

ARTÍCULO ORIGINAL

**CARACTERIZACIÓN MOLECULAR
DE PARÁSITOS AISLADOS DE
PERROS DIAGNOSTICADOS CON
LEISHMANIASIS VISCERAL EN EL
CENTRO ANTIRRÁBICO NACIONAL
(CAN) DE PARAGUAY AÑOS 2012- 2013¹**

*MOLECULAR CHARACTERIZATION OF
LEISHMANIA INFANTUM ISOLATED
FROM DOGS DIAGNOSED WITH
VISCERAL LEISHMANIASIS OF THE
NATIONAL ANTIRABIC CENTER OF
PARAGUAY -YEARS 2012-2013.¹*

Nilsa González Britez²

Nilda Portillo²

1 Trabajo presentado por el Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud y financiado con rubros del Rectorado de la Universidad Nacional de Asunción, durante el año 2013.

2 Docentes investigadores

RESUMEN

La leishmaniasis visceral (LV) es una severa enfermedad causada por el parásito *Leishmania infantum*, que es transmitido por la picadura de flebótomos del género *Lutzomyia* y en zonas urbanas involucra al perro como reservorio principal. En Asunción, se ha registrado elevado porcentaje de infección en reservorios (32%), lo que involucra el incremento del riesgo de infección humana y hasta el momento no se dispone de un método con poder discriminatorio que se pueda aplicar de manera universal a la identificación de *Leishmania*, considerando que otras cepas podrían estar en simpatria en un mismo foco. Este estudio evaluó si los aislados de perros diagnosticados con LV del Centro Antirrábico Nacional (CAN) corresponden a *L. infantum*. Las muestras de perros fueron cultivadas en NNN para la extracción de ADN y amplificadas por PCR. El análisis indicó la región específica de 1300 pb en el gen de *hsp70* como un blanco válido sensible para la detección del parásito. Con la restricción enzimática del producto todos los aislados mostraron perfiles correspondientes a *L. infantum*.

PALABRAS CLAVES: Leishmaniasis visceral, *Leishmania infantum*, *hsp70* (proteína del choque térmico de 70 kD).

ABSTRACT

Visceral leishmaniasis (VL) is a severe disease caused by the parasite *Leishmania infantum*, which are

transmitted for bite of sandflies of the genus *Lutzomyia* sp. in urban areas involves the dog as the main reservoir. In Asunción, is registered high percentage of infection reservoirs (32%), which involves the increased risk of human infection and so far there is no discriminatory power method that can be applied universally to identify *Leishmania*, considering other strains could be in sympatric in one focus. This study assessed whether isolated from dogs diagnosed with LV in the National center Anti-Rabies (CAN) correspond to *L. infantum*. Dogs samples were grown in NNN medium for DNA extraction and PCR amplified. The analysis indicated the specific region of 1300 pair base in the *hsp70* gene as a valid target for sensitive detection of the parasite. With the enzymatic restriction product all isolates showed profiles corresponding to *L. infantum*.

KEY WORDS: Visceral Leishmaniasis, *Leishmania infantum*, *hsp70* (shock termic protein 70kD).

INTRODUCCIÓN

Leishmania infantum, es un protozoo flagelado de la familia Tripanosomatidae, es el agente causal de la Leishmaniasis Visceral (LV), la cual constituye un serio problema de salud pública siendo endémica en 98 países de cuatro continentes. (PAHO-WHO, 2012; Vásquez et al, 2002).

En América el reservorio principal de la leishmaniasis visceral urbana es el perro doméstico infectado y en el ciclo rural del norte de América del Sur

podrían estar involucrados también roedores y marsupiales. (Echenique et al., 2010).

La infección en los caninos es causada por parásitos del subgénero *Leishmania*, especie *L. infantum*. El impacto de la parasitosis canina se visualiza en las implicaciones en la salud pública, debido a su carácter zoonótico; en la afectación de la sanidad animal, teniendo en cuenta incidencia de la enfermedad, dificultad en el diagnóstico y el costo efectividad del tratamiento. Dada la importancia epidemiológica de los caninos en el control de la leishmaniasis visceral y la necesidad de determinar el impacto real de la infección en las zonas endémicas, es fundamental el empleo de pruebas diagnósticas eficientes, que no subestimen la prevalencia de la enfermedad y que permitan obtener resultados confiables, minimizando reacciones falsas positivas así como reacción cruzada con otros parásitos. (Canesse et al., 2011, Torres et al., 2009).

