

ISSN 0120-4157

Biomédica

Revista del Instituto Nacional de Salud

PUBLICACIÓN ANTICIPADA EN LINEA

El Comité Editorial de *Biomédica* ya aprobó para publicación este manuscrito, teniendo en cuenta los conceptos de los pares académicos que lo evaluaron. Se publica anticipadamente en versión pdf en forma provisional con base en la última versión electrónica del manuscrito pero sin que aún haya sido diagramado ni se le haya hecho la corrección de estilo.

Siéntase libre de descargar, usar, distribuir y citar esta versión preliminar tal y como lo indicamos pero, por favor, recuerde que la versión impresa final y en formato pdf pueden ser diferentes.

Citación provisional:

Díaz RG, Salvatierra KA, Silva GA, Deschutter EJ, Bornay-Llinares FJ,

Acosta L. Primera caracterización molecular de *Leishmania infantum* en

pacientes con leishmaniosis visceral de la Provincia de Misiones, Argentina.

Biomédica. 2019;39(2).

Recibido: 26-02-18

Aceptado: 09-09-18

Publicación en línea: 12-09-18

Primera caracterización molecular de *Leishmania infantum* en pacientes con leishmaniosis visceral de la Provincia de Misiones, Argentina

Leishmaniosis visceral humana en Misiones, Argentina

First molecular characterization of *Leishmania infantum* species in patients infected with visceral leishmaniasis in Misiones province, Argentina.

Ricardo G. Díaz ¹, Karina A. Salvatierra ¹, Gustavo A Silva ¹, Enrique J. Deschutter ¹, Fernando J. Bornay-Llinares ², Lucrecia Acosta ^{2,3}

¹ Cátedra de Parasitología, Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales, Universidad Nacional de Misiones, Posadas, Misiones, Argentina

² Área de Parasitología, Departamento de Agroquímica y Medio Ambiente, Universidad Miguel Hernández de Elche, San Juan, Alicante, España

³ Unidad de Biología Molecular, Sanatorio Fontilles, Alicante, España

Correspondencia:

Lucrecia Acosta, Área de Parasitología, Universidad Miguel Hernández de Elche, Edificio Muhammad Al-Shafra, Campus de Sant Joan d'Alacant s/n, 03550 Sant Joan, Alicante, Spain

Teléfono: (0034) 965919350

lacosta@umh.es

Contribución de los autores:

Enrique J. Deschutter, Fernando J. Bornay-Llinares, Gustavo A Silva: conceptualización y diseño del estudio.

Gustavo A Silva: estudios de laboratorio.

Karina A. Salvatierra: caracterización molecular de las especies.

Ricardo G. Díaz y Lucrecia Acosta participaron en todas las etapas del estudio.

Todos los autores participaron en la redacción y corrección del manuscrito.

Introducción. La leishmaniosis cutánea por *Leishmania braziliensis* ha sido tradicionalmente endémica en Argentina y han sido descritos casos de visceralización posteriores a una leishmaniosis cutánea inicial. La leishmaniosis visceral emergió en Argentina en el año 2006 en la ciudad de Posadas, provincia de Misiones, afectando tanto a humanos como canes.

Objetivo. Identificar el agente etiológico a nivel de especie en los pacientes diagnosticados con leishmaniosis visceral en Misiones y describir las características clínico-epidemiológicas de los pacientes.

Materiales y métodos. Se estudió una serie de 24 pacientes confirmados con leishmaniosis visceral de la provincia de Misiones en el período 2009 al 2016. Para la identificación de *Leishmania* sp. los pacientes fueron sometidos a estudios diagnósticos indirectos (serológicos) y directos (microscopía, detección de ADN y secuenciación). También se estudiaron variables como edad, sexo, lugar de residencia, y signos y síntomas clínicos compatibles con leishmaniosis visceral.

Resultados. De los pacientes estudiados, el 75% (18/24) eran hombres y el 25% (6/24) menores de 4 años. El síntoma más frecuente fue el síndrome febril prolongado en el 87,5% de los pacientes (21/24), seguido de esplenomegalia con el 70,8% (17/24). Se identificó la especie *Leishmania infantum* en todos los pacientes estudiados.

Conclusión. Este hallazgo constituye la primera identificación de la especie *Leishmania infantum* en pacientes autóctonos de la provincia de Misiones. Este estudio evidencia la importancia de la PCR para el abordaje epidemiológico de la leishmaniosis visceral en Argentina.

Palabras clave: *Leishmania infantum*; reacción en cadena de la polimerasa; leishmaniasis visceral; Argentina.

