

Identificación de *Leishmania (Viannia) guyanensis* en caninos, en zona rural del municipio de Villavicencio, Meta, Colombia

Identification of *Leishmania (Viannia) guyanensis* in dogs in rural area municipality of Villavicencio, Meta, Colombia

Vásquez-Trujillo A¹, González A.E², Góngora A², Cabrera O³,
Santamaría E³, Buitrago L.S¹.

¹ Unidad de Entomología, Laboratorio de Salud Pública, Secretaría Seccional de Salud del Meta

² Grupo de Investigación GIRGA, Laboratorio de Reproducción animal, Universidad de los Llanos

³ Laboratorio de Entomología, Instituto Nacional de Salud

Recibido: Enero 10 de 2008. Aceptado: Noviembre 28 de 2008

RESUMEN

La leishmaniasis cutánea canina es una enfermedad emergente en Colombia. Aunque ha sido posible establecer que el canino pueden ser parasitado por especies de *Leishmania (Viannia)* de alta importancia epidemiológica como *L. panamensis* y *L. braziliensis*, aún no se ha determinado su papel en la transmisión de la Leishmaniasis cutánea americana (LCA). Se tomaron muestras para estudios moleculares en la vereda *La Reforma* del Municipio de Villavicencio, en donde se habían encontrado 6 caninos y un humano con lesiones compatibles con Leishmaniasis cutánea. Las muestras de tejido fueron recolectadas y procesadas para la identificación del parásito a través de la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Se utilizaron los iniciadores OL1 y OL2 para la identificación del parásito, los iniciadores B1 y B2 para determinar el Sub-género y los iniciadores especie-específicos b1-b2, g1-g2, y p1-p2 para la especie. Se encontró en el humano y un canino un patrón de amplificación de ADN compatible con el reportado para *Leishmania (Viannia) guyanensis*. En conclusión, la identificación de esta especie de *Leishmania* fue posible mediante PCR, lo cual valida su uso en estudios futuros y además sugiere la existencia de un nuevo nicho ecológico para el parásito lo que representa un importante factor de riesgo para la presentación de un brote epidémico en la población.

Palabras clave: Leishmaniasis cutánea, caninos, Villavicencio

SUMMARY

The canine cutaneous leishmaniasis is an emerging disease in our country. Although it has been possible to establish that the canines can be parasitized by species of *Leishmania* (*Viannia*) high epidemiological importance such as the *L. panamensis* and *L. braziliensis*. not yet determined its role in the transmission of American cutaneous leishmaniasis (ACL). The taking of samples for molecular study was conducted at the village La Reforma of municipal of Villavicencio, where identified a 6 canines and one humans with lesions consistent with cutaneous leishmaniasis. The tissue samples were collected and processed for identification of the parasite through the PCR technique. We used the primers OL1 and OL2 for identification of parasites of the genus *Leishmania*, the B1 and B2 primers to determine the sub-genus and species-specific primers b1-b2, g1-g2, and p1-p2 to determine the species. Achieved the identification of a canine and a human whose samples showed a pattern of amplification of DNA compatible with the reported for *Leishmania* (*Viannia*) *guyanensis*. In conclusion, the technique of PCR is a feasible diagnostic technique for the diagnosis of leishmaniasis and the identification of species parasite in each case. The identification of a *Leishmania* species from sylvan distribution in rural area of Villavicencio implies the existence of a new ecological niche for the parasite that represents an important risk factor for the generation of an epidemical outbreak in the population.

Key words: cutaneous leishmaniasis, canine, Villavicencio.

INTRODUCCIÓN

El género *Leishmania* se encuentra actualmente presente en 22 países del nuevo mundo, y cerca de 20 especies parasitan a los humanos (Desjeux, 2001). En Colombia este parásito es transmitido por insectos hematófagos del género *Lutzomyia* (*Diptera: Phlebotomidae*) (Ferro y Morales, 1998), y las especies *Lutzomyia gomezi*, *L. Panamensis* y *L. Longiflocosa* han sido identificadas como los principales vectores para la propagación de la *Leishmania* (Santamaría et al, 2006). Históricamente, los caninos han sido considerados el principal reservorio doméstico y urbano para la Leishmaniasis Visceral Zoonótica (LVZ) (Ashford, 2000; Travi et al, 2001) y, en varios países de Latinoamérica (Reithinger y Davies, 1999), incluida Colombia (Muñoz, 2005), también se ha documentado su papel como reservorio-hospedero para la Leishmaniasis Cutánea Americana (LCA). La leishmaniasis cutánea canina (LCC) es una enfermedad de reciente registro en nuestro país, y las principales especies de *Leishmania* comprometidas en la patología cutánea en perros son la *L. (V.) panamensis* identificada en el municipio de Landazuri (Santander) (Muñoz, 2005) y la *L. (V.) braziliensis* identificada en el municipio de Tumaco (Nariño) (Travi et al, 2006).

