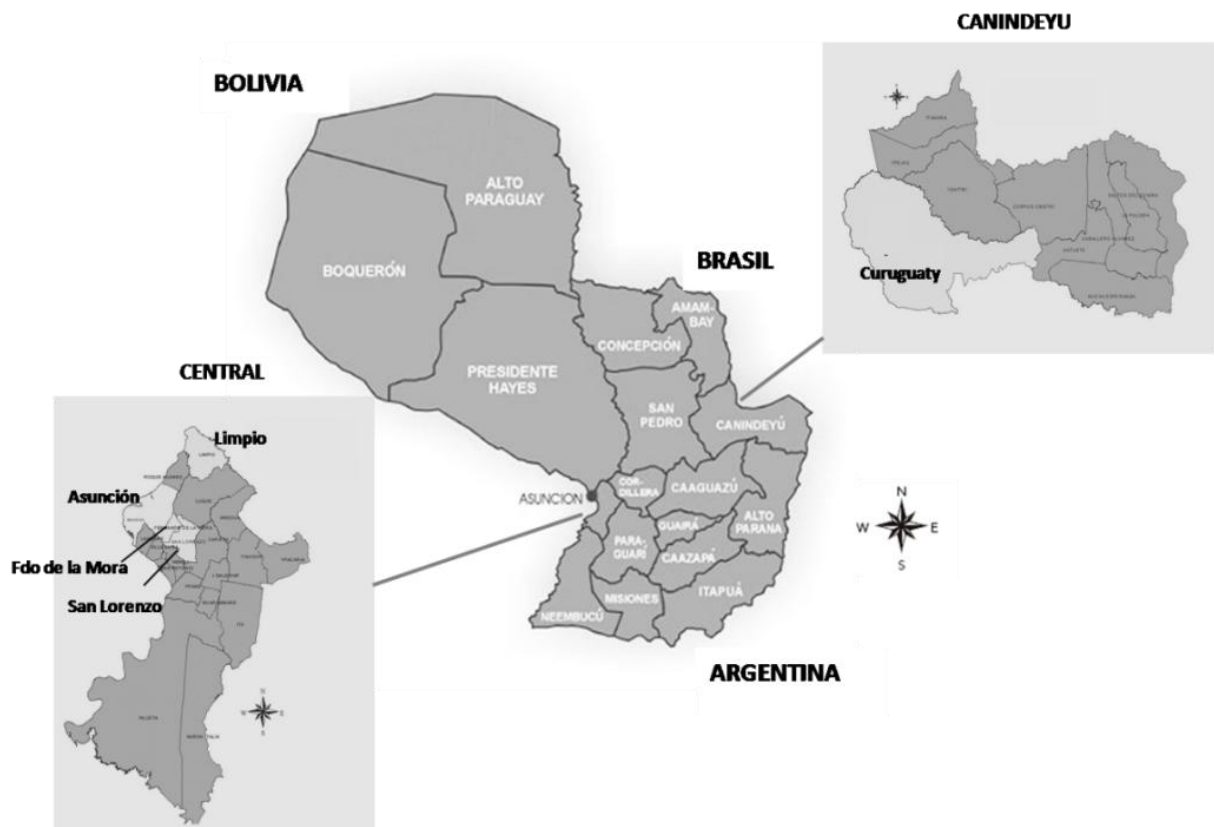
**Figura 1.** Localización de los Departamentos de Central y Canindeyú, con la ubicación de los distritos donde se obtuvieron cepas de *Leishmania* aisladas de pacientes con LVH y LT.



Figura 2. Localización de los Departamentos de Amambay, Cordillera, Central, Guairá, Misiones e Itapúa, donde en algunos de sus distritos se obtuvieron cepas de *Leishmania* aisladas de perros con LV.

3. Extracción de ADN: la extracción de ADN de los aislados se realizó por el método de fenol-cloroformo. Los cultivos fueron sometidos previamente a una lisis de proteínas (*overnight* a 55°C) mediante un tampón de lisis (10 mM Tris, 10% SDS, 200 µg/mL), proteinasa K (concentración final: 200 µg/mL). El proceso de extracción consistió en dos pasos de fenol-cloroformo (25:24) y uno de cloroformo puro final. El ADN fue precipitado con acetato de sodio 3M, pH 5.3, etanol 99,5% p.a. frío y una noche a -20°C. Finalmente, el producto de la extracción se resuspendió en 100 µl de agua destilada, siendo empleado como molde para la reacción de PCR. Esta metodología desarrollada se basó en la combinación de diversos protocolos preestablecidos y modificados (7,16), tomando como referencia la propuesta por Sambrook *et al* (16).

4. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR): se empleó el siguiente par de cebadores: **Fme:** 5'-TAT TGG TAT GCG AAA CTT CCG-3' (Forward) y **Rme:** 5'-ACA GAA ACT GAT ACT TAT ATA GCG-3' (Reverse), diseñados por Marfurt *et al.* (6) que amplifican la región del *spliced leader miniexón* (SLME). Las reacciones de PCR se realizaron en un termociclador DNA Engine PTC 200 (BioRad, California, USA) con el siguiente esquema de ciclado: 5 min a 94°C, seguido de 35 ciclos de 30 seg a 94°C, 30 seg a 54°C, y 45 seg a 72°C. La mezcla de reacción contenía: *Buffer* 1X, 1,5 mM MgCl₂, 5% DMSO (SIGMA, USA), 0,2 mM dNTPs (BIOLINE, UK), 0,2 mM de cada cebador, 1 unidad de *Taq* polimerasa (FERMENTAS, EU) para un volumen total de 50 µL.

5. Análisis de los productos amplificados: los productos amplificados los cuales tienen un tamaño aproximado entre 220 y 226 pb para el subgénero *Viannia* y entre 283 y 443 pb para el subgénero *Leishmania* fueron analizados por electroforesis en geles de agarosa al 2%, empleando solución tampón TAE (0.04 M Tris-acetato, 0.001 M EDTA) (15). La electroforesis se realizó en cámaras MUPID-3 (Japón) a 100 V durante 30

minutos. Los tamaños de las bandas se estimaron empleando un marcador de tamaño molecular de 100 pb (hasta 2000 pb) (BIOLINE, UK) y visualizados con luz UV previa tinción con bromuro de etidio (0,5 µg/mL). Los geles de agarosa fueron registrados empleando un analizador de imágenes (KODAK Digital Science DC120, USA).

6. Digestión con enzimas de restricción (RFLP): los productos de PCR obtenidos con los cebadores Fme y Rme fueron digeridos con las enzimas de restricción *Hae* III (10 U/µL) y *Nco* I (10 U/µL) (New England Biolabs®, USA) incubando las muestras a 37° C durante toda la noche en baño o estufa y los patrones obtenidos fueron visualizados en geles de poliacrilamida al 10%, utilizando solución tampón de corrida TBE (0.045M Tris-borato, 0.001 M EDTA). La corrida se realizó durante 90 minutos a 5 Watts constante equivalentes a 100 Volts. Para la confirmación de los tamaños de los productos de digestión los patrones fueron comparados con un marcador de tamaño molecular de 100 bp (hasta 2000 pb) (BIOLINE, UK). Los resultados fueron registrados con un analizador de geles y analizados con el software de KODAK Digital Science DC 120 (USA).

7. Prueba de sensibilidad de la PCR: para determinar la sensibilidad analítica de la reacción de PCR fueron preparadas diluciones seriadas de ADN de cepas de referencia de *L. (V.) braziliensis*, *L. chagasi* y *L. (L.) amazonensis*. La cantidad de ADN probada oscilaba entre 10⁴ y 1 parásito, equivalente de 1 ng a 100 fg de ADN.

También fue determinada la capacidad de la técnica para diferenciar entre especies de *Leishmania*. Se realizaron ensayos utilizando cultivos de cepas de referencia de *L. (V.) braziliensis*, *L. (L.) amazonensis* y *L. chagasi* y el posterior análisis de los tamaños de los fragmentos de restricción en correspondencia con el análisis del corte con enzimas (6).

8. Consideraciones éticas: el protocolo de este estudio ha sido aprobado por el Comité de Ética de la Investigación del Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud. Los aislados en cultivo para este proyecto han sido obtenidos a partir de otro proyecto financiado por la Comunidad Europea que ha obtenido los consentimientos informados de los pacientes que han participado del estudio, las muestras han sido debidamente codificadas, respetando en todo momento la confidencialidad de los datos y resultados de los pacientes. Los pacientes han sido diagnosticados, tratados y controlados por los profesionales del Programa Nacional de Control de las Leishmaniasis del Ministerio de Salud Pública. Las muestras de bazo de perros fueron obtenidas de animales con serología positiva para LVC luego de la eutanasia de los mismos, con el consentimiento previo de sus dueños.

