

**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE VETERINARIA**

LEISHMANIOSIS. REPORTE DE UN CASO CLÍNICO EN URUGUAY

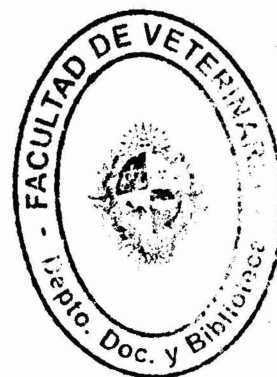
por

Walter Ángel, MARTÍNEZ CARRERA

TESIS DE GRADO presentada como uno de
los requisitos para obtener el título de Doctor
en Ciencias Veterinarias
Orientación: Medicina Veterinaria

MODALIDAD: Presentación de un caso
clínico

**MONTEVIDEO
URUGUAY
2012**




FV-29658

PAGINA DE APROBACIÓN

TESIS DE GRADO aprobada por:

Presidente de Mesa:



Dra. Perla A. Cabrera.

Segundo Miembro (Tutor):



Dr. Daniel Scavone.

Tercer Miembro:

Dr. José Piaggio.

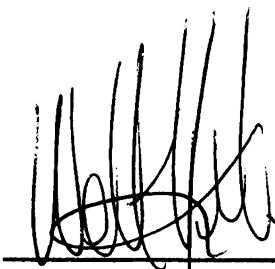
Cuarto Miembro (Co-Tutor):

Dra. Andrea Wolberg.

Fecha:

3 de Octubre del 2012


Autor:



Br. Walter Ángel Martínez Carrera.

29658

FACULTAD DE VETERINARIA

Aprobado con 12(doc) 

AGRADECIMIENTOS

A mi tutor Dr. Daniel Scavone por su apoyo y dedicación

A mi co-tutora Dra. Andrea Wolberg por su invaluable aporte en la elaboración y corrección de este trabajo.

Al Dr. Carlos E. Larsson por su aporte en la realización de la serología, la cual fue muy importante para complementar los estudios de nuestra paciente y mejorar las posibilidades diagnósticas que hoy no existen en nuestro país.

A la Dra. Adriana Duchene quien realizó la histopatología y nos facilitó las imágenes de la misma.

A los Doctores Octavio Estévez y Cecilia Nevot, de la ciudad de Posadas-Misiones, por compartir sus conocimientos y experiencias concernientes al tema.

A Elizabeth Pechiar por traducir el resumen al inglés.

A la Dra. Graciela Pedrana del Área de Histología de nuestra facultad por facilitarnos el instrumental necesario para la obtención de las imágenes de la citología de nuestra paciente.

Y finalmente al personal del Laboratorio del Hospital de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Buenos Aires.

TABLA DE CONTENIDO

PAGINA DE APROBACION	2
AGRADECIMIENTOS	3
LISTADO DE FIGURAS.....	8
RESUMEN.....	9
ABSTRACT.....	10
1. INTRODUCCIÓN.....	11
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	12
Etiología	12
Agente.....	12
Taxonomía de leishmania.....	12
Identificación y clasificación.....	13
Características morfológicas del Protozoario	14
Vector	15
Taxonomía del vector	15
Morfología del vector	15
Ecología del vector	16
Reservorios	17
Ciclo biológico	19
Otras formas de trasmisión.....	21
Transplacentaria.....	21
Venérea.....	23
Transfusión sanguínea	24
Otros posibles vectores	25
Patogenia	25
Respuesta inmune innata y adquirida.....	26
Respuesta Th1 protectora	28
Respuesta Th2 no protectora	28
Manifestaciones clínicas.....	29
Diagnóstico.....	31

Hallazgos de laboratorio	31
Pruebas serológicas	32
Inmunofluorescencia indirecta	33
Enzimoimmunoensayo	33
Western Blotting	34
Prueba de inmunocromatografía indirecta (Test rápidos)	35
Identificación del organismo por microscopia.....	36
Estudio Citológico	36
Estudio Histopatológico	37
Reacción en cadena de la polimerasa o PCR.....	37
PCR convencional	38
PCR en tiempo real	39
Diagnóstico diferencia	39
Tratamiento.....	40
Antimoniales Pentavalentes.....	40
Miltefosina	41
Allopurinol.....	42
Fármacos adicionales.....	43
Anfotericina B (AMB)	43
Pentamidina.....	43
Aminosidina	44
Protocolos terapéuticos	44
Pronóstico.....	45
Control y prevención.....	45
Vacunas disponibles para Leishmaniosis	47
Primera generación de vacunas	47
Avances hacia una definitiva segunda generación de vacunas	47
Situación de la leishmaniasis en el Viejo Mundo y América Latina.	49
3. OBJETIVOS	55
4. MATERIALES Y MÉTODOS	56
5. RESULTADOS	62
6. DISCUSIÓN.....	63