En Latinoamérica, los caninos son un importante reservorio-hospedero para *L. infantum* y hacen parte

del ciclo de transmisión de la LVZ en zonas urbanas y rurales (Travi, 2000; Gallego et al, 2001; Dantas-Torres, 2007) y aunque en el país también han sido identificados como un reservorio efectivo para *L. (V.) panamensis*, aún no se ha determinado el papel que cumplen en la transmisión de la LCA (Reithinger y Davie, 1999; Reithinger y Davie, 2002). Por otro lado, algunos autores han indicado que la capacidad de los caninos como reservorio-hospedero podría ser muy limitada debido a las bajas cargas parasitarias y a la incapacidad para infectar al vector (Travi et al, 2006). Los estudios destinados al control de la LVZ, han utilizado pruebas serológicas, principalmente inmunofluorescencia indirecta (IFI), para el diagnóstico de la enfermedad (Sundar y Rai, 2002; Ribeiro et al, 2007). Para los estudios de la LCA, se han utilizado en su mayoría técnicas de biología molecular basadas en PCR y con fines principalmente investigativos (Gomes et al, 2007, Maia et al, 2007; Castro et al, 2007). El diagnóstico de la LCA en humanos se realiza rutinariamente por examen directo o por examen parasitológico de las lesiones ulcerosas, tras lo cual se determina la pertinencia de implementar un plan terapéutico; sin embargo, la eficiencia de esta metodología de diagnóstico se ve comprometida por diferentes factores entre los que se cuentan la habilidad o experticia de la persona que toma y

examina la muestra, el grado de contaminación bacteriana de la ulcera y la carga parasitaria al momento del examen, entre otras (Pirmez et al, 1999; Garcia et al, 2007). Por lo anterior, la utilización de pruebas altamente específicas y sensibles como el PCR, han tomado la delantera en el diagnóstico,

investigación clínica y epidemiológica de la enfermedad (Murray et al, 2005; Reithinger et al, 2007). El presente trabajo demuestra la utilidad de la técnica de la PCR convencional para el diagnóstico de la LCA en humanos y caninos en muestras directas, así como para la identificación de las especies de *Leishmania* presente en una región.

MATERIALES Y MÉTODOS

La toma de las muestras de tejido se realizó en caninos y humanos habitantes de la vereda La Reforma, Municipio de Villavicencio, Meta (Colombia); ubicada a los 04° 4'57" LN, 73° 28' 23" LO, (altitud de 350 m snm, T 25° C, HR 85% y precipitación media anual de 2 800 mm de agua). La región esta clasificada como bosque pluvial tropical según las zonas de vida de Holdridge (Espinal, 1978).

Toma de muestra en caninos

Se identificaron seis (6) caninos con lesiones compatibles con leishmaniasis cutánea, presentando principalmente lesiones a nivel del escroto, orejas y nariz, todos los caninos fueron positivos al examen directo (Figura 1), y se escogió un canino para la identificación molecular de la especie de *Leishmania*. Con el uso de una lanceta, se realizó el raspado de una lesión ubicada en la región escrotal, la muestra fue depositada en un tubo de vidrio con EDTA y se mantuvo refrigerada (2 - 4 °C) por un tiempo inferior a 12 horas hasta su procesamiento para la obtención de ADN.

Toma de muestra en humanos

Durante la búsqueda de casos en caninos, se identificó una persona con lesiones a nivel de la rodilla y pantorrilla derecha, con 8 meses de evolución y que sugerían la presencia de *Leishmania*. Las lesiones presentaban el típico engrosamiento de los bordes, secreción purulenta y muy dolorosa al tacto. Las lesiones fueron negativas al examen directo. Para la confirmación de infección e identificación del parásito se tomo una muestra de la lesión, desarrollándose el mismo procedimiento descrito para la toma de la muestra en los caninos.

Extracción de ADN

La extracción del ADN de las muestras se realizó mediante la técnica de fenol/cloroformo, siguiendo los procedimientos del Laboratorio de Citogenética de la Universidad Nacional, y basado en la técnica descrita por Manna *et al*, 2004.

Detección de infección natural con *Leishmania* por PCR.