Introduction: Cutaneous leishmaniasis caused by *L. braziliensis* has been historically endemic in Argentina is an historical endemic area and several cases of visceral leishmaniasis following previous cutaneous leishmaniasis have been reported. Currently, visceral leishmaniasis affecting humans and dogs is being found in the city of Posadas (Province of Misiones, Argentina) since 2006.

Objective: Identify the etiologic agent to species level in patients with visceral leishmaniasis diagnosis in Misiones province and describe its clinical and epidemiological characteristics.

Materials and methods: Twenty-four patients from Misiones province were studied from 2009 to 2016, all with a confirmed diagnosis of visceral leishmaniasis. To identify the *Leishmania* species involved, patient samples were analyzed by microscopy, serologic studies, DNA detection and sequencing. Variables like age, sex, clinical signs and symptoms consistent with visceral leishmaniasis were recorded.

Results: 75% (18/24) of the patients studied were males and 25% (6/24) were younger than 4 years. The most frequent symptom prolonged fever in 87.5% of the patients (21/24), followed by splenomegaly in 70.8% (17/24). *Leishmania infantum* was the only parasite species identified in all patients.

Conclusion: This finding constitutes the first molecular identification of *Leishmania infantum* species in autochthonous patients of Misiones province, Argentina. This study highlights the importance of the PCR for species identification in epidemiological studies of visceral leishmaniasis in Argentina.

Key words: *Leishmania infantum*, polymerase chain reaction, leishmaniasis, visceral; Argentina.

Las leishmaniosis engloban a un conjunto de enfermedades parasitarias de transmisión vectorial que afectan tanto al ser humano como a otros vertebrados. Estas parasitosis son causadas por diferentes especies de protozoos intracelulares del género *Leishmania*, que son transmitidos por picaduras de las hembras hematófagas de la subfamilia *Phlebotominae* (1).

Las leishmaniosis son endémicas en 98 países de 5 continentes, siendo diagnosticados anualmente 1,3 millones de nuevos casos, de los cuales, 300.000 son de leishmaniosis visceral (LV). Más de 310 millones de personas viven en zonas de riesgo de contraer LV y de 20.000 a 50.000 personas mueren anualmente (2). La LV es mundialmente reconocida como una de las enfermedades infecciosas más importantes que afecta principalmente a la población pobre que vive en áreas rurales y suburbanas, siendo endémica en la mayoría de regiones tropicales y subtropicales tanto en el Nuevo como en el Viejo Mundo (3). Un estudio realizado en la ciudad de Posadas concluyó que la mala calidad de la vivienda y el hacinamiento (pobreza estructural) se asociaron positivamente con el incremento del riesgo de contraer leishmaniosis visceral humana (4). En los focos registrados en la provincia de Misiones, es característica la urbanización no planificada intercalando áreas verdes y de uso doméstico, donde la cantidad de material orgánico es abundante. Esto favorece la colonización y la persistencia del vector *Lutzomyia longipalpis*. Estas características ambientales y socio-geográficas se asocian por lo general con deficientes servicios sanitarios y dificultades de acceso al sistema de salud, lo que a su vez resulta un factor de riesgo para el diagnóstico temprano de LV (5).

En el continente americano, la especie *Leishmania infantum* es el principal agente etiológico de la denominada leishmaniosis visceral zoonótica (1). Se

trata de una enfermedad que puede afectar tanto al ser humano como a otros mamíferos (perros domésticos, zorros, lobos, lince, coatí, ratas, comadrejas, osos hormigueros, entre otros). Aunque tradicionalmente ha sido considerada una enfermedad rural, hoy en día se encuentra bien establecida en zonas urbanas (1,3,6) en las cuales el perro es el principal reservorio (1,7).

La especie *L. infantum* infecta principalmente a macrófagos de órganos hematopoyéticos (médula ósea, bazo e hígado) causando graves disfunciones orgánicas.

En la ciudad de Posadas (Misiones, Argentina), se detectó en el año 2006 el primer caso autóctono de LV humana (8). Actualmente se han detectado más de 100 casos con una mortalidad del 10%, como se ha descrito en otras regiones del mundo (9,10).

La LV en Argentina se encuentra en expansión, así como sus vectores (11-13), detectándose casos humanos en otras 4 provincias: Salta, Entre Ríos, Santa Fe y Santiago del Estero (12,14-17).

El presente estudio tuvo como objetivos describir las características clínicas y epidemiológicas e identificar, mediante PCR, la especie o especies del género *Leishmania* involucradas en una serie de pacientes con LV confirmados por el sistema nacional de vigilancia en salud de Argentina en el período 2009 - 2016 en la provincia de Misiones. Asimismo se evaluó la utilidad de esta técnica para el diagnóstico y estudios epidemiológicos.