RESULTADOS

1. Prueba de sensibilidad de la PCR de la región SLME

Se realizaron ensayos de sensibilidad analítica de la reacción de PCR, utilizando DNA aislado de cultivos de cepas de referencias de las especies *L. (V.) braziliensis*, *L. (L.) amazonensis* y *L. chagasi*. Se encontró que el límite de detección de ADN de *L. (V.) braziliensis* fue de 100 parásitos lo que equivale a 10 pg de ADN, dando un producto aproximado de 226 pb (figura 3a), para *L. chagasi* fue de 1000 parásitos, equivalente a 100 pg de ADN, con un producto aproximado de 418 pb (figura 3b) y para *L. (L.) amazonensis* fue de 1000 parásitos, correspondiente a 100 pg de ADN y con un producto aproximado a 285 pb (figura 3c).

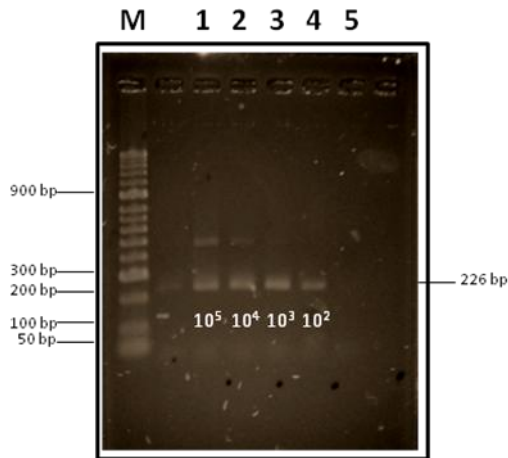


Figura 3a. Sensibilidad de la reacción de PCR para *L. (V.) braziliensis*. Se observó amplificación hasta la dilución de ADN correspondiente a 10² parásitos equivalente a una concentración de 10 pg, carriles 1 a 4, carril 6, control negativo. Carril M, marcador de tamaño molecular de 2 Kb. (BIOLINE, UK)

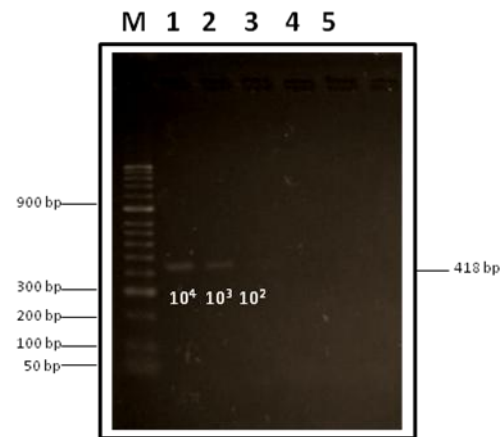


Figura 3b. Sensibilidad de la reacción de PCR para *L. chagasi*. Se observó amplificación hasta la dilución de ADN correspondiente a 10³ parásitos equivalente a una concentración de 100 pg, carriles 1 a 3, carril 5, control negativo. Carril M, marcador de tamaño molecular de 2 Kb (BIOLINE, UK)

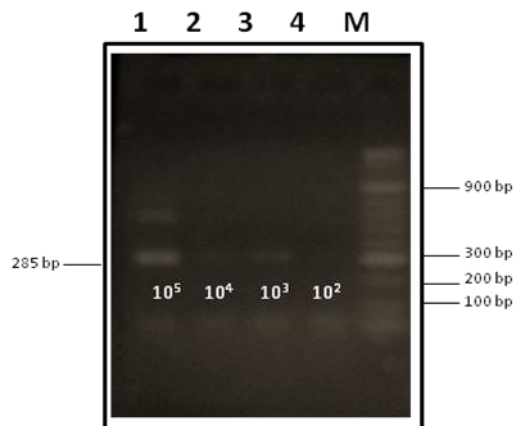


Figura 3c. Sensibilidad de la reacción de PCR para *L. (L.) amazonensis*. Se observó amplificación hasta la dilución de ADN correspondiente a 10³ parásitos equivalente a una concentración de 100 pg, carriles 1 a 3. Carril M, marcador de tamaño molecular de 2 Kb (BIOLINE, UK).