La técnica de la PCR se desarrolló siguiendo los protocolos descritos por Romero et al, (2001). La selección de los iniciadores se realizó teniendo en cuenta la distribución geográfica de las diferentes especies de *Leishmania* en Colombia (Saravia et al, 2002). Para determinar la presencia del parásito en las muestras de tejido, se emplearon los iniciadores específicos para el género *Leishmania* OL1-OL2 (Romero et al, 2001) que produce una banda de 120 pb. Las muestras positivas para *Leishmania*, se sometieron a una segunda PCR con los iniciadores B1-B2, específicos para especies de *Leishmania* del subgénero *Viannia* (De Bruijn y Barrer, 1992), los cuales generan un fragmento amplificado de ADN de 750 pb, las muestras positivas con los iniciadores anteriores, se sometieron a una tercera PCR utilizando los iniciadores para *Leishmania (V) panamensis*, p1-p2; para *Leishmania (V) braziliensis* b1-b2 y para *Leishmania (V) guyanensis* g1-g2, reportados por Matsumoto *et al* (1999) y Mimori *et al* (2002), cuyos productos de amplificación son de 79, 110 y 65 pb respectivamente. Como control positivo y de especificidad se utilizaron las cepas de referencia del Laboratorio de Parasitología del Instituto Nacional de Salud de Colombia: *Leishmania (Viannia) panamensis* (MHOM/CO/87/CL-412), *L. (V) braziliensis* (MHOM/

CO/86/CL-250), *L (V) guyanensis* (MHOM/CO/85/CL-220). *L (L) mexicana amazonensis* (MHOM/ME/94/CL-856), como control de especificidad para *Leishmania* se utilizó una cepa de *Trypanosoma cruzi* (MHOM/CO/92/Fch).

Una fracción de cada uno de los productos de PCR se mezcló con buffer de carga (azul de bromofenol al 0,1%)

y se sometieron a electroforesis horizontal en gel de agarosa al 2% (3:1 NuSieve-SeaKem; FMC Corp., Rockland, Maine) adicionado con bromuro de etidio (1 µl de bromuro de etidio al 1% por cada 10 ml de gel). Se usó TBE 1X (89 mM Tris HCL, 90mM de ácido bórico y 20 mM de EDTA a un pH = 8.3) como Buffer de corrido. Los productos se visualizaron en un transiluminador de luz ultravioleta.

Tabla 1. Secuencias utilizadas para la identificación de la especie de *Leishmania (Viannia) guyanensis*.

Orden Taxonómico	Iniciadores	Secuencias	Referencias
Género (<i>Leishmania</i>)	OL1 * OL2 **	GGG GAG GGG CGT TCT GCG AA CCG CCC CTA TTT TA C ACC AAC CCC	Romero et al, 2001
Subgénero (<i>Viannia</i>)	B1 * B2 **	GGG GTT GGT GTA ATA TAG TGG CTA ATT GTG CAC GGG GAG G	De Brujin y Barrer, 1992
Especie			
<i>L. (V). panamensis</i>	p1 * p2 **	GGT CGG ATC TGC ATG ACT CAC CAA AAA GCG AGG GAC TGC GGG	Matsumoto et al (1999)
<i>L. (V). guyanensis</i>	g1 * g2 **	GGT CGG ATC TGC ATG CAT CAT CAA AAA GCG AGG GAC TGC GGG	Mimori et al (2002)
<i>L. (V). braziliensis</i>	b1 * b2 **	GTG GGC GTA TCT GCT GAT GAC CAA AAA GCG AGG GAC TGC GGA	

*(forward). **(reverse).

RESULTADOS

En cuatro viviendas de la vereda La Reforma, se identificaron 6 caninos con lesiones compatibles con leishmaniasis cutánea, los cuales presentaban lesiones a nivel del escroto (4/6), orejas (2/6) y nariz (1/6) de acuerdo a las proporciones, adicionalmente uno (1/6) presentaba lesiones satélites; con duración histórica superior a un año. Todos los caninos, presentaban un rango de edad de 2 – 8 años y eran destinados a vigilancia de los predios. El plan sanitario registrado para estos animales incluía la vacunación contra el virus rábico y la desparasitación con ivermectina. Todos los caninos fueron positivos al examen directo.

Diagnóstico por PCR de leishmaniasis cutánea en canino y en humano

Se escogió un canino para la identificación molecular de la especie de *Leishmania*, confirmándose la

presencia de parásitos del género *Leishmania* en el canino y en la persona identificada durante el muestreo. En los dos casos fue posible observar la banda diagnóstica de 120 pb, producto de la amplificación con los iniciadores OL1 y OL2.