Materiales y métodos

Área de estudio

La provincia de Misiones posee un clima típicamente subtropical; caluroso con abundantes lluvias y alta humedad relativa. Esta comprende una superficie de 29.801 Km², limitando al norte y al este con Brasil, y al oeste con Paraguay.

Según el censo de INDEC al año 2010, Misiones contaba con 1.101.593 habitantes, de los cuales el 49,68% eran hombres (18).

Pacientes

Fueron seleccionados pacientes de la provincia de Misiones que concurrieron a consulta clínica al Hospital Escuela de Agudos “Ramón Madariaga” entre el 2009 y 2016 y resultaron casos confirmados de LV y de los que se logró amplificar por PCR el ADN compatible con el género *Leishmania*.

Finalmente, fueron objeto de estudio 24 pacientes. Estos cumplieron los siguientes criterios de inclusión: i) Pacientes residentes en la provincia de Misiones que concurrieron a consulta clínica y resultaron caso sospechoso de LV; ii) Pacientes que brindaron consentimiento para el uso del material clínico en estudios de caracterización del agente etiológico iii) Sujetos con al menos un resultado positivo en alguna de las siguientes técnicas:

inmunocromatografía, examen directo por microscopía o estudios moleculares (PCR). No se incluyó el total de pacientes del período de estudio por no cumplir los criterios de inclusión.

Toma de muestra y recolección de datos

Las fichas clínico-epidemiológicas en las que el profesional médico asentó los datos pertinentes del paciente incluyeron la siguiente información: fecha de

toma de la muestra, edad, sexo, localidad en la cual reside. El laboratorio no recibe datos que identifiquen al paciente.

Los síntomas y signos clínicos registrados en el estudio fueron la presencia o ausencia de: 1) fiebre prolongada, 2) pérdida de peso, 3) hepatomegalia, 4) esplenomegalia, 5) palidez, 6) ictericia, 7) edema, 8) ganglios linfáticos.

Para los estudios de laboratorio se tomaron 2 tipos de muestras: i) Una muestra de médula ósea mediante punción aspiración (PAMO), de aproximadamente 1,5 ml con 50 µl de EDTA (0,342 M). ii) Tres ml de sangre periférica mediante punción venosa por el personal de laboratorio de la institución a la cual acudió el paciente. Los tubos con sangre fueron centrifugados por 5 min a 3.000 rpm para recuperar el suero.

Técnicas diagnósticas

Técnicas diagnósticas indirectas (serológicas)

Test inmunocromatográfico rápido basado en el antígeno recombinante rK39

(ICT-rK39): Se analizó el suero de los pacientes seleccionados con tiras reactivas “Kalazar Detect™ Rapid test” de InBIOS International, Seattle, WA para humanos. La prueba inmunocromatográfica fue realizada siguiendo las instrucciones del fabricante.

Técnicas diagnósticas directas

Microscopía óptica: Los extendidos de PAMO fueron teñidos con Giemsa y visualizados al microscopio óptico en busca de amastigotes de *Leishmania* spp.

Técnicas moleculares

i) Extracción de Ácidos Nucleicos: Todas las muestras de PAMO fueron procesadas mediante la columna NucleoSpin® Tissue de Macherey-Nagel, Bethlehem, USA, siguiendo las instrucciones del fabricante. Como control

negativo de extracción se usó muestra negativa de PAMO suministrada por el Hospital Escuela de Agudos "Ramón Madariaga".

ii) Detección de Ácidos Nucleicos. Se amplificó la región del espaciador interno de la transcripción 1 (ITS-1) mediante PCR anidada. El protocolo utilizado para la primera reacción fue basado en el que desarrollaron Schönian y col. (19) incluyendo las modificaciones de Cruz y colaboradores para la segunda reacción (20). A fin de determinar el buen funcionamiento de los reactivos y la manipulación de los mismos, se usó un control negativo (agua bidestilada estéril) y un control positivo (ADN suministrado a partir de un aislamiento de cultivo suministrado por el Instituto Nacional de Parasitología "Dr. Mario Fatała Chaben") en cada una de las reacciones de PCR. La visualización de los productos se realizó en un gel de agarosa 1,5% teñido con bromuro de etidio.

iii) Caracterización. Este procedimiento fue realizado mediante la secuenciación directa de los productos de PCR, con los cebadores específicos de la segunda reacción (20); usando el kit comercial para secuenciación de ciclos de terminación "Big-Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit V3.1" y el secuenciador de ADN automático "ABI PRISM 377" (Applied Biosystems, Foster City, CA). Las secuencias obtenidas fueron analizadas y editadas con el programa analizador de secuencias Lasergene® (DNASTAR, Madison, WI). Posteriormente, las secuencias obtenidas fueron comparadas en la base de datos GenBank a fin de obtener una coincidencia con alguna especie descrita.

