LEISHMANIOSIS CANINA: HERRAMIENTAS MOLECULARES UTILIZADAS PARA EL DIAGNÓSTICO E INVESTIGACIÓN A PARTIR DE MUESTRAS BIOLÓGICAS.

LEISHMANIOSIS CANINE: MOLECULAR TOOLS USED FOR DIAGNOSIS AND RESEARCH FROM BIOLOGICAL SAMPLES.

González Barrios, Laura Alicia¹

¹Universidad Nacional de Asunción. Facultad de Ciencias Veterinarias. Departamento de Ciencias Patológicas. San Lorenzo – Paraguay.

RESUMEN. La Leishmaniasis, entidad nosológica de origen parasitario y de distribución mundial, es considerada zoonótica, ya que afecta a humanos, animales domésticos y salvajes de todo el mundo. La característica más importante de la Leishmaniasis canina es su extraordinario polimorfismo clínico, lo cual dificulta la elección de un buen método laboratorial. Los métodos de diagnóstico disponibles en el país, para la confirmación del diagnóstico clínico son el serológico, el citológico y los moleculares. Los métodos moleculares presentan grandes ventajas, sin embargo debido a su poca utilización en centros de diagnóstico veterinario, y al desconocimiento por la mayoría de los médicos veterinarios, no son implementados como técnicas de diagnóstico de rutina. En países vecinos y otros lugares del mundo está ampliamente difundida y en muchos de los casos es utilizada como prueba base para el diagnóstico de la enfermedad, a través de la detección del DNA parasitario, a partir de biopsias de médula ósea, nódulos linfáticos y demás tejidos. Por ello en el siguiente artículo, tiene como objetivo dar a conocer los métodos moleculares utilizados en el mundo y en nuestro país, con el objetivo de brindar herramientas útiles al Médico Veterinario para llegar al diagnóstico certero y al investigador interesado en conocer aún más sobre la biología del parásito.

Palabras clave: Leishmaniasis, diagnóstico, AND, métodos moleculares

ABSTRACT. Leishmaniasis, a nosological entity of parasitic origin and worldwide distribution, is considered zoonotic, as it affects humans, domestic and wild animals from around the world. The most important characteristic of canine Leishmaniasis is its extraordinary clinical polymorphism, which makes it difficult to choose a good laboratory method. Diagnostic methods available in the country for confirmation of clinical diagnosis are serological, cytological and molecular. Molecular methods have great advantages, however due to their lack of use in veterinary diagnostic centers and the lack of knowledge of most veterinarians, they are not implemented as routine diagnostic techniques. In neighboring countries and elsewhere in the world it is widely disseminated and in many cases is used as a basic test for the diagnosis of the disease, through the detection of parasitic DNA, from bone marrow biopsies, lymph nodes and other Tissues. Therefore, in the following article, the objective is to make known the molecular methods used in the world and in our country, with the objective of providing useful tools to the Veterinarian to arrive at the accurate diagnosis and to the researcher interested in knowing even more about the biology of the parasite.

Keywords: Leishmaniasis, diagnosis, DNA, molecular methods

doi: 10.18004/compend.cienc.vet.2018.08.02.36-43

Dirección para correspondencia: Dra. Laura Alicia Gonzalez Barrios - Departamento de Ciencias Patológicas - Facultad de Ciencias Veterinarias - Universidad Nacional de Asunción - Casilla de Correo N° 1061 - Ruta Mcal. Estigarribia Km 10,5 - Campus Universitario - San Lorenzo - Paraguay