2. Evaluación de la capacidad de la PCR-RFLP de la región SLME para identificar especies de *Leishmania* en aislados clínicos

Se realizaron ensayos para determinar la capacidad de la técnica para diferenciar entre especies de *Leishmania* amplificando DNA de purificado de aislados humanos de LC y LV, aislados caninos de LV y cepas de referencia y el posterior análisis de los tamaños de los fragmentos de restricción (RFLP) (figuras 4a y 4b) en correspondencia con el análisis del corte con enzimas, según Marfurt *et al* (6). El análisis de los patrones de restricción obtenidos (RFLP) muestra fragmentos de 118 y 108 pb con *Hae* III, que corresponden a *L. (V.) braziliensis* (figura 4a) y fragmentos de 327 y 108 pb con *Nco* I que corresponden a *L. chagasi* (figura 4b). El fragmento de 285 pb correspondiente a *L. (L.) amazonensis*

no fue cortado por ninguna de las dos enzimas *Hae* III y *Nco* I, en correspondencia con lo esperado (datos no mostrados).

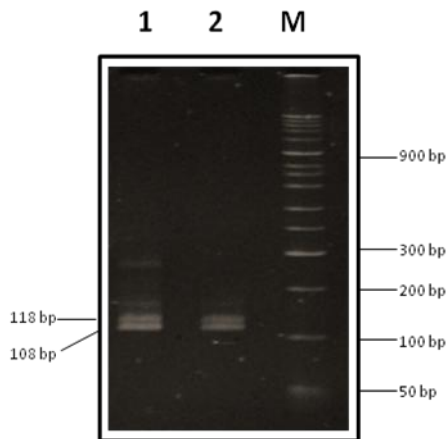


Figura 4a. Patrones de RFLP del producto de 226 pb digeridos con *Hae* III, fragmentos de 118 y 108 pb. Carriles: 1 Aislado de LT, 2 cepa *L. braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903), M marcador de tamaño molecular de 2 Kb

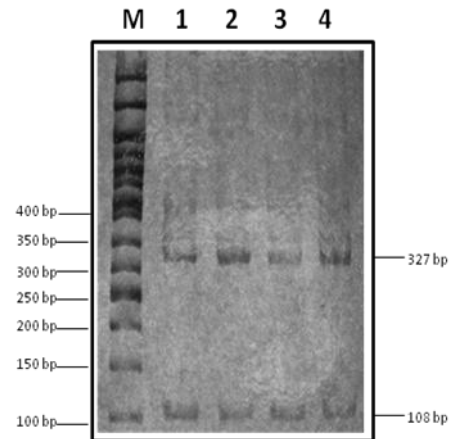


Figura 4b. Patrones de RFLP del producto de 418 pb digeridos con *Nco* I, fragmentos de 327 y 108 pb. Carriles: 1 Aislado de LV humano, 2 y 3 Aislados de LV caninos, 4 cepa *L. chagasi* (MHOM/BR/74/PP75), M marcador de tamaño molecular de 2

3. Identificación de los aislados clínicos por PCR-RFLP

De los 52 aislados clínicos analizados, inicialmente fueron detectados productos de amplificación correspondientes al subgénero *Viannia*, (entre 223 y 226 pb) en 7 aislados de humanos y correspondientes al subgénero *Leishmania* (entre 418 y 443 pb), en 5 aislados de humanos y en 40 de caninos.

Posteriormente con el análisis de los patrones de bandas digeridos con *Hae* III, los 7 aislados que amplificaron productos asociados con el subgénero *Viannia* generaron los fragmentos de 118 y 108 bp al igual que la cepa de referencia de *L. braziliensis* y para los 45 aislados que amplificaron fragmentos entre 418 y 443 pb asociados con el subgénero *Leishmania* generaron los fragmentos de 327 y 108 bp con *Nco* I al igual que la cepa de referencia *L. chagasi*.