Aspectos éticos

Todos los procedimientos llevados a cabo fueron revisados y aprobados por el Comité de Bioética del Hospital Público Provincial de Pediatría "Dr. Fernando Barreyro" de la ciudad de Posadas. Los protocolos de toma de muestra y

manejo de las mismas se realizaron según las directrices del Hospital Escuela de Agudos “Ramón Madariaga”.

Todos los participantes del estudio dieron su consentimiento por escrito según el modelo de consentimiento informado utilizado por el Hospital Escuela de Agudos “Ramón Madariaga” para estudios de LV. Dicho consentimiento avaló la realización de técnicas diagnósticas para la identificación de especie de *Leishmania*.

Resultados

Se estudiaron 24 pacientes con diagnóstico confirmado de LV mediante observación microscópica directa, ICT o PCR. Los pacientes residían mayoritariamente en Posadas 33% (8/24). Las demás localidades de residencia fueron Oberá con 25% (6/24) y San Ignacio con 20% (5/24), Candelaria 12,5% (3/24), en Apóstoles 4% (1/24) y Alem 4% (1/24). De los pacientes estudiados, el 75% (18/24) eran hombres y el 25% (6/24) menores de 4 años. En el cuadro 1 se observan los resultados de laboratorio, y la distribución por sexo y edad de los pacientes.

El paciente asintomático fue un neonato, cuya madre fue diagnosticada con LV durante el embarazo. Asimismo, ningún paciente presentó todos los síntomas, pero dos de ellos presentaron seis síntomas simultáneos.

En el cuadro 2 se presentan los signos y síntomas clínicos. El síntoma más frecuente resultó ser el síndrome febril prolongado en el 87,5% de los pacientes (21/24), seguido de esplenomegalia con el 70,8% (17/24). Ningún paciente de esta serie presentó ascitis.

De los 24 pacientes estudiados el 79,2% (19/24) resultaron positivos por PCR-anidada para el género *Leishmania* y el 66,6% (16/24) al frotis. La prueba de ICT resultó positiva en el 91,6% (22/24) de los casos.

Todas las muestras que resultaron positivas por PCR-anidada y confirmadas como *Leishmania* sp. fueron sometidas a secuenciación. En total, 19 muestras de LV fueron sometidas a secuenciación y todas las secuencias obtenidas presentaron identidad 100% con la especie *L. infantum*.

Discusión

El presente estudio constituye el primer trabajo de caracterización molecular de *L. infantum* de los casos de LV acontecidos en los últimos años en la provincia de Misiones.

Hasta el año 2006 en que fue descrito el primer caso de LV autóctono en la Argentina, se habían descrito 17 casos de LV dentro del área endémica de LC por *L. braziliensis* y todos los casos autóctonos fueron finalmente considerados como visceralizaciones de una LC inicial producida por *L. braziliensis* (21). Los casos se describieron como autóctonos de las Provincias del norte argentino (ninguno de ellos en Misiones) y cuatro de los casos fueron considerados como importados de otros países. Solo un caso fue debido a *L. infantum* en la provincia de Mendoza, de origen desconocido (22).

Este hallazgo supone un cambio en el cuadro epidemiológico de la leishmaniosis en Argentina. A pesar de que la provincia de Misiones es endémica para LC desde 1998 (23), y la especie *L. braziliensis* puede ser ocasionalmente viscerotrópica en el país, la única especie encontrada en estos pacientes con LV en Misiones fue *L. infantum*.

Estos resultados ponen de manifiesto la necesidad de la caracterización molecular del agente causal de la LV para un correcto manejo de los pacientes y un adecuado conocimiento de la epidemiología de la leishmaniosis en el país. La técnica de referencia en la Argentina, para el diagnóstico de LV es la demostración de parásitos en material de punción esplénica o de médula ósea como diagnóstico de certeza (1,24). Sin embargo, debido a la baja sensibilidad de la observación microscópica, el Ministerio de Salud de la Nación (Argentina) recomienda el uso de técnicas complementarias al diagnóstico (24). En nuestro estudio, se obtuvo un 66,6% de positivos a partir del extendido de muestras de PAMO, tal como se esperaba de acuerdo con lo observado por otros autores (25-27).