E-Mail: alibuvet@gmail.com

Recibido: 12 de octubre de 2017 / **Aceptado:** 12 de setiembre de 2018

INTRODUCCIÓN

La Leishmaniasis es una enfermedad infecciosa causada por un protozoo parásito del género *Leishmania*, el cual cuenta con más de 20 especies identificadas, algunas de ellas aun en discusión, y de distribución mundial. Siendo una enfermedad de carácter zoonótico (1), dicho comportamiento representa una preocupación epidemiológica, por lo tanto, es de suma importancia el desarrollo de técnicas eficaces para la correcta identificación y tipificación del parásito, ya que con el paso del tiempo, la distribución de la enfermedad ha sido amplia debido a la globalización y desplazamiento de la población, a través de la adquisición de caninos aparentemente sanos provenientes de áreas endémicas. Las infecciones por *Leishmania* tienen seis formas clínicas, definidas por la localización del parásito en los tejidos infectados: Visceral (VL), Leishmaniasis dérmica post-kalazar (PKDL), Cutánea (CL), Leishmaniasis Cutánea Difusa (DCL), Mucocutánea (MCL) y Mucosa (ML). La forma más común es CL: más del 90% de los casos son distribuidos en tres regiones principales: (i) Afganistán, Irán, Arabia Saudita Arabia y Siria; (ii) Argelia y Túnez; y (iii) Brasil y Perú. Más del 90% de los casos de LV menos común pero más patógena ocurren en otros tres focos geográficos: (i) Bangladesh, India y Nepal; (ii) Etiopía, Kenia y Sudán; y (iii) noreste de Brasil (Alvar et al., 2012). En Paraguay, un estudio realizado por Chena y colaboradores en el año 2013, permitió detectar en muestras tanto de humanos como de perros con sospecha de Leishmaniasis visceral y Leishmaniasis cutánea al complejo *L. donovani*, y complejo *L. braziliensis* respectivamente. (2,3). A lo largo del tiempo fueron desarrollándose varias técnicas de diagnóstico e identificación de especies de *Leishmania*, siendo la electroforesis de isoenzimas uno de los primeros métodos de identificación. Dicho método se desarrolló a fines de la década de 1970, seguido del establecimiento del ampliamente utilizado sistema MON zymodemo en el año 1990 (2) y se consideró como la técnica "Gold - estándar" durante un largo período. Así también fue desarrollándose por Cupolillo y colaboradores en el año 1994 otro método (IOC-Z) utilizado actualmente para identificación de especies del Nuevo Mundo, la cual, si bien sigue siendo una técnica de referencia para la tipificación de *Leishmania* permitiendo incluso la diferenciación dentro de las especies, no puede ser considerado un método sencillo y de alto rendimiento en servicios de atención clínica, ya que se basa en cultivos parasitarios. En cuanto a métodos de diagnóstico a partir de muestras biológicas a ser

sangre y tejidos, como medula ósea, linfonódulos y demás órganos, se desarrollaron métodos denominados Parasitológicos (los cuales permiten la visualización del parásito en muestras a partir de frotis sanguíneo, medular, linfonódulos, cultivo de parásitos a partir de muestras provenientes de pacientes aparentemente infectados, inoculación en animales de laboratorio, y xenodiagnostico) e Inmuno - Serológicos que consisten en métodos indirectos los cuales determinan respuestas inmunológicas anti - *Leishmania*, en pacientes que fueron expuestos a la enfermedad, siendo algunas de las más utilizadas la prueba de aglutinación directa (DAT), prueba de aglutinación rápida para tamizaje (FAST), prueba de anticuerpos fluorescentes o inmunofluorescencia indirecta (IIFA), inmunoensayo ligado a enzima (ELISA) y ELISA en punto (dot-ELISA). Si bien presentan una alta sensibilidad requieren confirmación mediante otros métodos, debido a las debido a lo a anteriormente mencionado, y con el objeto de mejorar el poder discriminatorio de los métodos convencionales de tipificación, se han desarrollado los métodos de biología molecular. El fundamento consiste en el análisis de regiones conservadas en el ADN del parásito, independiente de los cambios morfológicos del protozoo en su ciclo de vida, así como de la respuesta inmune del hospedador, permitiendo la detección de infecciones activas en pacientes oligosintomáticos o asintomáticos, lo cual representa una gran ventaja. Estas técnicas se clasifican en tres grandes grupos: Hibridación con sondas de ADN, Análisis del Polimorfismo en la longitud de los Fragmentos de Restricción (RFLP) y Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y sus variantes. Por otro lado, se encuentra en pleno auge un enfoque innovador basado en el análisis de multi locus, que permite evidenciar la variación en diferentes locus en forma directa por secuenciación del ADN en fragmentos de genes seleccionados. En la Leishmaniasis esto es de suma importancia ya que las cepas circulantes con el correr del tiempo han evidenciado una variabilidad genética interesante, lo cual se traduce en un abanico de manifestaciones sintomatológicas (2,3,4).