En años anteriores Paraguay ha notificado tasas de *L. infantum* en perros del 58%, para el Dpto. Central (Miret et al., 2010).

En el año 2012, el Centro Antirrábico Nacional registró sobre el total de muestras caninas analizadas, que 3546 perros con resultado serológico positivo (28,3%) para leishmaniasis visceral (Miret y cols., 2012).

Teniendo en cuenta estos datos y que la taxonomía del género *Leishmania* no está definitivamente cerrada, existe la necesidad de caracterizar

las poblaciones de hemoflagelados que proceden de los reservorios mamíferos, con el fin de mejorar el diagnóstico y reevaluar las recaídas o reinfecciones. Es bien sabido que hasta el momento no existe un método con alto poder discriminatorio, que se pueda aplicar de manera universal a la identificación de *Leishmania*, es decir que no existe consenso en relación con la metodología más apropiada para la identificación.

Por tanto, se siguen utilizando diversas técnicas moleculares que faciliten la identificación de entidades taxonómicas de *Leishmania* (Montalvo, 2006), así como niveles de variación inter e intra especies. Las técnicas frecuentemente usadas son RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), IRT (Intergenic Ribosomal Typing) o la reacción en cadena de la polimerasa (Polymerase Chain Reaction) que ha incrementado la sensibilidad y especificidad en la detección del parásito y combinada con la técnica de polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción o RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism). Los patrones de bandas resultantes se generan por la presencia o ausencia de los sitios de corte de la enzima y la variabilidad está dada por los tamaños distintos de estos fragmentos. Así esta técnica de PCR –RFLP se ha erigido en una importante herramienta, no solo para la identificación, sino para la caracterización de especies (Canova, 2007).

Las dianas genéticas más utilizadas para desarrollar la PCR-RFLP son los genes que codifican la glicoproteína

de 63 kd (*gp63*) (Victoir *et al.*, 2003) y la proteína de 70 kd (*hsp70*) (García *et al.*, 2004). Entre estas dianas, el gen que codifica la proteína *Hsp70* citoplasmática en *Leishmania* está altamente conservada en numerosos organismos y no está sujeto a selección (Folgueira y Requena, 2007). Así estas técnicas permiten la diferenciación entre las especies: *L. donovani*, *L. infantum*, *L. chagasi*, *L. aethiopica*, *L. tropica*, *L. major*, *L. mexicana*, *L. amazonensis*, *L. braziliensis*, *L. guyanensis* y *L. panamanensis* (Miranda *et al.*, 2003).

Finalmente se destaca que la identificación y caracterización precisa de las especies es importante para determinar por ejemplo; diferentes esquemas de tratamiento según la clínica que presente el organismo parasitado. La caracterización, por tanto, de especies de *Leishmania sp.*, es necesaria para alcanzar los objetivos epidemiológicos, así como para documentar la distribución de las especies y diseñar medidas de control apropiadas (Orue, 2005-Adamuz 2008, De Santis *et al.*, 2012). Por tanto el estudio resulta de especial relevancia para evaluar si los aislados de los caninos corresponden a la especie en estudio, considerando que más de una especie de parásito podría encontrarse en un mismo foco, y la falta de determinación adecuada podría presentar implicaciones clínicas y taxonómicas, o bien modificaciones tales como la resistencia a fármacos y cambios en la patogenicidad.

La leishmaniasis visceral constituye un problema creciente en el ámbito de la salud pública debido a la

mayor exposición de las personas frente a los vectores de la enfermedad, quizás por la mayor densidad de vectores en las zonas urbanas a causa de factores como la urbanización continua y/o a la tala de árboles. De esta forma, con la caracterización molecular se pretende conocer mejor el comportamiento y las variaciones genéticas de las especies que están involucradas con la transmisión de la Leishmaniasis visceral en Paraguay, teniendo en cuenta que la variabilidad dentro de un mismo foco podría representar un problema en el momento de proponer medidas preventivas y realizar el tratamiento de la enfermedad. Por esta razón se propone caracterizar las cepas de *L. infantum* que afectan actualmente a cáninos y por ende puede afectar a los humanos.