En este sentido se recomienda el uso del test inmunocromatográfico rápido basado en el antígeno recombinante rK39 (ICT-rK39) como herramienta de diagnóstico de LV considerando su elevada sensibilidad y especificidad. Si bien la detección de anticuerpos no implica la presencia de infección activa (24,25), esta prueba es considerada junto al cuadro clínico, una prueba de referencia para confirmar los casos humanos de pacientes con LV en Argentina. La ICT-rK39 resultó en un alto porcentaje de positivos (91,6%) entre los pacientes estudiados, coincidiendo con lo señalado por diversos autores (entre el 80-90%) (25).

Actualmente los estudios moleculares han demostrado ser útiles para un diagnóstico y caracterización rápida, temprana, de alta sensibilidad y especificidad. Esta técnica también es recomendada por el Ministerio de Salud de la Nación para el diagnóstico de LV (19,20,24,26,28). La técnica de PCR anidada en el diagnóstico de LV podría resultar una herramienta eficaz para la

caracterización de la especie causante de la leishmaniosis visceral. Por lo tanto, la inclusión en el diagnóstico rutinario de la amplificación de ácidos nucleicos seguidos de la caracterización, podría ser de utilidad para esta patología en la provincia.

En el presente estudio, los resultados obtenidos de la PCR anidada se asemejan a los obtenidos por otros autores (85-95%), observándose un número similar de posibles falsos negativos debidos a razones no esclarecidas entre las que podría estar la toma o conservación de la muestra entre otras (28-31). La región diana empleada en este estudio (ITS-1) es una región lo suficientemente conservada para realizar, por un lado, el diagnóstico molecular, y a su vez, presenta suficiente polimorfismo como para permitir la tipificación a nivel de especie (19,20,28-30).

El patrón epidemiológico en relación a los parámetros estudiados es diferente a lo observado en otras áreas. Según la OMS y la Dirección de Epidemiología de la Nación Argentina, el 90% de los casos de LV ocurre en niños menores de 10 años (1,24). Sin embargo, nuestro estudio no muestra un patrón definido en relación a la edad de los pacientes, si bien es cierto que el 25% de ellos fueron menores de 4 años. Por otro lado, en los pacientes de Misiones encontramos un mayor porcentaje de hombres infectados, como se ha observado recientemente en otros estudios en Brasil (32,33). La OMS puntualiza que en el pasado las leishmaniosis en las Américas han sido históricamente enfermedades ocupacionales. Aunque los factores de riesgo ocupacionales siguen teniendo importancia, la presencia del vector en el ambiente peridoméstico ha llevado a un aumento rápido en el número de casos de personas sin exposición ocupacional (1). Los resultados obtenidos en el

presente estudio sugieren que en esta área geográfica los factores ocupacionales podrían tener un papel importante en la transmisión de la enfermedad, lo que se manifiesta en un mayor predominio de casos observados en hombres adultos.

El movimiento migratorio en puntos como Posadas o Puerto Iguazú podría haber favorecido la ocurrencia de LV en la provincia ya que en los países vecinos, Paraguay y Brasil, esta enfermedad se encuentra bien establecida; además, la presencia del vector aumenta la posibilidad de transmisión de esta enfermedad entre canes y humanos (34,35).

Los síntomas clínicos más frecuentes en los pacientes con LV fueron síndrome febril prolongado y esplenomegalia, esto concuerda con lo expresado por la OMS (1) y con los registros del sistema de vigilancia en los reportes oficiales del Ministerio de Salud de Misiones para los 116 pacientes notificados (1).

El único paciente asintomático fue un neonato incluido en el estudio, cuya madre fue diagnosticada con LV durante el embarazo. Existen evidencias de transmisión vertical de LV aunque resulta un hecho poco frecuente (36). El neonato de este estudio resultó positivo a las pruebas serológicas y a la evaluación de frotis en la PAMO, aunque los resultados de las pruebas moleculares fueron negativos (36). Los resultados serológicos positivos en estos neonatos podrían resultar del paso transplacentario de anticuerpos maternos (1,36,37). A pesar de no presentar síntomas, el paciente fue tratado con anfotericina B liposomal y fue dado de alta al completar el tratamiento.

En conclusión, este estudio presenta la primera identificación del agente etiológico de la LV en Misiones, Argentina, confirmando la presencia de *L. infantum* en estos pacientes. Este hecho amplía el perfil de la epidemiología de

la leishmaniosis tradicionalmente establecida en la provincia de Misiones. Los resultados muestran la conveniencia del uso de la PCR como método de diagnóstico, debido a su alta sensibilidad y especificidad, así como a la posibilidad de tipificación de la especie.