7. CONCLUSIÓN.....	68
8. BIBLIOGRAFIA.....	69
9. ANEXO.....	76
Tabla 1 y 2.....	76
Tabla 3 y 4.....	77
Tabla 5 y 6.....	78
Tabla 7 y 8.....	79
Tabla 9 y 10.....	80
Foto 1. Amastigote de <i>Leishmania</i>	81
Foto 2. Promastigotes de <i>Leishmania</i>	81
Foto 3. <i>Lutzomyia Longipalpis</i>	81
Foto 4. Dermatitis en muslo derecho.....	81
Foto 5. Inflamación del carpo izquierdo.....	81
Foto 6. Atrofia de los músculos temporales.....	81
Fotos 7 y 8. Úlceras en la unión muco-cutánea oral.....	82
Foto 9. Úlcera en pulpejo del segundo dedo del miembro torácico derecho.....	82
Foto 10. Alopecia y lesiones vesículo-ulcerativas en dorso.....	82
Foto 11. Ampliación de lesiones de la foto 10.....	82
Foto 12. Onicogriphosis.....	82
Foto 13. Enfermedad degenerativa articular de carpos.....	83
Foto 14. Corte histopatológico de las úlceras de la unión muco-cutánea oral.....	83
Fotos 15 y 16. Histopatología que muestra macrófagos con amastigotes de <i>Leishmania</i> en su interior.....	83
Foto 17. Idem fotos 15 y 16.....	83
Foto 18. PAAF de nódulo linfático poplíteo donde se observan amastigotes de <i>Leishmania</i> libres en frotis.....	83

Foto 19. PAAF de nódulo linfático poplíteo, donde se observan macrófagos con amastigotes internalizados.....	84
Foto 20. Mejor estado general post-tratamiento.....	84
Fotos 21 y 22. Mejoría post-tratamiento evidenciada por remisión de úlceras en unión muco-cutánea.....	84
Foto 23. Evolución de lesiones del dorso vistas en fotos 10 y 11 post-tratamiento.....	84
Foto 24. Cicatrización de úlcera del pulpejo de la foto 9 post-tratamiento.....	84
Foto 25. Úlceras en mucosa gástrica.....	85
Foto 26. Contenido sanguinolento en intestino delgado.....	85

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1. Taxonomía de Leishmania.....	13
Figura 2. Metaciclogénesis en el vector.....	20
Figura 3. Ciclo biológico.....	21
Figura 4. Respuesta Th1 y Th2.....	28
Figura 5. Distribución de la Leishmaniasis visceral en el viejo mundo.....	50
Figura 6. Distribución de la Leishmaniasis visceral en América Latina.....	51
Figura 7. Leishmaniasis visceral distribución en Brasil.....	51
Figura 8. Leishmaniasis visceral distribución en Norte Argentino.....	52
Figura 9. Distribución hacia el sur de <i>Lutzomyia Longipalpis</i>.....	54
Figura 10. Mapa de Paraguay distribución departamental.....	56
Figura 11. Mapa del Departamento Central con sus distritos.....	56
Figura 12. Mapa de la ciudad de Lambaré.....	56

RESUMEN

La Leishmaniasis es una enfermedad zoonótica causada por protozoarios de distintas especies del género *Leishmania*, siendo endémica en muchas regiones tropicales y subtropicales del nuevo y viejo mundo. En Latinoamérica presenta una alta incidencia, con excepción de Chile y Uruguay. Es causada en el viejo mundo por *L. infantum* y en el nuevo mundo por *L. chagasi*, es principalmente importante en perros, el cual es considerado el principal reservorio de este parásito. La forma más importante de transmisión es dada por un mosquito vector del género *Phlebotomus* en Europa y *Lutzomyia* en las Américas, en los cuales el agente se encuentra en la forma de promastigote, el cual es transmitido por intermedio de su picadura a un huésped vertebrado, en el cual se transforma a la forma amastigote. No podemos olvidar otras formas de transmisión como es la vertical y venérea. Si bien en personas la Leishmaniasis se presenta en las formas cutánea, mucocutánea y visceral, por lo general los caninos presentan afección conjunta visceral y cutánea. Hasta la fecha existía un solo reporte post-mortem de dicha enfermedad en nuestro país. En esta tesis se describió el caso clínico de un canino proveniente de Paraguay, el cual mostró las dificultades diagnósticas de dicha enfermedad en nuestro país. Posteriormente se instauró un tratamiento con Allopurinol por 45 días, realizándose un seguimiento de la evolución clínica del paciente, combinándose posteriormente con Antimoniato de Meglumina, falleciendo el paciente 7 días después del comienzo de su aplicación. Hoy en día existe en nuestro país el riesgo potencial de transmisión de la Leishmaniasis, por constatarse la presencia del vector (*Lutzomyia longipalpis*) en los departamentos de Salto y Artigas, los cuales se encuentran próximos a zonas endémicas, como son el norte Argentino y sur de Brasil. Lo antes mencionado, en conjunto con el movimiento de personas y perros a lo largo de la frontera, y la ausencia de legislación que controle el estado sanitario al ingreso de animales provenientes de dichas regiones, hacen a nuestro país muy vulnerable para el ingreso de esta zoonosis.