El estudio busca evaluar si los parásitos aislados de perros diagnosticados con leishmaniasis visceral, en el Centro Antirrábico Nacional (CAN) de Paraguay corresponden a la especie *L. infantum*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Área de estudio: Se tomaron muestras de diversos barrios del área metropolitana de Asunción, acorde a la disponibilidad del CAN. (Municipios de San Lorenzo, Lambaré, Fernando de la Mora, Villa Elisa y otros.)

Diseño y criterios del trabajo

Se realizó un estudio de tipo observacional descriptivo de corte transversal. Las muestras tomadas consistieron en trocitos de tejido del bazo y gan-

glio linfático, obtenido de perros que fueran destinados a eutanasia humanitaria con diagnóstico positivo para Leishmaniasis Visceral en el CAN. La muestra fue tomada desde el mes de diciembre del 2012 hasta agosto de 2013 acorde a la disponibilidad del CAN. Se incluyó una N=40 perros de diversas razas, edad y de ambos sexos, todos procedentes del área metropolitana de Asunción. Se realizó un muestreo no probabilístico por conveniencia.

Las muestras fueron procesadas inmediatamente y cultivadas en triplicado, en medio de cultivo bifásico de Agar Sangre, NNN, 3N (Medio de Novy, McNeal, Nicolle). Los cultivos fueron controlados cada 48 horas hasta lograr una concentración de crecimiento de 10^6 parásitos/mL. Como control de crecimiento y para fines comparativos se cultivaron las cepas de referencia *L. infantum* M/CAN/ES/96/BCN 150 y *L. braziliensis* M/Hom/CO/88/UA 301, mantenidas en medio de cultivo Schneider's en el Dpto. de Medicina Tropical.

Extracción de ADN genómico a partir de muestras de cultivo: A partir de alícuotas de 200 μ L del cultivo NNN que contenía los parásitos, se procedió a realizar la resuspensión de los parásitos en buffer de lavado PBS (tampón fosfato 0,1 mol/L, NaCl 0,15 mol/L) pH= 7,2. Los procedimientos posteriores se realizaron siguiendo el protocolo del fabricante. (PureLink® Viral RNA/DNA Mini Kit, USA). El sedimento resuspendió en 50 o 100 μ L de agua milli Q estéril.

El ADN total aislado fue chequeado por electroforesis en agarosa (0.8% w/v). La electroforesis fue corrida a 100 V en buffer TAE 1X durante 45 minutos. La concentración de ADN fue calculada de manera aproximada de forma comparativa por la intensidad obtenida, con el patrón de peso comercial.

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR): amplificación del gen de la proteína del choque térmico de 70 kD (Hsp70).

Se utilizó la PCR para amplificar los genes de interés. En primer lugar el gen que codifica la Hsp70, constituye el blanco del análisis (García *et al.*, 2004). Este gen se amplificó para la obtención de las secuencias nucleotídicas correspondientes al parásito en un tamaño de 1300 pares.

Cebadores para la amplificación del gen hsp70

Se utilizaron cebadores que amplifican una región de 1,3 Kpb del gen que codifica la proteína Hsp70 reportados por García *et al.*, 2004 y sintetizados por Life Technology (USA). Estos son:

HSP70Sen:

GACGGTGCCTGCCTACCAA

HSP70Anti: CCGCCCATGCTCTG-
ACATC

Optimización de la PCR- Hsp70

Se utilizaron las dos cepas de referencias además de algunas muestras

propias para del estudio. La mezcla de reacción (50µl), contenía 200 µM de cada dNTP; 1X del tampón (Tris-HCl 670 mmol/L pH=8,8; (NH₄

2SO₄ 160 mmol/L; Tween 20 (0,1%) y cantidades variables de MgCl₂ (1,5; 2,0; 2,5 y 3 mmol/L); enzima Taq platinum DNA polimerasa (1,5 U) y cebador (5- 10 – 20 umol/uL). Además, 0,25 % de DMSO y 10 ng de ADN genómico. Se incluyó en todos los experimentos agua destilada como control negativo.