Clasificación del parásito a nivel de subgénero y especie

Las dos muestras positivas para *Leishmania* sp., fueron sometidas a otro proceso de PCR en la que se utilizaron los iniciadores específicos B1 y B2, para el subgénero *Viannia* y se observó un fragmento amplificado de 750 pb para cada una de las muestras (Figura 2 - A). Estas muestras se sometieron a una tercera amplificación con los iniciadores especie-específico y se observó un fragmento amplificado de ≈ 65 pb, el cual es positivo para la especie *L. guyanensis* (Figura 2 - B).

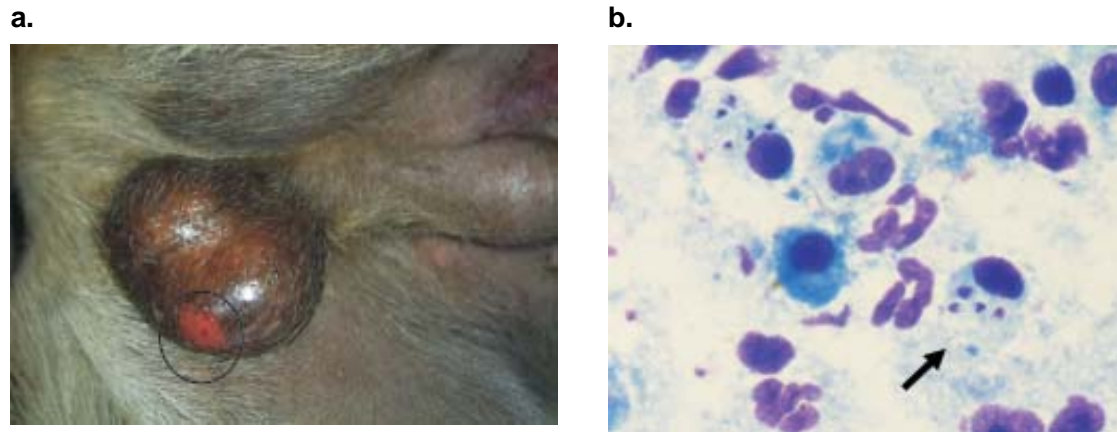


Figura 1. Canino criollo de la vereda La Reforma con ulcera en el escroto (a), Diagnosticado por examen directo (b), flecha indica amastigotes

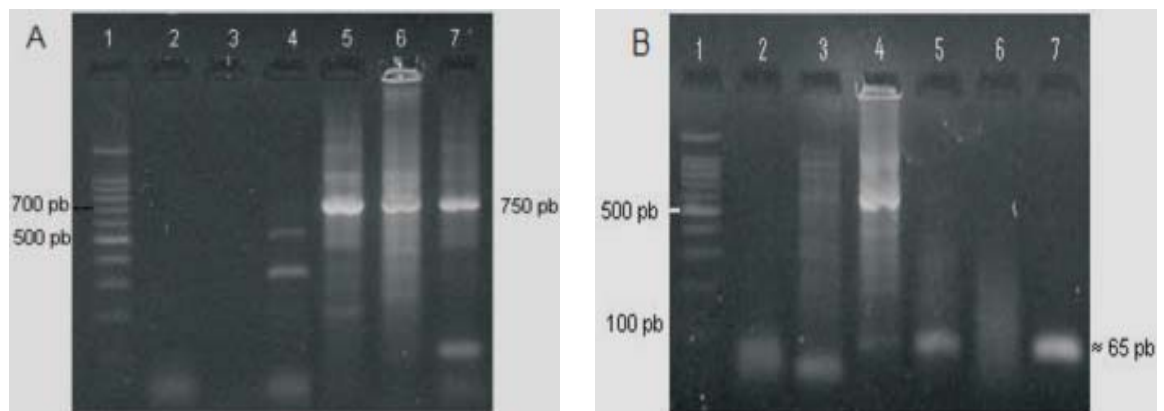


Foto A: Carril: 1 MPM 2 control negativo frotis piel sana canino. 3 control de la reacción. 4 *Tripanosoma cruzi*. 5 muestra frotis canino, 6 muestra de lesión cutánea de paciente 7 control positivo cultivo *Leishmania (Viannia) braziliensis*. Foto B: Carril: 1: MPM. 2: control negativo frotis piel sana canino. 3: control *Tripanosoma cruzi*. 4: muestra positiva de frotis de canino, banda 65 pb. 5: muestra de paciente positivo banda H⁺ 65 pb. 6: cultivo *Leishmania (viannia) panamensis*. 7: control positivo *Leishmania (viannia) guyanensis* banda de 65 pb.