DISCUSIÓN

El presente ensayo de genotipificación basado en PCR-RFLP del gen miniexón mostró la capacidad de detectar en un primer paso los complejos de *Leishmania* circulantes en el Paraguay en una reacción única de PCR y en un segundo paso de digestión con enzimas de restricción fue posible identificar las cepas dentro de los complejos de *Leishmania* prevalentes en Paraguay. La mayoría de los ensayos para diagnóstico son basados en secuencias genómicas repetitivas o secuencias del kDNA, pero están limitados a la detección a nivel de géneros y complejos del parásito (6,7). La identificación a nivel de especies es una importante ventaja; en el caso de leishmaniosis cutánea, por ejemplo, porque diferentes especies pueden causar lesiones cutáneas similares y requerir distintos tratamientos o esquemas de tratamiento y además, la información es epidemiológicamente relevante para identificar el foco de transmisión activa y el diseño de estrategias de control (17).

Con el análisis de los patrones de bandas, se define como especie circulante a *L. braziliensis*, causante de la leishmaniosis cutánea, en concordancia con otras publicaciones (1,17), aunque en países como Brasil la diversidad de especies de parásitos

es grande, donde al menos siete especies han sido descritas como agente etiológicos de la forma cutánea de la enfermedad; *L. braziliensis*, *L. guyanensis*, *L. shawi*, *L. lainsoni*, *L. naiffi*, *L. lindenbergi* y *L. amazonensis* (14).

Si bien la técnica no permite discriminar entre *L. braziliensis* y *L. peruviana*, según lo publicado por Marfurt *et al*, porque generan el mismo patrón de bandas con el corte con la enzima usada en el estudio, esto no es un problema para nosotros ya que no hay antecedentes de *L. peruviana*, en nuestra zona, y se reporta esta especie limitada geográficamente a la zona alta de los Andes de Perú, pero por otro lado se podría emplear otros genes que permiten diferenciar estas dos especies, por ejemplo, usando el gen *gp 63* (13), o el gen *cpb* ambos muestran patrones característicos para *L. braziliensis* y *L. peruviana* (18).

Por otro lado también se definió como circulante a la especie *L. chagasi* causante de la leishmaniosis visceral en distintas zonas del país. Se encontró el mismo patrón de bandas tanto en aislados de origen humano como los de origen canino y a su vez en los aislados de origen canino procedentes de la zona de Asunción y distritos de los departamentos; Central, Cordillera, Encarnación, Amambay, Guairá y Misiones. En vista que la especie circulante es única, se podría buscar en estudios posteriores otros genes como blanco que permitan identificar genotipos o perfiles genéticos diferentes entre cepas de esta especie (19,20) y que puedan correlacionarse con algún factor epidemiológico.

Otra ventaja que presenta esta técnica, es que a diferencia de otras utilizadas para la identificación de especies; como electroforesis de isoenzimas, serodemas, lo cual requiere el aislamiento del parásito, esta técnica no requiere del cultivo de parásitos y puede ser empleada directamente en muestras clínicas. Adicionalmente mostró ser sensible debido al carácter repetitivo del marcador genético empleado (6) y se pudo observar en el presente estudio, que el límite de detección del ensayo fue de 10 pg, asumiendo que el ADN total contenido en el parásito de *Leishmania* es aproximadamente 100 fg por genoma (6), igual sensibilidad fue reportada por Acardi *et al* (20).

Los hallazgos descritos en este trabajo tienen una implicación a nivel epidemiológico, pudiendo contribuir a seguir diseñando e intensificando las estrategias de vigilancia y control de la enfermedad en sus diversas formas en todas las áreas consideradas como endémicas dentro del territorio nacional.

Es interesante resaltar que este trabajo es el primero en el país en realizar la caracterización molecular a nivel de especies de *Leishmania* con un número significativo de aislados, de distintas procedencias y tanto de la forma visceral como cutánea de la enfermedad.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Edgar Galeano y a la Dra. Mónica Ozorio por su colaboración en la toma de muestra de perros, a la Dra. Cristina Romero por su colaboración en el mantenimiento de las cepas. Este trabajo ha recibido financiación parcial de la Unión Europea (Proyecto LeishEpiNetSA, Contr. No. 15407).

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Cupolillo E, Brahim LR, Toaldo CB, Oliveira-Neto MP, Felinto de Brito ME, Falqueto A, et al. Genetic polymorphism and molecular epidemiology of *Leishmania (Viannia) braziliensis* from different hosts and geographic areas in Brazil. J. Clin. Microbiol. 2003; 41 (7): 3126-32.
2. World Health Organization. Control of the leishmaniasis. Geneva: World Health Organization; 1990. (Technical Report Series, 793).
3. Grimaldi G, Tesh RB. Leishmaniasis of the New World: current concepts and implications for future research. Clin Microbiol Rev. 1993; 6(3): 230-50.
4. Bañuls A, Hide M, Prugnolle F. *Leishmania* and the leishmaniasis: a parasite genetic update and advances in taxonomy, epidemiology and pathogenicity in humans. Adv Parasitol 2007; 64:1-109.