Las reacciones de amplificación se realizaron en los termocicladores PTC-100 Mini-Cycler (MJ Research, Waltham, MA, EUA).

Condiciones de la PCR- hsp 70

Se realizaron mezclas con volúmenes finales de 25 y 30 uL., conteniendo los reactivos del kit de PCR de la Taq Platinum de Invitrogene.

El protocolo consistió: desnaturalización inicial (94°C, 2 min) seguido de 40 ciclos de desnaturalización (94°C, 30 seg), hibridación (60°C, 1min) y extensión (72°C, 3 min), con una extensión final a 72°C, 10 min, para obtener un amplicón de 1300 pb. Electroforesis en agarosa (Verificación de Amplificación)

Los resultados de la amplificación se verificaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 2 % en tampón de corrida TAE, corrida a 100 V durante 1 hora. La electroforesis se visualizó en un transiluminador de luz UV.

Restricciones Enzimáticas

Los productos amplificados se utilizaron para realizar las correspondientes restricciones enzimáticas. en un volumen total de 10µl, se utilizó 5µl del ADN precipitado, tampón de la enzima y la enzima *HaeIII*, siguiendo las instrucciones del fabricante. La mezcla se centrifugó brevemente previa incubación. Los tubos se colocaron en baño maría a 37°C, y se incubó toda la noche. Posteriormente, los productos de la digestión se visualizaron mediante corrida electroforética teñida con bromuro de etidio.

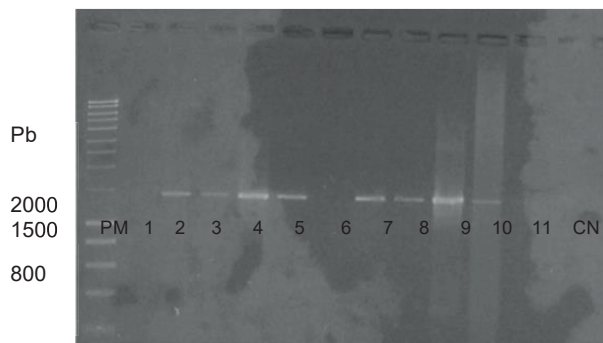
El marcador de peso molecular utilizado fue el hiperladder V de Bionline (USA). Esto permitió comparar los patrones de bandas entre los aislados.

RESULTADOS

Se establecieron las condiciones y se optimizaron los parámetros analíticos necesarios para lograr una amplificación adecuada del gen *hsp70* mediante PCR.

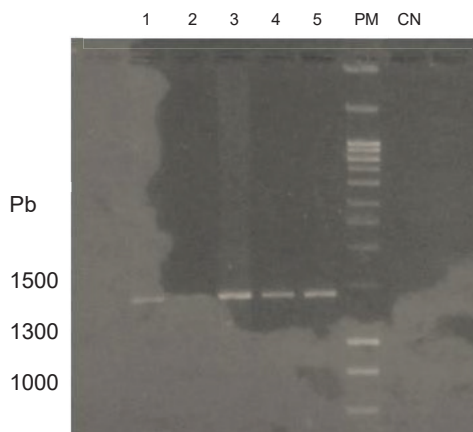
Las condiciones óptimas de la mezcla de reacción fueron: concentración de cebadores (10µmol/L de cada uno), MgCl₂ (1 mmol/L) y cantidad de la enzima empleada (1 U), los demás parámetros se utilizaron siguiendo las condiciones recomendadas por la literatura (García et al., 2004). Los resultados obtenidos en la evaluación de cada uno de estos componentes, pueden observarse en las figuras 1 y 2.

Figura 1: En la foto se muestran los productos de amplificación por PCR del gen de la proteína del choque térmico Hsp 70, de los aislados de parásitos de *Leishmania sp* que proceden de muestras de perro y de muestras de referencia mantenidas en el laboratorio de Medicina Tropical.



Referencias: PM = Peso molecular Hiperladder I 200 pb (Bioline,USA, Inc). Carril 1 a 7: aislados de parásitos de perros positivos con leishmaniasis procedentes del CAN, Asunción. Carril 8: *L. braziliensis* (cepa referencia), Carril 9: *L. infantum* (cepa referencia), Carril 10: *T. cruzi*, (sin amplificación), Carril 11: *L. amazonensis* (sin amplificación), CN: control negativo.