Figura 2. Amplificación positiva para subgénero *Viannia* (A), y para *L (V) guyanensis* (B), expresando una banda diagnóstica de 750 y \approx 65 pb respectivamente en muestra de canino y paciente proveniente de la vereda La Reforma

DISCUSIÓN

En este trabajo se utilizó la PCR con el objetivo de diagnosticar LCA a partir de muestras directas de lesiones cutáneas e identificar la especie de *Leishmania* causante de la patología. El examen directo de individuos con lesiones cutáneas, como prueba preconfirmatoria para la enfermedad, permitió identificar 6 caninos positivos a LCC y una persona aparentemente negativa a LCA. Cabe resaltar que los métodos tradicionales de diagnóstico de Leishmaniasis requieren de un número alto de parásitos morfológicamente intactos para obtener un diagnóstico

definitivo (Pirmez et al, 1999) y que la presencia de contaminación bacteriana de las úlceras ó la baja sensibilidad de la técnica (26-38%) pueden dificultar el dictamen (García et al, 2007). Por el contrario, las dos muestras procesadas por PCR resultaron positivas, confirmando la presencia de parásitos del género *Leishmania* en el canino y el caso humano, con los iniciadores OL1-OL2, para género. Así mismo, cabe destacar que el diagnóstico de leishmaniasis cutánea por la técnica de PCR ha sido reconocido por su alta sensibilidad (95-100%) y especificidad

(100%) (Romero et al, 2001; García et al, 2007, Moreira et al, 2007), y por que puede ser utilizada como examen diagnóstico de rutina para la patología cutánea (Maia et al, 2007; Moreira et al, 2007) en zonas de alta incidencia de la enfermedad; planteando la posibilidad de futuros estudios con la utilización del diagnóstico y tratamiento oportuno como medida de control.

Los iniciadores B1-B2 se han utilizado con éxito en investigaciones (Santamaría et al, 2006). En este estudio, al utilizar el juego de iniciadores B1-B2 en las PCR realizadas a las muestras de canino y humano, se obtuvo la amplificación de fragmentos de un tamaño de 750 pb, similar a las reportadas por De Brujin y Barker (1992) para *Leishmania* del subgénero *Viannia*. Vergel y col (2005), han indicado que los iniciadores B1-B2, específicamente el B2, tiene la capacidad de amplificar una región del cromosoma dos humano (NCBI Acceso No. AC010878) de 718 pb, por lo cual existe la posibilidad de generar falsos positivos. Si bien, para este trabajo existía esta posibilidad, el fragmento amplificado coincidió en tamaño con los 750 pb del control positivo del subgénero *Viannia* (Cultivo de *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis*), adicionalmente se realizó una tercera reacción específica para *L. (V.) guyanensis* la cual dió positiva y confirmó el hallazgo. En el presente trabajo los iniciadores g1-g2 especie-específicos usados para la reacción de PCR en las muestras de canino y humano permitieron obtener un fragmento de ADN amplificado de una longitud de \approx 65 pb (Figura 2 - B), lo cual coincide con lo reportado para *Leishmania* (*V.*) *guyanensis* (Mimori et al, 2002; Matsumoto et al, 1999). Lo anterior pone de manifiesto la presencia en la zona rural de Villavicencio de individuos infectados por una especie de *Leishmania* cuyos patrones de amplificación de ADN concuerdan con el subgénero *Viannia*. Por otro lado, los iniciadores g1 y g2 demostraron la capacidad de amplificar específicamente secuencias de *Leishmania* (*V.*) *guyanensis* y no de *Leishmania* (*Viannia*) *panamensis* (Figura 2 - B). En el presente estudio, los hallazgos permiten concluir que con una gran probabilidad *Leishmania guyanensis*, es la especie parasitante en el humano y el canino evaluados por PCR.

La obtención de resultados positivos con la técnica de PCR, tiene la ventaja adicional de necesitar poco volumen de muestra para el diagnóstico, de forma similar a lo que sucede con otras metodologías utilizadas en investigaciones clínicas como son la toma de pequeñas biopsias (2mm de piel) (De Brujin y Barker, 1992), exudados de lesiones tomados con algodón (Mimori et al, 2002) y raspados de lesiones (Matsumoto et al, 1999).