Tabla 1. Algunas de las técnicas serológicas mayormente utilizadas. (2, 3, 4)

Nombre de la Prueba	Sensibilidad	Especificidad
Inmunocromatografía Rápida (Rk - 39)	72 - 77 %	61 - 75 %
Inmunoensayo ligado a enzimas (ELISA)	85 - 96 %	86 - 98 %
Inmunofluorescencia indirecta (IFI)	90 - 100%	80 %

Métodos Moleculares

Hibridación con Sondas de ADN.

Consiste en la identificación de una secuencia en particular en un genoma o muestra de ácido nucleico; esto se realiza a partir una secuencia diana en uno de los fragmentos, generalmente obtenidas con enzimas de restricción de la muestra de ácido nucleico junto con un fragmento corto de ácido nucleico, llamada sonda, de secuencia conocida y complementaria a la secuencia diana, marcado de forma que permita su detección (radiactivo, coloreado, fluorescente)(2).

Para la caracterización de *Leishmania*, una de las regiones más utilizadas para la hibridación con sondas de ADN, ha sido la de los minicírculos del ADN del kinetoplasto (ADNk), ya que presentan secuencias conservadas y repetidas. Se ha podido identificar que los minicírculos del ADNk, en muchas especies de *Leishmania* poseen un 80% de regiones conservadas constituida por cuatro o menos familias de minicírculos, es decir que cada familia de minicírculo está representada por más de 1000 copias, con unos 600 pb los cuales pueden servir como secuencias consenso. Entre los aportes de esta técnica se pueden mencionar los siguientes: En la clasificación de *Leishmania*, este método ha permitido separar *L. braziliensis* de *L. mexicana*, lográndose incluir dentro del subgénero *Viannia* las especies *L. braziliensis*, *L. guyanensis* y *L. panamensis* (3).

También se ha conseguido caracterizar aislados de *Leishmania* mediante sondas de ADN genómico (ADNg), mediante la selección de clones a partir de genotecas de ADNg y ADN complementario (ADNc) con fines diagnóstico y taxonómico; concretamente la sonda pDK20 para la diferenciación entre *L. donovani* y *L. infantum*, y la sonda Lbj38 para *L. brasiliensis* en el Nuevo Mundo. (4,5).

Polimorfismo en la Longitud de los Fragmentos de Restricción (RFLP).

La secuenciación del ADN es la forma más directa y confiable de detectar polimorfismos, sin embargo debido al alto costo y disponibilidad, se suelen emplear otras alternativas, como el uso de enzimas de restricción las cuales presentan una gran especificidad de reconocimiento de una secuencia corta (4 a 6 nucleótidos) en secuencias concretas del

ADN llamado sitios de restricción. La cantidad de bandas (patrones) que pueden aparecer entre las especies e incluso dentro de la misma especie podrían indicar proximidad o lejanía filogenética entre las cepas en estudio. El fundamento de esta técnica se basa en la detección de variaciones de la secuencia de ADN (codificante o no) que tienen como consecuencia un cambio en una diana de restricción. (6)

Las dianas genéticas mayormente utilizadas para desarrollar la PCR – RFLP son: los espaciadores internos de la transcripción del RNA ribosomal (ITS: Internal transcribed spacer) (7), las secuencias de los minixones (Spliced Leader, SL) (8), los genes que codifican la glicoproteína de 63 kd (gp63) (9), así como la proteína de 70 kd (hsp70) (10). Sin embargo cada uno de los protocolos que se describen en estos trabajos fue diseñado de acuerdo a la situación específica (epidemiológica y clínica) de cada país o áreas geográficas, o solo son aplicables a ciertas especies de uno u otro subgénero.

Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y sus variantes.