Figura 2: Amplificación por PCR del gen de la proteína del choque térmico Hsp 70, de aislados de parásitos de *Leishmania sp* previamente cultivada en medio NNN a partir de muestras de perros positivos que llegaron al CAN.



Referencias: Carril 1 a 5: aislados de parásitos de diferentes perros positivos con leishmaniasis procedentes del CAN, Asunción. PM: Peso molecular Hiperladder I 200 pb (Bioline,USA, Inc). CN: Control negativo.

Bajo estas condiciones, se obtuvo amplificación mediante PCR *hsp70* en las 37 muestras de *Leishmania* analizadas. Tres muestras no amplificaron por probable degradación del ADN.

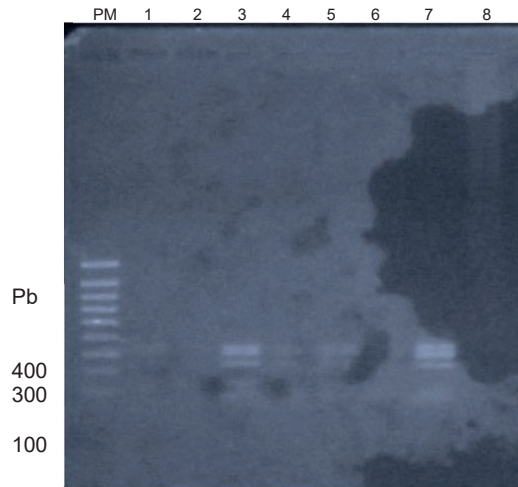
Polimorfismo en la Longitud de los Fragmentos de Restricción (RFLP) con enzima de restricción *HaeIII*

La digestión de los productos de amplificación con la enzima *Hae III*,

mostro reconocimiento de sitios en la secuencia del ADN del gen de la proteína de choque térmico de 70 kD (*Hsp70*) de *Leishmania* y los detalles individuales del patrón teórico de digestión para cada secuencia se pueden observar en la figura 3, donde se indi-

ca también la talla teórica de los fragmentos de restricción. El análisis del tamaño de los fragmentos generados permitió establecer los patrones de bandas características para la especie, registrando la presencia o ausencia de bandas en cada caso.

Figura3: Producto de la digestión con *Hae* III obtenido mediante el método PCR- RFLP. Perfil de bandas correspondiente al corte de fragmentos obtenidos entre 100 y 400 pb.



Referencias: PM = peso molecular de 50 pb (Bioline). Carril 1 a 7: aislados de parásitos de perros procedentes del CAN, Asunción. Carril 8: *L. braziliensis* (referencia), Carril 9: *L. infantum* (referencia), Carril 10: *T. cruzi*, (sin amplificación), Carril 11: *L. amazonensis* (sin amplificación), CN: control negativo.

DISCUSIÓN

Los datos de vigilancia epidemiológica a nivel global indican que el número de casos de leishmaniasis se ha incrementado en las últimas décadas.

Esto puede explicarse, en parte, por el desarrollo de nuevos métodos diagnósticos y, por tanto, el reporte de más casos, pero también por otras razones como el control inadecuado de vectores o de reservorios, la urbanización del vector, la deforestación, la resistencia a los medicamentos (Reithinger et al., 2007)

Los métodos moleculares, en particular los que se basan en la PCR, han demostrado ser sensibles y específicos para lograr la identificación de especies de *Leishmania* y facilitan la posterior discriminación de especímenes que infectan humanos, reservorios y vectores a partir de distintos tipos de muestras (Maia et al., 2009).

Estas características de la PCR facilitan, al mismo tiempo, su aplicabilidad a escala epidemiológica en distintos contextos geográficos (Katakura, 2009). Sin embargo, hasta el momen-

to ninguno de los métodos reportados se considera de referencia.

En este estudio se mantuvieron cultivos de ganglios y bazo de cada perro, hasta obtener la cantidad necesaria para la extracción de ADN, así como para la crío preservación de los parásitos. Los demás órganos (hígado y/o biopsias de diversos órganos) no se pudieron procesar debido al costo elevado que implica este tipo de reacciones, sin embargo las mismas fueron conservadas en congeladores – 70 para posteriores estudios.