La detección temprana de la infección y de casos asintomáticos mediante PCR podría ayudar a reducir la morbi-mortalidad de esta infección en el país.

Agradecimientos

Al personal médico que realizó el diagnóstico clínico; Gustavo Méndez, Sandra Borchichi y Liliana Arce. Al Ministerio de Salud Pública de Misiones por su ayuda para recabar los datos clínicos. Al Laboratorio de Alta Complejidad Misiones por su aporte en este estudio.

Conflicto de intereses

Los autores declaran que no existen conflictos de intereses.

Financiación

Este estudio fue realizado con fondos para proyectos de investigación incentivados y otorgados por la Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales de la Universidad Nacional de Misiones, Resolución CD325-13 (Nombre del proyecto: “Optimización del diagnóstico de leishmaniasis visceral humana y canina en Misiones”), el Sanatorio Fontilles y fondos del programa de cooperación para el desarrollo de la Universidad Miguel Hernández de Elche.

Referencias

- 1. Organización Mundial de la Salud.** Control of the leishmaniasis. Fecha de consulta: 19 de marzo de 2018. Disponible en:
http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/44412/1/WHO_TRS_949_eng.pdf

2. **Organización Mundial de la Salud.** Investing to overcome the global impact of neglected tropical diseases. Third WHO report on neglected tropical diseases. 2015, WHO/HTM/NTD/2015.1. Fecha de consulta: 19 de marzo 2018. Disponible en:
http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/152781/1/9789241564861_eng.pdf?ua=1
3. **Dantas-Torres F.** Canine leishmaniosis in South America. *Parasit Vectors.* 2009;26:S1. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-2-S1-S1>
4. **López K, Tartaglino LC, Steinhorst II, Santini MS, Salomón OD.** Factores de riesgo, representaciones y prácticas asociadas con la leishmaniasis visceral humana en un foco urbano emergente en Posadas, Argentina. *Biomédica.* 2016;36:51-63.
<https://doi.org/10.7705/biomedica.v36i2.2953>
5. **Salomón OD, Mastrángelo AV, Santini MS, Liotta DJ, Yadón ZE.** La eco-epidemiología retrospectiva como herramienta aplicada a la vigilancia de la leishmaniasis en Misiones, Argentina, 1920-2014. *Rev Panam Salud Publica.* 2016;40:29-39.
6. **Alvar J, Yactayo S, Bern C.** Leishmaniasis and poverty. *Trends Parasitol.* 2006;22:552-7. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2006.09.004>
7. **Alvar J, Cañavate C, Molina R, Moreno J, Nieto J.** Canine leishmaniasis. *Adv Parasitol.* 2004;57:1-88.
[https://doi.org/10.1016/S0065-308X\(04\)57001-X](https://doi.org/10.1016/S0065-308X(04)57001-X)
8. **Salomón OD, Sinagra A, Nevot MC, Barberian G, Paulin P, Estevez JO, et al.** First visceral leishmaniasis focus in Argentina. *Mem Inst*

- Oswaldo Cruz. 2008;103:109-11. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762008000100018>
- 9. Gutiérrez JA, Fleitas C, Milano M, González B.** Informe epidemiológico semanal. Posadas: Ministerio de Salud Pública de Misiones; 2016.
- 10. Alvar J, Vélez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, et al.** Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. PLoS One. 2012;7:e35671. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035671>
- 11. Quintana MG, Fernández MS, Salomón OD.** Distribution and abundance of Phlebotominae, vectors of leishmaniasis, in Argentina: spatial and temporal analysis at different scales. J Trop Med. 2012;2012:652803. <https://doi.org/10.1155/2012/652803>
- 12. Fernández MS, Santini MS, Cavia R, Sandoval AE, Pérez AA, Acardi S, et al.** Spatial and temporal changes in *Lutzomyia longipalpis* abundance, a *Leishmania infantum* vector in an urban area in northeastern Argentina. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2013;108: 817-24. <https://doi.org/10.1590/0074-0276130047>
- 13. Szelag EA, Parras MA, Fabiani M, Rosa JR, Salomón OD.** Incipient colonisation of *Lutzomyia longipalpis* in the city of Resistencia, province of Chaco, Argentina (2010-2012). Mem Inst Oswaldo Cruz. 2014;109:488-91. <https://doi.org/10.1590/0074-0276130054>
- 14. Acosta L, Díaz R, Torres P, Silva G, Ramos M, Fattore G, et al.** Identification of *Leishmania infantum* in Puerto Iguazú, Misiones, Argentina. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 2015;57:175-6. <https://doi.org/10.1590/S0036-46652015000200013>