Hoy en día es considerada una herramienta imprescindible en el laboratorio de biología molecular e ingeniería genética. La técnica se basa en la amplificación in vitro del ADN. Presenta un sinnúmero de ventajas, entre ellas, el que no es necesario realizar la purificación de la muestra original, se puede utilizar extractos crudos de tejido, sangre entera, productos de aspirado de médula ósea, linfonódulos, mezcla de fragmentos de ADN, etc. Sin embargo, a excepción de PCR – RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), el requisito fundamental es conocer la secuencia de la región de ADN (o ARN) de interés para amplificar.

El fundamento de la técnica tiene base en la amplificación de un fragmento de ADN hasta obtener millones de copias del mismo, utilizando una enzima polimerasa termoestable, generalmente una Taq polimerasa aislada de la bacteria termófila *Thermus aquaticus*, así como la Tth, aislada de *Thermus thermophilus*. Esta técnica está basada fundamentalmente en las propiedades de los ácidos nucleicos: desnaturalización, hibridación específica y replicación de la hebra sencilla por una ADN polimerasa (6).

La técnica PCR de por sí presenta un alto porcentaje de sensibilidad, sin embargo, en la

búsqueda de una optimización y adecuación a las necesidades del investigador, han surgido variantes de la misma, tales como: la Hot-start-PCR, (de comienzo en caliente); L- PCR (PCR larga); PCR – Nested (anidada); PCR semi-anidada; PCR múltiple; PCR hibridación; PCR-RAPD, PCR - RFLP, PCR en tiempo real; entre otras. A continuación se describirán, brevemente, sólo algunas de estas variantes, que han sido utilizados en la identificación y caracterización de aislados de *Leishmania* y los aportes de cada técnica en particular.

Han sido numerosos los cebadores complementarios que caracterizan las distintas especies de *Leishmania*, una de las secuencias más utilizadas son las regiones minisatélites del ADN, de ADN no codificantes. Se han desarrollado marcadores específicos de secuencias microsatélites; 13 fueron diseñados para *L. major*, 16 para *L. trópica* y 20 para *L. donovani*, así como, 11 marcadores de microsatélites independientes diseñados para *L. infantum*, encontrándose polimorfismo entre las especies e intraespecies de *L. infantum* MON-1 (identificación establecida por zimodemos) (11). Adicionalmente, se ha podido relacionar la variación o polimorfismo de estas secuencias con el área geográfica de procedencia y detectar infección natural en el vector (12).

La PCR múltiple también ha sido utilizada para la identificación y caracterización de diferentes especies de *Leishmania* en un solo paso, obteniéndose distintos tamaños de producto amplificado lo cual se asocia con las especies involucradas. La diana más utilizada en esta técnica es la de mini-exon, la cual es una secuencia de 25 a 39 nucleótidos añadidos post transcripcionalmente ("trans-splicing"), al extremo 5' de los ARNs mensajeros de todos los tripanosomatídeos. Los genes nucleares que portan el mini-exón están organizados en tándem de 200-250 pares de bases (pb) separados por regiones intergénicas con secuencias altamente conservadas. Con el objetivo de caracterizar las cepas de *Leishmania* en diferentes regiones de Paraguay, Chena et al (2012), utilizaron un enfoque basado en una PCR-RFLP de la región SLME (Spliced leader miniexon), a partir de aislados de humanos y caninos, lo cual, según los patrones de bandas permitió identificar a *L. braziliensis* en aislados de leishmaniosis tegumentaria y *L. chagasi* en los casos de leishmaniosis visceral.

La PCR-Nested es una técnica en la cual se

busca amplificar con cebadores específicos para las regiones intergénicas de gen de la subunidad pequeña del ARNr, en una primera PCR, luego con una segunda PCR se busca aumentar su especificidad al amplificar el producto de la primera PCR con cebadores internos de esta región. Esto se ha hecho para identificar y clasificar *L. infantum* además de permitir realizar diagnóstico precoz. (14).