Por otro lado, un principio fundamental para el uso de la PCR continúa siendo la búsqueda de su optimización, con el fin de garantizar una amplificación exitosa, ya sea cuando se establece por primera vez en un laboratorio, cuando o se utilizan por primera vez un juego de cebadores, como se realizó en este trabajo.

La digestión con la enzima *Hae* III, mostro reconocimiento de sitios en la secuencia del ADN del gen de la proteína de choque térmico de 70 kD (*Hsp70*) de *Leishmania sp.* Sin embargo, cabe destacar aquí, que aun no se ha logrado la optimización completa del método de PCR-RFLP, a pesar de observar restricción de la enzima en sitios similares para todos los fragmentos de esta proteína procedente de parásitos aislados de diferentes individuos (perros). Es decir que se verifico correspondencia con *L. infantum* con similitud entre los patrones encontrados, similar a otros trabajos previos (Montalvo et al., 2008, Vol-

pini et al., 2004). Este resultado indicó que a pesar de los perfiles poco claros, no se observó polimorfismo en los aislados analizados en relación a este gen, demostrando parte de los fragmentos característicos de la especie y la aparente ausencia de variantes genéticas en los fragmentos observados. Estos resultados mostraron una buena concordancia con los sitios de los fragmentos que fueron cortados con la enzima *Hae* III para la especie en estudio.

Por tanto el resultado muestra que la técnica aun requiere ser estandarizada para las condiciones de nuestro laboratorio y con este estudio se debe investigar las variables que permitan la optimización de resultados con el fin de obtener los perfiles de digestión de forma nítida y con bandas separadas, lo que permitiría una mejor visualización y diferenciación de los fragmentos característicos de *L. infantum*. Con la optimización de esta técnica, podría realizarse con más frecuencia los estudios de amplio espectro a nivel de epidemiología molecular y con la inclusión de protocolos de los métodos moleculares a algoritmos diagnósticos de la leishmaniasis permite responder la pregunta epidemiológica de cuál es la especie de parásito involucrada en la enfermedad. A pesar de este valioso aporte, resta aún evaluar protocolos con mayor sensibilidad diagnóstica.

CONCLUSIONES

- Se optimizo el método diagnóstico por PCR para *Leishmania*

- sp.* utilizando el gen de la proteína de choque térmico de 70 kD. (*Hsp70*)
- El genotipo de los parásitos que circulan en los reservorios caninos ha presentado un perfil bastante homogéneo, por tanto es indicativo de la carencia o la reducida cantidad de variantes genéticas en el fragmento en estudio, aunque se requieren más estudios para afirmar esta conclusión.
 - Se determinó el perfil característico de bandas de cada aislado a pesar de la necesidad de optimizar la RFLP para identificar los tamaños exactos de los sitios de corte de los fragmentos.
 - Según los patrones observados, los parásitos aislados de perros diagnosticados con leishmaniasis positiva han demostrado perfiles genéticos, similares al descrito por otros autores para *Leishmania infantum*. Sin embargo, los perfiles obtenidos como resultado de la técnica de RFLP no son suficientes para realizar esta afirmación y se recomienda continuar con la optimización del método.

AGRADECIMIENTO

A Coral Franco por su incansable ayuda en el mantenimiento de los cultivos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMUZ J. 2008.** Caracterización Bioquímica y Molecular de Tripanosomátidos aislados de perro en Es-

paña. 2008 [Tesis de doctorado] Universidad Complutense de Madrid; España.

CANESSE A., MACIEL J., ODDONE R. 2011. Ministerio de Salud Pública y Bienestar Social. Servicio Nacional de Erradicación del Paludismo, SENEPA. Manual de Diagnóstico y tratamiento de las Leishmaniasis. Asunción-Paraguay. 17-22.

CANNOVA DC. 2007. Técnicas de caracterización de *Leishmania spp* y su aporte en la leishmaniasis. Rev de la Facultad de Ciencias de la Salud. Universidad de Carabobo. Vol.11, Supl. N° 1.