- 15. Barroso PA, Nevot MC, Hoyos CL, Locatelli FM, Lauthier JJ, Ruybal P, et al.** Genetic and clinical characterization of canine leishmaniasis caused by *Leishmania (Leishmania) infantum* in northeastern Argentina. *Acta Tropica*. 2015;150:218-23.
<https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2015.08.007>
- 16. Barroso PA, Marco JD, Locatelli FM, Cardozo RM, Mora MC, Hoyos CL, et al.** Visceral leishmaniasis caused by *Leishmania infantum* in Salta, Argentina: possible reservoirs and vectors. *Am J Trop Med Hyg*. 2015;93:334-9. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.14-0267>
- 17. Gould IT, Perner MS, Santinin MS, Saavedra SB, Bezzi G, Maglianese MI, et al.** Leishmaniasis visceral en la Argentina. Notificación y situación vectorial (2006-2012). *Medicina (B. Aires)*. 2013;73:104-10.
- 18. Instituto Nacional de Estadísticas y Censos.** Censo nacional del año 2010. Fecha de consulta: 14 de diciembre 2016. Disponible en: http://www.indec.gov.ar/nivel4_default.asp?id_tema_1=2&id_tema_2=41&id_tema_3=135
- 19. Schönian G, Nasereddin A, Dinse N, Schweynoch C, Schallig HD, Presber W, et al.** PCR diagnosis and characterization of *Leishmania* in local and imported clinical samples. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2003;47:349-58. [https://doi.org/10.1016/S0732-8893\(03\)00093-2](https://doi.org/10.1016/S0732-8893(03)00093-2)
- 20. Cruz I, Millet A, Carrillo E, Chenik M, Salotra P, Verma S, et al.** An approach for interlaboratory comparison of conventional and real-time PCR assays for diagnosis of human leishmaniasis. *Exp Parasitol*. 2013;134:281-9. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2013.03.026>

- 21. Salomón OD, Sosa SE, Rossi GC, Spinelli G.** Presencia de *Lutzomyia longipalpis* y situación de la leishmaniasis visceral en Argentina. Medicina (B. Aires). 2001;61:174-8.
- 22. Martín-Sánchez J, Navarro-Mari JM, Pasquau-Liaño J, Salomón OD, Morillas-Márquez F.** Visceral leishmaniasis caused by *Leishmania infantum* in a Spanish patient in Argentina: what is the origin of the infection? Case Report. BMC Infect Dis. 2004;4:20. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-4-20>
- 23. Salomón OD, Sosa SE, Canini L, Cordoba EL.** Leishmaniosis tegumentaria en un área con niveles epidémicos de transmisión, Salta, Argentina, 1998. Medicina (B. Aires). 2001;61:284-90.
- 24. Ministerio de Salud de la Nación.** Leishmaniasis visceral. Fecha de consulta: 14 de diciembre 2016. Disponible en: http://www.msal.gob.ar/images/stories/bes/graficos/0000000798cnt-2012-03-15_leishmaniasis-visceral-guia.pdf
- 25. Guerin PJ, Olliaro P, Sundar S, Boelaert M, Croft SL, Desjeux P, et al.** Visceral leishmaniasis: current status of control, diagnosis, and treatment, and a proposed research and development agenda. Lancet Infect Dis. 2002;2:494-501. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(02\)00347-X](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(02)00347-X)
- 26. Cortes S, Chicharro C, Cruz I, Cristovao JM, Canavate C, Campino L.** Genetic diversity of human zoonotic leishmaniasis in Iberian Peninsula. Zoo Pub Heal. 2010;58:234-7. <https://doi.org/10.1111/j.1863-2378.2010.01374.x>