En cuanto a la amplificación aleatoria de fragmentos de ADN, denominada también PCR-RAPD, es muy ventajosa ya que no requiere de conocimiento de la región que se desea amplificar, simplemente se diseñan primer cortos (10-12 pb) de manera aleatoria. Los patrones de banda obtenidos en diversos trabajos han sido muy útiles en la identificación de la variedad inter e intra especie de *Leishmania*, demostrándose este polimorfismo en *L. braziliensis*, *L. amazonensis*, *L. shawi*, *L. colombiense*, *L. donovani*, *L. infantum* *L. chagasi*. Estos estudios han sido orientados para correlacionar el polimorfismo genético con el origen geográfico y las formas clínicas de la enfermedad (15).

La variante PCR cuantitativa a tiempo real permite cuantificar de forma precisa la carga parasitaria, dando un número de parásitos por muestra, (a diferencia de la PCR clásica a tiempo final, que determina la ausencia o presencia de parásito). Entre sus aplicaciones se destaca la monitorización de la evolución de la parasitemia a lo largo del tiempo, permitiendo hacer un seguimiento de la respuesta de un animal a un tratamiento o bien la comparación de distintos tratamientos. Al presentar mayor sensibilidad, permite la utilización de muestras menos invasivas (sangre periférica), aunque se puede analizar igualmente muestras de médula ósea, así como de diversos órganos (frescas o incluidas en parafina) (16).

Análisis de Secuencias Multilocus.

Actualmente existen varios proyectos de secuenciación de todo el genoma de diferentes especies de *Leishmania*, sin embargo hasta el año 2012 solo se han secuenciado y hecho público en su totalidad los genomas de seis especies (17, 18). Por otro lado la heterogeneidad presente en otros trabajos de base molecular, dificulta muchas veces la secuenciación del genoma del parásito. Pese a lo mencionado, esto ha dado pie a otros trabajos que utilizan un enfoque previamente descrito en bacterias, denominado Tipificación multilocus de

secuencias (Multilocus sequence typing – MLST).

Las ventajas que proporciona este método son su sensibilidad, practicidad y por sobre todo la capacidad de ser reproducible, por lo tanto puede ser tomado en cuenta a la hora de estandarizar métodos para una clasificación robusta de especies de *Leishmania*, lo cual es factible en la mayoría de los laboratorios, abaratando así costos en la secuenciación del genoma así como la obtención en menor tiempo de datos confiables (19,20).

El principio del desarrollo de MLST se encuentra en algunos trabajos de genética de poblaciones que intentaron correlacionar la información generada a partir del análisis de isoenzimas con la obtenida mediante secuenciación de los genes analizados (21, 22). En ese proceso, se observó que algunas regiones específicas de los genes analizados eran responsables de la mayor parte de la variabilidad observada, mientras que el resto del locus presentaba un alto grado de conservación. Así pues, se decidió analizar en cada gen sólo un fragmento interno de entre 450-500 pb cuyo nivel de variabilidad combinado, entre los genes analizados, proporcionaba un alto grado de discriminación. Ese alto grado de discriminación permitió reducir mucho el número de loci o genes analizados. Se ha calculado que son necesarios hasta 26 cambios en la secuencia del gen para producir un cambio en la movilidad electroforética de la enzima codificada (23). Por lo tanto, la secuencia permite detectar variantes que supongan tan sólo un cambio en una base en el gen analizado. Así, se calcula que si se encuentran en torno a 30 alelos diferentes por locus, y estudiando tan sólo siete genes, se podría distinguir hasta 307 genotipos diferentes. Finalmente, siete es el número de genes en los que se basa el esquema de MLST para las diferentes especies bacterianas en las que se ha desarrollado. En cuanto a *Leishmania*, el esquema de MLST puede ser desarrollado con 6 a 7 marcadores genéticos y obtener aun así resultados robustos (19,24).