DE SANTIS B, SANTOS E G, OLIVEIRA B, CUPOLILLO E, PORROZZI R, CAVALCANTI A, SANTOS B. ET AL. 2011. Characterization of *Leishmania infantum* species in dogs from the urban area of Cuiabá, State of Mato Grosso, Brazil. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. (cited 2012 July 04] ; 44(6): 771-773.

ECHENIQUE H., MORAL M., HIDALGO S., ORDUNA T., RIASTE A., RUVISNKY S., SALOMÓN D. 2010. Enfermedades infecciosas Leishmaniasis visceral Guía para el equipo de salud Nro. 5. Dirección de Epidemiología.

FOLGUEIRA C, REQUENA JM. 2007. A postgenomic view of the heat shock proteins in kinetoplastids. FEMS Microbiol Rev, 31:359-77.

GARCIA L., KINDT A, BERMÚDEZ H, LLANOS-CUENTAS A,

- DE DONCKER S, ARÉVALO J, ET AL. 2004.** Culture-independent species typing of neotropical *Leishmania* for clinical validation of a PCR-based assay targeting heat shock protein 70 genes. *J Clin Microbiol*;42:2294-7.
- KATAKURA K .2009.** Molecular epidemiology of leishmaniasis in Asia (focus on cutaneous infections) *Curr Opin Infect Dis*; 22:126-30.
- Maia C, Afonso M, Neto L, et al. 2009. Molecular detection of *Leishmania infantum* in naturally infected *Phlebotomus perniciosus* from Algarve Region, Portugal. *J Vector Borne Dis* ;46:268-72.
- MIRANDA H, ALFARO A, LORA C, RODRÍGUEZ L.2003.** Estudio comparado de métodos de diagnóstico de la leishmaniasis y caracterización molecular de los agentes etiológicos en la Libertad. *Folia Dermatol.* 14 (2): 18-23
- MIRET J, GALEANO E, SOSA L, OCAMPOS H, MARTÍNEZ R, OJEDA J, CASTAGNINO M. 2012.** Leishmaniasis visceral canina en el Paraguay año 2012. Presentado en la III Muestra Nacional de Epidemiología. As-Py., 24-26 noviembre.
- MIRET J, SOSA L, GALEANO E, OCAMPOS H, MARTÍNEZ R, OJEDA J, CASTAGNINO M. 2010.** Situación epidemiológica de la leishmaniasis canina en el Paraguay (años 2005-2010). I Muestra Nacional de Epidemiología. As-Py. *Rev Parag Epidemiol.* 1 (1): 74.
- MONTALVO AM, FRAGA J, ROMERO JA, MONZOTE L, MONTANO I, DUJARDIN JC. 2006.** PCR-RFLP/Hsp70 para identificar y tipificar *Leishmania* de la región neotropical. *REV CUBANA MED TROP*;58(3):226-34
- Orué A. 2005. Marcadores moleculares en Kinetoplastida: Secuencias diagnósticas de DNA nuclear de los subgéneros *Vivax* y *Leishmania* y el desarrollo de un ensayo múltiple de PCR (Multiplex PCR) en la identificación del parásito. *Memorias del Instituto de Biología Experimental.* 4:121-124.
- PAHO-WHO. LEISHMANIASIS. 2012** [Consultado mayo 13, 2012]; Disponible en: http://new.paho.org/hq/index.php?option=com_content&task=blogcategory&id=3835&Itemid=4098&lang=en
- REITHINGER R, DUJARDIN JC. 2007.** Molecular diagnosis of leishmaniasis: Current status and future applications. *J Clin Microbiol.* 45:21-5.
- TORRES F.2009.** Canine leishmaniasis in South America. *Parasit Vectors*; 2(Suppl 1): S1.
- VÁSQUEZ L, SIERRA D, ROJAS E. 2002.** Transmission mechanisms of Leishmaniasis. *Rev.Soc.Ven.Microbiol.* 22;347(4):284-7.
- VICTOIR K, DE DONCKER S, CABRERA L, ET AL.2003.** Direct identification of *Leishmania* species in biopsies from patients with American tegumentary leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 97:80-7.

VOLPINI A, PASSOS V, OLIVEIRA G, ROMANHA A. 2004. PCR-RFLP to identify *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* and *L. (Leishmania) amazonensis* causing American cutaneous leishmaniasis. *Acta Trop. Mar*; 90(1):31-7.