- 27. Solano-Gallego L, Koutinas A, Miró G, Cardoso L, Pennisi MG, Ferrer L, et al.** Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniasis. *Vet Parasitol.* 2009;165:1-18. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.05.022>
- 28. Fraga LT, Brustoloni YM, Lima RB, Cavalheiros MB, Oshiro ET, Oliveira J, et al.** Polymerase chain reaction of peripheral blood as a tool for the diagnosis of visceral leishmaniasis in children. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2010;105:310-3. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0145-2013>
- 29. Antinori S, Calattini S, Longhi E, Bestetti G, Piolini R, Magni C, et al.** Clinical use of polymerase chain reaction performed on peripheral blood and bone marrow samples for the diagnosis and monitoring of visceral leishmaniasis in HIV-infected and hiv uninfected patients: a single-center, 8-year experience in italy and review of the literature. *Clin Infect Dis.* 2007;44:1602-10. <https://doi.org/10.1086/518167>
- 30. Cortés S, Rolao N, Ramada J, Campino L.** PCR as a rapid and sensitive tool in the diagnosis of human and canine leishmaniasis using *Leishmania donovani* s.l.-specific kinetoplastid primers. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg.* 2004;98:12-7. [https://doi.org/10.1016/S0035-9203\(03\)00002-6](https://doi.org/10.1016/S0035-9203(03)00002-6)
- 31. Roelfsema JH, Nozari N, Herremans T, Kortbeek LM, Pinelli E.** Evaluation and improvement of two PCR targets in molecular typing of clinical samples of *Leishmania* patients. *Exp Parasitol.* 2010;10:1006. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2010.06.024>
- 32. Bruhn FR, Morais HF, Bruhn NC, Cardoso DL.** Human visceral leishmaniasis: factors associated with deaths in Belo Horizonte, Minas

- Gerais state, Brazil from 2006 to 2013. *Epidemiol Infect.* 2018;146:565-70. <https://doi.org/10.1017/S0950268818000109>
- 33. Lima ID, Lima AL, Mendes-Aguiar CO, Coutinho JF, Wilson ME, Pearson RD, et al.** Changing demographics of visceral leishmaniasis in northeast Brazil: Lessons for the future. *PLoS Negl Trop Dis.* 2018;12:e0006164. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006164>
- 34. Peres D, Lamounier D, Lopez I, Nery C, Martins P.** Short Report: Heterogeneity of *Leishmania infantum chagasi* kinetoplast DNA in Teresita (Brazil). *Am Soc Trop Med Hyg.* 2010;82:819-21. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2010.09-0600>
- 35. Gómez AE.** Análisis de la diversidad genética de *Leishmania infantum* en Paraguay mediante la técnica del kDNA-PCR-RFLP. [Tesis]. Asunción: Universidad Nacional de Asunción; 2013.
- 36. Figueiró-Filho EA, Duarte G, El-Beitune P, Quintana SM, Lemos Maia T.** Visceral leishmaniasis (kala-azar) and pregnancy. *Infect Dis Obstet Gynecol.* 2004;12:31-40. <https://doi.org/10.1080/1064744042000210384>
- 37. Mescouto-Borges MM, Maués E, Costa DL, da Silva Pranchevicius MC, Sierra Romero GA.** Congenitally transmitted visceral leishmaniasis: report of two Brazilian human cases. *Braz J Infect Dis.* 2013;17:263-6. <https://doi.org/10.1016/j.bjid.2012.10.017>

Cuadro 1. Resultados de las pruebas por paciente, relacionadas con las variables edad y sexo.

ICT	FROTIS	PCR	EDAD	SEXO
POS	NEG	POS	71	M
POS	POS	POS	41	M
POS	POS	-	2	M
POS	POS	POS	46	M
POS	NEG	-	75	F
POS	NEG	-	44	M
POS	NEG	POS	58	M
POS	POS	POS	1	M
POS	POS	POS	3	F
POS	POS	POS	20	F
POS	POS	POS	42	M
POS	POS	-	13	F
NEG	NEG	POS	78	M
POS	POS	POS	2	M
POS	NEG	POS	37	M
POS	NEG	POS	39	M
POS	POS	-	0	M
POS	POS	POS	1	F
POS	POS	POS	53	M
POS	POS	POS	11	M
POS	POS	POS	34	M
POS	POS	POS	36	M
NEG	POS	POS	24	F
POS	NEG	POS	3	M

Resultados de laboratorio y características epidemiológicas de los pacientes. **ICT** (test inmunocromatográfico rápido): POS: positivo, NEG: negativo; **Frotis**: POS: positivo, NEG: negativo; **PCR**: POS: positivo a *Leishmania infantum*, NEG: negativo a *Leishmania infantum*; **Edad**: Edad en años de los pacientes; **Sexo**: M: masculino, F: femenino; -: No datos.

Cuadro 2. Síntomas clínicos que presentaban los pacientes.

Síntomas	Número/total (%)
Síndrome febril prolongado	21/24 (87,5)
Pérdida de peso	10/24 (41,7)
Hepatomegalia	14/24 (58,3)
Esplenomegalia	17/24 (70,8)
Palidez	8/24 (33,3)
Ictericia	2/24 (8,3)
Edema	1/24 (4,16)
Nódulos linfáticos	2/24 (8,3)
Ascitis	0

Signos y síntomas clínicos de los pacientes según datos oficiales del Ministerio de Salud Pública de la Provincia de Misiones.