5. García AL, Kindt A, Quispe-Tintaya KW, Bermudez H, Llanos A, Arévalo J, et al. American tegumentary leishmaniasis: antigen-gene polymorphism, taxonomy and clinical pleomorphism. *Infect. Gen. and Evol.* 2005; 5: 109-16.
6. Marfurt J, Niederwieser I, Makia ND, Beck H, Felger I. Diagnostic genotyping of Old and New World *Leishmania* species by PCR-RFLP. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2003; 46(2): 115-24.
7. Harris E, Kropp G, Belli A, Rodriguez B, Agabian N. Single-step multiplex PCR assay for characterization of New World *Leishmania* complexes. *J Clin Microbiol* 1998; 36 (7): 1989-95.
8. Servicio Nacional de Erradicación de Enfermedades Vectoriales (SENEPA- MSP y BS) Boletín informativo semanal N° 11. Asunción; 2010.
9. Servicio Nacional de Erradicación de Enfermedades Vectoriales (SENEPA- MSP y BS) Boletín informativo semanal N° 7. Asunción; 2010.
10. Van Eys, GJ, Schoone GJ, Kroon NC, Ebeling SB. Sequence análisis of small subunit RNA genes and its use for detection and identification of *Leishmania* parasites. *Mol. Biochem. Parasitol.* 1992; 51, 133-42.
11. Piarroux R, Gambarelli F, Dumon H, Fontes M, Dunan S, Mary C, et al. Comparison of PCR with direct examination of bone marrow aspiration, myeloculture, and serology for diagnosis of visceral Leishmaniasis in immunocompromised patients. *J Clin Microbiol* 1994; 32(3): 746-9.
12. Cupolillo E, Grimaldi G, Momen H, Beverley SM. Intergenic region typing (IRT): a rapid molecular approach to the characterization and evolution of *Leishmania*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 1995; 73: 145-55.
13. Victoir K, Bañuls AL, Arévalo J, Llanos-Cuentas A, Hamers R, Noel S, et al. The gp63 gene locus, a target for genetic characterization of *Leishmania* belonging to subgenus. *Viannia Parasitol.* 1998; 117: 1-13.
14. Rodgers MR, Popper SJ, Wirth DF. Amplification of kinetoplast DNA as a tool in the detection and diagnosis of *Leishmania*. *Exp Parasitol.* 1990; 71(3): 267-75.
15. Sambrook J, Fritsch E, Maniatis T. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual.* New York : Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1994.
16. Belli A, Rodriguez B, Aviles H, Harris E. Simplified polymerase chain reaction detection of new world *Leishmania* in clinical specimens of cutaneous leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* 1998; 58(1): 102-9.
17. Perez JE, Veland N, Espinosa D, Torres K, Ogusuku E, Llanos-Cuentas A, et al. Isolation and molecular identification of *Leishmania (Viannia) peruviana* from naturally infected *Lutzomyia peruensis* (Diptera: Psychodidae) in the Peruvian Andes. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2007; 102(5): 655-8.
18. Guerbouj S, Victoir K, Guizani I, Seridi N, Nuwayri-Salti N, Belkaid M, et al. Gp 63 gene polymorphism and population structure of *Leishmania donovani* complex: influence of the host selection pressure?. *Parasitology.* 2001; 122: 25-35.
19. Peres Alonso D, Lamounier Costa D, Lopes de Mendonça I, Nery Costa CH, Martins Ribolla PE. Short Report: Heterogeneity of *Leishmania infantum chagasi* Kinetoplast DNA in Teresina (Brazil). *Am J Trop Med Hyg.* 2010; 82 (5): 819-21.
20. Acardi SA, Liotta DJ, Santini MS, Romagosa CM, Salomón OD. Detection of *Leishmania infantum* in naturally infected *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) and *Canis familiaris* in Misiones, Argentina: the first report of a PCR-RFLP and sequencing-based confirmation assay. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2010; 105 (6): 796-9.