El desarrollo de los signos clínicos de una infección generalizada depende directamente de la respuesta inmune (Awasthi et al, 2004; Xavier et al, 2005) a la especie de *Leishmania* infectante (Subgénero *Leishmania* ó *Viannia*) (Chamizo et al, 2005, Walker et al, 2006, Bourreau et al, 2007). En el presente trabajo, los caninos muestreados no presentaron estado de caquexia o mal nutrición. Al examen clínico, ninguno de los perros infectados presentó signos clínicos compatibles con una infección generalizada, tales como hepatomegalia, esplenomegalia o adenitis, particular de la leishmaniasis visceral (Gállego, 2004), por el contrario, las lesiones se caracterizaron por ser localizadas y, en algunos casos, aparentemente metastásicas y clínicamente concordantes con lo descrito por Castro y col. (2007), quienes encontraron caninos parasitados por *Leishmanias* (*Viannia*) *braziliensis* sin síntomas generales visibles, que mostraron resultados positivos para los aislamiento por cultivo y PCR únicamente en las biopsias de lesiones de piel, sin resultar parasitado ningún otro órgano interno (ganglios, hígado y bazo). La identificación de *Leishmania Viannia guyanensis*, caracterizada inmunológicamente por producir una mayor respuesta en las células Th2 (IL4, IL5, IL10 e IL13), logra desarrollar un efecto supresor en las células Th1 y evita al mismo tiempo la expresión de IL2 y FNT- α en dichas células; causando de esta manera: 1) supervivencia del parásito, 2) crecimiento de la lesión, y 3) metástasis cercanas a la lesión y probablemente el desarrollo de lesiones mucocutáneas futuras (Bourreau et al, 2003; Pascalis et al, 2003), hallazgos que pueden ser asimilables y comparables con algunos signos descritos en los resultados para ambos casos, humano y canino.

En Colombia se han realizados algunos trabajos orientados a establecer el posible papel de los caninos en la transmisión de la LCA (Muñoz, 2005), en un estudio realizado sobre un foco de *Leishmania panamensis* en Landazuri (Santander) se concluyó que los caninos actuaban como verdadero hospedador-reservorio de la enfermedad. Travi y col (2006), aunque demostraron la infección natural de dos caninos con *Leishmania braziliensis*, no lograron obtener resultados positivos por medio de xenodiagnóstico con las especies *Lutzomyia trapidoi*, *L. gomezi* y *L. youngi*, debido posiblemente a la poca presencia de parásitos en la lesión y por el bajo número de insectos empleados en cada ensayo, no logrando definir un papel epidemiológico importante del canino en el ciclo de la enfermedad. Así mismo, en otros estudios realizados en Brasil, en caninos infectados con especies pertenecientes al Subgénero *Viannia*, tampoco se pudo establecer el papel de los caninos en la transmisión de LCA (García et al, 2007; Dantas-Torre, 2007). Otras investigaciones han permitido demostrar que la presencia de un familiar con historia de LCA es un factor de riesgo mayor que la presencia de un canino infectado en el entorno (Ampuero et al, 2005).

REFERENCIAS

Ampuero J, Urdaneta M, Macêdo VO. 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. Saude Publica*. 2005;21:161–170.

Ashford RW. The leishmaniasis as emerging and re-emerging zoonoses. *Int J Parasitol* 2000;30:1269-81.

Awasthi A, Mathur RK, Saha B. Immune response to *Leishmania* infection. *Review Article*. *Indian J Med Res*. 2004;119:238-258

Bourreau E, Gardon J, Pradinaud R, Pascalis H, Prévot-Linguet G, Karimnia A, Pascal L. Th2 Responses Predominate during the Early Phases of Infection in Patients with Localized Cutaneous Leishmaniasis and

En conclusión, 1) este reporte confirma la utilidad de la PCR como método diagnóstico (Romero et al, 2001; 1992; Mimori et al, 2002; Matsumoto et al, 1999) o epidemiológico investigativo (Reithinger y Davies, 2002; García et al, 2007), al ser una herramienta altamente sensible y específica. 2) El hallazgo de infección en un humano y un canino con *Leishmania viannia guyanensis* no es concluyente para catalogar al perro como un verdadero hospedador-reservorio (Reithinger y Davies, 1999; Reithinger y Davies, 2002), pero pone de manifiesto la presencia de una especie de *Leishmania* de distribución principalmente selvática (Saravia et al, 2002) en una zona rural muy intervenida, y el riesgo de producción de un brote en una zona donde nunca se habían presentado casos. 3) El control de la leishmaniasis cutánea debe realizarse en forma preventiva, utilizando campañas educativas que promuevan el uso de ropa adecuada para zonas endémicas, repelentes y toldillos. 4) Existe la necesidad de implementar una metodología de diagnóstico rápido y eficiente, que permita la identificación oportuna de los focos activos y/o la asignación de un plan terapéutico adecuado (Sierra et al, 2001).