ABSTRACT

Leishmaniasis is a zoonotic disease caused by several species of a protozoan belonging to the genus *Leishmania*. It is endemic in several tropical and subtropical regions from both the Old and New Worlds. It has a high incidence in Latin America, with the exception of Chile and Uruguay. In the Old World it is caused by *L. infantum* and in the New World by *L. chagasi*. It is an important disease in dogs, which are considered the main reservoir of this parasite. The most important form of transmission is by vector mosquitoes from the genus *Phlebotomus* in Europe and the genus *Lutzomyia* in the Americas, in which the agent is in the promastigote stage. This promastigote is transmitted to a vertebrate host by the bite of an infected mosquito, and once in the vertebrate host it is transformed into the amastigote stage. We cannot forget other forms of transmission such as vertical and venereal routes. While in humans Leishmaniasis occurs in cutaneous, mucocutaneous and visceral forms, in dogs the infection usually involves both cutaneous and visceral forms simultaneously. Until now there was only one post-mortem report of the disease in our country. This thesis describes a clinical case of Leishmaniasis in a dog coming from Paraguay, and shows the difficulties in making a diagnosis of this disease in our country. The animal was treated with Allopurinol for 45 days, with regular clinical evaluations, and later Antimonial Meglumine was added to the initial treatment. The patient dying 7 days later. Nowadays there is a potential risk for the transmission of Leishmaniasis in our country as the vector (*Lutzomyia longipalpis*) was found in the provinces of Salto and Artigas, both of which are in close proximity to endemic areas found in the north of Argentina and the south of Brasil. Together with the movement of people and dogs across the national border, and the lack of legislation for the control of the sanitary status of animals entering the country from this areas make our country very vulnerable to the entry of this zoonosis.

1. INTRODUCCIÓN

La Leishmaniasis se encuentra en 88 países, donde más de 350 millones de personas están en riesgo y se estima que hay 2 millones de nuevos casos por año en todo el mundo, 0.5 millones con Leishmaniasis visceral y 1.5 millones por Leishmaniasis cutánea (Desjeux, 2004).

Ella afecta a personas de bajo nivel socioeconómico, con mayor incidencia en países con miseria y pobreza, donde sus habitantes tienen altos índices de desnutrición y dificultad en acceder a los centros de salud (WHO).

Es una entidad generada por un protozoo del género *Leishmania*, siendo en algunos continentes una enfermedad zoonótica (transmisión de un animal al hombre) y en otros antropónicas (de una persona a otra), pero en ambos casos su vector es un mosquito del género *Phlebotomo* o *Lutzomyia* (Green, 2008).

Es endémica en muchas ciudades de América Latina, presentándose en el hombre en la forma cutánea, muco-cutánea y visceral. Cada una de ellas provocada por diferentes especies del parásito, al igual que sus vectores y reservorios (Green, 2008).

La forma cutánea, donde el agente etiológico de mayor incidencia es la *Leishmania braziliensis* entre otras, se distribuye en todos los países de Latinoamérica, con excepción de Chile y Uruguay (WHO). En el hombre y perro el agente vector, *Lutzomyia whitmani* o *neivai*, causa lesiones en el lugar de inoculación y tienen de reservorio a los animales salvajes (roedores y marsupiales).

El perro es el reservorio de mayor importancia en la Leishmaniasis visceral, la cual tiene mayor implicancia en el hombre por existir una estrecha relación con este último, y por ser una enfermedad de contagio a nivel urbano. El agente infectante es la *Leishmania chagasi* en América del Sur y Central, o *infantum* en Europa, siendo la *Lutzomyia Longipalpis* el vector en las Américas (Solano-Gallego et al., 2009).

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Se habla de Leishmaniasis visceral en el hombre, por tener una presentación de características sistémicas, la cual en los niños se presenta de manera súbita con vómitos, diarrea, fiebre y tos. En los adultos, se presenta con fiebre que dura de 2 semanas a 2 meses acompañada de síntomas inespecíficos como fatiga, debilidad y pérdida de apetito.