En Paraguay, el Instituto de Investigación en Ciencias de la Salud (IICS) actualmente dependiente de la Universidad Nacional de Asunción, es uno de los centros en los cuales se han ido desarrollando diversas técnicas moleculares con fines de investigación y diagnóstico, implementando técnicas basadas en la caracterización molecular y epidemiología molecular de agentes infecciosos, como: la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y sus variantes, hibridación con sondas no radiactivas, RFLP, SSCP y producción de proteínas

recombinantes. Para la detección e identificación de especies de *Leishmania* en el hombre, caninos entre otras especies, son útiles muestras de cualquier tipo de tejido, como sangre, piel, aspirados de médula ósea y linfonódulos, así también diversos órganos como bazo, hígado, riñón, etc. Entre algunos de los trabajos realizados en dicho centro se mencionan los siguientes:

- * Diagnóstico molecular y epidemiología de la Leishmaniosis. 2002-2012.
- * Caracterización molecular de las especies de *Leishmania* circulantes y su distribución geográfica en el Paraguay por la técnica de PCR-RFLP de la región SLME. 2007-2008.
- * Estrategias de control para la Leishmaniosis visceral (LV) y muco - cutánea (LMC) en Sudamérica: aplicaciones de la epidemiología molecular. 2006-2008.
- * Identificación de vectores y reservorios de Leishmaniosis naturalmente infectados en zonas endémicas del Paraguay empleando técnicas moleculares. 2009-2012 (25)

S y E: indican la sensibilidad y especificidad diagnóstica de la reacción en cadena de la polimerasa correspondiente, en aquellos casos en que se reportó. Se refieren solamente aplicaciones a la detección o identificación en muestras clínicas. (16)

CONCLUSIÓN

Teniendo en cuenta la variedad de métodos moleculares disponibles, se puede sugerir finalmente que los métodos moleculares de caracterización genética de especies de *Leishmania* con fines diagnósticos y de investigación, constituyen un compendio de herramientas de gran importancia, ya que dependiendo del objetivo trazado por el investigador o según las necesidades del clínico veterinario, estas ofrecen una amplia gama de posibilidades, adaptadas a las posibilidades económicas, lo cual muchas veces limita la elección de un método confiable y eficaz. Ya que constituyen técnicas de aplicación mundial, los datos generados en el país a partir de su utilización, enriquecerían los bancos de datos disponibles; estos datos a si también podrían ser utilizados para futuras investigaciones, y porque no en el mejoramiento de estrategias de control epidemiológico de la enfermedad. Así también la disponibilidad de los datos en formato virtual representa una información fácilmente intercambiable entre centros de investigación, así

como entre laboratorios, de modo a poder orientar al médico veterinario a la toma correcta de decisiones en cuanto al pronóstico y posible tratamiento ya que en algunos países el tratamiento de dicha enfermedad es posible (Tabla 2).

Tabla 2: Características de algunas de las dianas genéticas más utilizadas para la detección molecular o la identificación de especies del género *Leishmania*

Nombre de la diana genética	Secuencia correspondiente	Nivel taxonómico de identificación	Sensibilidad y especificidad diagnóstica	Referencias
(ITS)	Espaciadores internos de la transcripción	Género Especies	S: 79,3 % E: ND S: 91 % E: 100 % S: 40 % E: 96 % S: 80 % E: 100 %	<i>Marfurt y otros, 2003</i> <i>Bensoussan y otros, 2006</i> <i>Ovalle-Bracho y otros, 2007</i> <i>Berzunza Cruz y otros, 2009</i>
(kDNA)	ADN del kinetoplasto	Género Subgénero <i>Leishmania</i> (V.) Especies	S:90,1 % S:86,4 % E: 100 % S: 98 % E: 57 % S: 97,1 % E: ND S: 68,6 % E: 92 % S: 94,2 % E: 92,9 % S: 94 % E: 88 % S:96,6 % E: 66,7 % S: 83,3 % E: ND	<i>Marques y otros, 2001</i> <i>Disch y otros, 2005</i> <i>Bensoussan y otros, 2006</i> <i>Al-Hucheimi y otros, 2009</i> <i>Ovalle-Bracho y otros, 2007</i> <i>Boggild y otros, 2010</i> <i>Espinosa y otros, 2009</i> <i>Kumar y otros, 2007⁷⁹</i> <i>Gadisa y otros, 2007⁸⁰</i>
Ssu-rRNA (18S)	Subunidad pequeña del ARN ribosomal	Género Especies	S:92 % E: 99,6 % S: 93,2 % E: 95,6 % S: 90,9 % E: ND S: 99,3 % E: ND S: 83 % E: 90,5 % S: 84,6 % E: 100 %	<i>Deborggraeve y otros, 2008; 2008</i> <i>Amato y otros, 2009</i> <i>Chargui y otros, 2005</i> <i>Vaish y otros, 2011</i> <i>Lemrani y otros, 2009</i>
(gp63)	Gen que codifica la glicoproteína de 63 kDa	Especies	S: 85 %	<i>Victoir y otros, 2003</i>
(cpb)	Gen que codifica la cisteíno proteinasa B	Especies Cepas	ND ND ND ND	<i>Quispe y otros, 2004</i> <i>Gadisa y otros, 2010</i> <i>Kuru y otros, 2011</i> <i>Oshagi y otros, 2009</i>
mini-exon	Genes que codifican los minielexones o <i>spliced leader</i> (SL)	Especies	S: 89,7 % E: ND	<i>Marfurt y otros, 2003</i>
<i>hsp70</i>	Genes que codifican la proteína de 7 kDa	Especies	S: 95 % E: 100 %	<i>García y otros, 2007</i>