Precede the Development of Th1 Responses. *Infection and Immunity*. 2003;71(4):2244–2246.

Castro EA, Thomaz-Soccol V, Augur C, Luz E. *Leishmania (Viannia) braziliensis*: Epidemiology of canine cutaneous leishmaniasis in the State of Paraná (Brazil). *Experimental Parasitology*. 2007;117:13–21.

Castro EA, Thomaz-Soccol V, Augur C, Luz Z. *Leishmania (Viannia) braziliensis*: Epidemiology of canine cutaneous leishmaniasis in the State of Paraná (Brazil). *Experimental Parasitology*. 2007;117:13–21.

Dantas-Torres F. The role of dogs as reservoirs of *Leishmania* parasites, with emphasis on *Leishmania (Leishmania) infantum* and *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Veterinary Parasitology*. 2007;149:139–146.

- De Bruijn MHL, Barker DC. Diagnosis of new World Leishmaniasis : specific detection of species of the *Leishmania braziliensis* complex by amplification of Kinetoplast DNA. *Acta Trop.* 1992;52:45-58.
- De Bruijn MHL, Barker DC. Diagnosis of new World Leishmaniasis : specific detection of species of the *Leishmania braziliensis* complex by amplification of Kinetoplast DNA. *Acta Tropica* 1992;52:45-58.
- Desjeux P. The increase risk factors for leishmaniasis worldwide. *Trans. roy. Soc. trop. Med. Hyg.* 2001;95:239-243.
- Espinal S. Zonas de vida o formaciones vegetales de Colombia. Memoria explicativa sobre el mapa ecológico. Bogotá: Instituto Geográfico "Agustín Codazzi" (IGAC); 1978. p.1-238.
- Ferro C, Morales A. Flebótomos de Colombia: Estudios realizados por el laboratorio de Entomología 1965-1997. En: Toro G, Hernández CA, Raad J, editores. Instituto Nacional de Salud 1917-1997 Una historia, un compromiso. 1998. pp 219-233.
- Gallego M, Pratloug F, Fisa R, Riera C, Rioux A, Dedet P, Portús M. The life-cycle of *Leishmania infantum* MON-77 in the Priorat (Catalonia, Spain) involves humans, dogs and sandflies; also literature review of distribution and hosts of *L. infantum zymodemes* in the Old World. *Am J Trop Med Hyg.* 2001;95:269-27.
- Gállego M. Zoonosis emergentes por patógenos parásitos: las leishmaniasis. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, 2004;23(2):661-676.
- García AL, Parrado R, De Doncker S, Bermudez H, Dujardin JC. American tegumentary leishmaniasis: direct species identification of *Leishmania* in non-invasive clinical samples. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2007;101(4):368-71.
- Gomes A, Ferreira I, Lima M, Cunha E, Garcia AS, Araújo M, Pereira-Chiocola V. PCR identification of *Leishmania* in diagnosis and control of canine leishmaniasis *Veterinary Parasitology.* 2007;144:234–241.
- Laskay T, Mikó TL, Negesse Y, Solbach W, Röllinghoff M, Frommel D. Detection of cutaneous *Leishmania* infection in paraffin-embedded skin biopsies using the polymerase chain reaction. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1995;89:273-5.
- Maia C, Ramada J, Cristóvão JM, Gonçalves L, Campino L. Diagnosis of canine leishmaniasis: Conventional and molecular techniques using different tissues. Short Communication. *The Veterinary Journal* (2007), doi:10.1016/j.tvjl.2007.08.009. Article in press.
- Manna L, Vitale F, Reale S, Caracappa S, Pavone LM, Morte RD, Cringoli G, Staiano N, Gravino AE. Comparison of different tissue sampling for PCR-based diagnosis and follow-up of canine visceral leishmaniasis. *Vet Parasitol.* 2004;125:251-62.
- Matsumoto T, Hashiguchi Y, Gomez EA, Calvopiña MH, Nonaka S, Saya H et al. Comparison of PCR results using scrape/exudate, syringe-sucked fluid and biopsy samples for diagnosis of cutaneous leishmaniasis in Ecuador. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1999;93:606-607.
- Mimori T, Matsumoto T, Calvopiña M.H, Gomez E.A, H. et al. Usefulness of sampling with cotton swab for PCR-diagnosis of cutaneous leishmaniasis in the New World. *Acta Tropica.* 2002;81:197–202.
- Moreira MA, Luvizotto MC, Garcia JF, Corbett CE, Laurenti MD. Comparison of parasitological, immunological and molecular methods for the diagnosis of leishmaniasis in dogs with different clinical signs. *Vet Parasitol.* 2007;145:245-52.
- Muñoz G. Detección del perro doméstico como reservorio infeccioso de *Leishmania panamensis*. En: memorias XII Congreso Colombiano de Parasitología y medicina Tropical. *Biomedica.* 2005;5(Supl.1):30-3.
- Murray HW, Berman JD, Davies CR, Saravia NG. Advances in leishmaniasis. *Lancet* 2005;366:1561–77.

- Pascalis H, Lavergne A, Bourreau E, Prévot-Linguet G, Kariminia A, Pradinaud R, Rafati S, Launois P. Th1 Cell Development Induced by Cysteine Proteinases A and B in Localized Cutaneous Leishmaniasis Due to *Leishmania guyanensis*. *Infection and Immunity*. 2003;71(5):2924–2926.
- Pirmez C, Trajano V, Paes-Oliveira M, Da-Cruz AM, Goncalves DA, Costa SC, et al. Use of PCR in diagnosis of human american tegumentary leishmaniasis in Rio de Janeiro, Brazil. *J Clin Microbiol* 1999;37:1819-23.
- Reithinger R, Davies CR. 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(S1):123-126.
- Reithinger R, Davies CR. Is the domestic dog (*canis familiaris*) a reservoir host of american cutaneous leishmaniasis? a critical review of the current evidence. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1999.61(4):530–541.
- Reithinger R, Dujardin JC, Louzir H, Pirmez C, Alexander B, Brooker S. Cutaneous leishmaniasis. *Lancet Infect Dis* 2007;7:581–96.
- Ribeiro FC, Schubach AO, Mouta-Confort E, Schubach T, Madeira MF, Marzochi MM. Use of ELISA employing *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Leishmania) chagasi* antigens for the detection of IgG and IgG1 and IgG2 subclasses in the diagnosis of American tegumentary leishmaniasis in dogs. *Veterinary Parasitology*. 2007;148:200–206.
- Romero GAS, Guerra MVF, Paes MG, Cupolillo E, Toaldo CB, Macêdo VO, et al. Sensitivity of the polymerase chain reaction for the diagnosis of cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania (Viannia) guyanensis*. *Acta Trop* 2001;79:225-9.
- Santamaría, E., Ponce, N., Zipa, Y., Ferro, C. Presencia en el peridomicilio de vectores infectados con *Leishmania (Viannia) panamensis* en dos focos endémicos en el occidente de Boyacá, piedemonte del valle del Magdalena medio, Colombia. *Biomédica* 2006.26(Supl.1):82-94.
- Saravia NG, Weigle K, Navas C, Segura I, Valderrama I, 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.
- Sierra GA, De Farias MV, Gomes M, De Oliveira V. Comparison of cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *L. (V.) guyanensis* in Brazil: Therapeutic response to meglumine antimoniate. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2001;65(5):456-465.
- Sundar S y Rai M. Laboratory Diagnosis of Visceral Leishmaniasis. *Clinical and diagnostic laboratory immunology*. 2002;9(5):951–958.
- Travi B, Tabares C, Cadena H, Ferro C, Osorio Y. Canine Visceral Leishmaniasis in Colombia: relationship between clinical and parasitologic status and infectivity for sand flies. *Am J Trop Med Hyg* 2001;64:119-24.
- Travi BL, Tabares CJ, Cadena H. Infección por *Leishmania (Viannia) braziliensis* en dos perros colombianos: una nota sobre infectividad para flebótomos y respuesta al tratamiento. *Biomédica*. 2006;26(Supl.1):249-53.
- Travi BL. Leishmaniasis visceral canina MVZ-CORDOBA. 2000;5(1):29-32.
- 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.
- Walker J, Acestor N, Gongora R, Quadroni M, Segura I, Nicolas Fasel N, Saravia NG. Comparative protein profiling identifies elongation factor-1 and trypanothione peroxidase as factors associated with metastasis in *Leishmania guyanensis*. *Molecular & Biochemical Parasitology*. 2006;145:254–264.
- Xavier MB, Silveira FT, Demachki S, Ferreira MM, do Nascimento JL. American tegumentary leishmaniasis: a quantitative analysis of Langerhans cells presents important differences between *L. (L.) amazonensis* and *Viannia* subgenus. *Acta Trop.* 2005;95(1):67-73.