BIBLIOGRAFÍAS

- Gonzalez E, Mallorquin M. Rol de los animales domésticos en la transmisión de la leishmaniasis. *Ciencia y Tecnología (Asu)*. 2000; (2): 113-116.
- Akhoundi M, Downing T, Votýpka T, Kuhls K, Cannet J, Ravel C, Marty P, Delaunay P, Kasbari M, Granouillac B, Gradoni L, Sereno D. Leishmania infections: Molecular targets and diagnosis. *Mol. Aspects Med*. 2017; 57: 1-29.
- Chena L, Nara E, Canese A, Oddone R, Russomando G. Aplicación de la PCR para la detección de género y complejos de *Leishmania* en diferentes tipos de muestras biológicas. *Mem. Inst. Investig. Cienc. Salud (San Lorenzo)*. 2013; 11(1): 45-51.
- Otranto D, Paradies P, Sasanelli M, Spinelli M, Brandonisio O, Rapid J. Immunochromatographic test for serodiagnosis of canine leishmaniasis. *Clin. Microbiol*. 2004; 42: 6 2769-2770.
- Mettler M, Grimm F, Capelli G, Camp H, Deplazes P. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assays, an immunofluorescent-antibody test, and two rapid tests (Immunochromatographic-Dipstick and Gel Tests) for serological diagnosis of symptomatic and asymptomatic leishmania infections in dogs. *J. Clin. Microbiol*. 2005; 43(11): 5515-5519.
- Luque J, Herráez A. Clonación celular: reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en texto ilustrado de biología molecular e ingeniería genética.. Madrid, España: Harcourt; 2005. 469 p.
- Morales MA. Epidemiología molecular de la coinfección con leishmania y HIV (en línea). (Tesis Doctoral). Madrid, España: Universidad Complutense. 2002; p115. Disponible: www.ucm.es/BUCM/tesis/bio/ucm-t26238.
- Chaara D, Ravel C, Bañuls AL, Haouas N, Lami P, Talignani L, El Baidouri F, Jaouadi K, Harrat Z, Dedet JP, Babba H, Pratlong F. Evolutionary history of *Leishmania killicki* (synonymous *Leishmaniatropica*) and taxonomic implications. *Parasites & Vectors*, 1998.
- Mkada-Driss I, Lahmadi R, Chakroun A S, Talbi C, Guerbouj S, Driss M, Elamine E, Cupolillo E, Mukhtar M, Guizani I. Screening and characterization of RAPD Markers in Viscerotropic *Leishmania* Parasites. *PLoS ONE*. 2014; 9(10).
- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Biología molecular de la célula*. 5a ed. Barcelona: Omega; 2010. p.501-578.
- Berzunza-Cruz M, Rodríguez-Moreno Á, Gutiérrez-Granados G, González-Salazar C, Stephens C R, Hidalgo-Mihart M, Marina C, Rebollar-Tellez E, Bailon-Martinez D, Domingo C, Ibarra-Cerdeña C, Sanchez-Cordero V, Becker I. *Leishmania (L.) mexicana* Infected Bats in Mexico: Novel Potential Reservoirs. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 9 (1): e0003438.
- Marfurt J, Nasereddin A, Niederwieser I, Jaffe C L, Beck H-P, Felger I. Identification and differentiation of *Leishmania* species in clinical samples by PCR amplification of the Miniexon sequence and subsequent restriction fragment length polymorphism analysis. *J. Clin. Microbiol (Boston)*. 2003.; 41(7): 3147-3153.
- Gomes C M, Mazin S C, Dos Santos E R, Cesetti M V, Bächtold G A B, Cordeiro J H De F, Sampaio R N R. Accuracy of mucocutaneous leishmaniasis diagnosis using polymerase chain reaction: systematic literature review and meta-analysis. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz (Rio de Janeiro)*. 2015; 110(2): 157-165.
- García L, Kindt A, Bermudez H, Llanos-Cuentas A, De Doncker S, Arevalo J, Quispe K, Dujardin J-C. Culture – Independent Species Typing of Neotropical *Leishmania* for Clinical Validation of a PCR-Based Assay Targeting Heat Shock Protein 70 Genes. *J. Clin. Microbiol (Boston)*. 2004; 42(5): 2294-2297.
- Ochsenreither S, Kuhls K, Schaar M, Presber W, Schönian G. Multilocus microsatellite typing as a new tool for discrimination of *Leishmania infantum* MON-1 strains. *J Clin Microbiol (Boston)*. 2006; 44: 495-503.
- Aransay A, Scoulica E, Tselentis Y. Detection and identification of *Leishmania* DNA within naturally infected sand flies by semi-nested PCR on Minicircle Kinetoplastic DNA. *App Envirom Microbiol (Maryland)*. 2000; 66: 1933-1938.
- Chena L, Nara E, Canese A, Oddone R, Morán M, Russomando G. 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 (en línea). *Mem. Inst. Investig. Cienc. Salud. (San Lorenzo)*; 10 (1): 14-23. [acceso 11 de agosto de 2015]. Disponible en: http://scielo.iics.una.py/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S181295282012000100003&lng=en&tlng=es.

18. Cruz I, Cañavate C, Rubio J, Morales M, Chicharro C, Laguna F, et al. A nested polymerase chain reaction (LNPCR) for diagnosis and monitoring *Leishmania infantum* infection in patients co-infected with human immunodeficiency virus. *Trans R Soc Trop Med Hyg*; 2002; 96:185-186.
19. Schriefer A, Schriefer A L F, Góes-Neto A, Guimarães LH, Carvalho LP, Almeida R P, Carvalho E M. Multiclonal *Leishmania braziliensis* Population Structure and Its Clinical Implication in a Region of Endemicity for American Tegumentary Leishmaniasis. *Infection and Immunity*; 72(1): 508–514.
20. Montalvo A. Tipificación de especies de *Leishmania* de importancia médica basada en el gen que codifica la proteína HSP70 citoplasmática. Asunción: Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kourt”, Departamento de Parasitología; 2011. p. 22
21. Ivens A, Peacock C, Worthey E, Murphy L, Aggarwal G, et al. The genome of the kinetoplastid parasite, *Leishmania major*. *Science*; 309: 436–442.
22. Raymond F, Boisvert S, Roy G, Rittjé, Legare D, et al. Genome sequencing of the lizard parasite *Leishmania tarentolae* reveals loss of genes associated to the intracellular stage of human pathogenic species. *Nucleic Acids Res*; 403: 1131–1147.
23. 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; 611:e1888.
24. El Baidouri F, Diancourt L, Berry V, Chevenet F, Pratlong F, Marty P, Ravel C. Genetic structure and evolution of the *Leishmania* genus in Africa and Eurasia: What Does MLSA Tell Us. *PLoS Negl Trop Dis*. Res 2013; 7(6): e2255.
25. Smith N, Holmes E, Donovan G, Carpenter G, Spratt B. Networks and groups within the genus *Neisseria*: analysis of *arg F*, *recA*, *rho*, and 16S rRNA sequences from human *Neisseria* species. *Mol Biol Evol*. 1999; 16: 773-83.