Esta enfermedad originalmente detectada en los niños, de ahí el nombre de infantum, se produce en muy pocos casos el contagio en humanos, y estas son fundamentalmente en personas con su sistema inmunitario deprimido (enfermos de SIDA, leucemia, etc.). En un individuo no inmunosuprimido, el sistema inmune es capaz de desarrollar una defensa muy activa frente al agente, provocando su inhibición o atenuación.

Como ya fue mencionado el reservorio de mayor importancia es el perro, en el cual la enfermedad debe denominarse Leishmaniosis, por presentar signología cutánea y sistémica. Es por este motivo que no debe recibir la misma denominación de Leishmaniasis visceral, a pesar de ser el mismo agente causal.

La interacción agente-vector-reservorio es absolutamente determinante para el desencadenamiento de la enfermedad, su transmisión y su mantenimiento como tal en el medio ambiente. Por ello, algunos autores prefieren hablar de "complejo etiológico", entendiendo por tal, cada uno de esos elementos con sus interrelaciones.

Etiología

Agente

Taxonomía de Leishmania

La *Leishmania*, descrita en 1903 por Leishman y Donovan en la India y simultáneamente por Wright, es un protozoo perteneciente al reino *Protista*, subreino *Protozoa*, phylum *Sarcomastigophora*, subphylum *Mastigophora*, clase *Zoomastigophora*, orden *Kinetoplastida*, familia *Trypanosomatidae*, género *Leishmania* (Green, 2008).

El género *Leishmania* se divide en los subgéneros *Leishmania* y *Viannia* según las diferencias de su desarrollo en los mosquitos. Se detectaron alrededor de 30 especies diferentes del organismo en varias regiones del mundo. Dentro de este grupo, 20 son responsables de un amplio espectro de enfermedades clínicas en el ser humano (Figura 1) (Green, 2008).

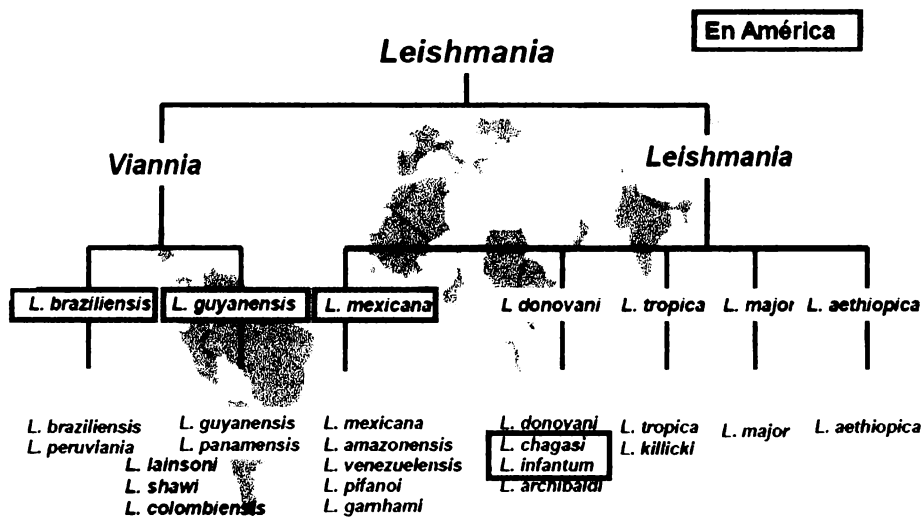


Figura 1. Taxonomía de Leishmania.
Fuente: modificado de Salomón, 2012.

Identificación y clasificación

No existen criterios morfológicos que permitan distinguir a las diferentes especies de *Leishmania*, ni a la observación microscópica convencional de los tejidos parasitados o de los cultivos, ni mediante el estudio de microscopía electrónica.

Por ello, se han propuesto múltiples criterios de identificación, unos extrínsecos, como la clínica, distribución geográfica y comportamiento en vectores o animales de laboratorio, y otros intrínsecos que analizan el fenotipo o el genoma del parásito.

Como criterios intrínsecos, se incluyen las dos técnicas bioquímicas de caracterización fenotípica más utilizadas: la caracterización de isoenzimas y los anticuerpos monoclonales.

La caracterización de isoenzimas se realiza mediante el estudio de la movilidad electroforética de dichas enzimas en cultivos de promastigotes de diferentes estirpes de *Leishmania*. Ello permite la caracterización de las mismas, según sus perfiles enzimáticos, en grupos taxonómicos electroforéticamente homogéneos llamados zimodemos. Es la técnica de referencia en la actualidad para la identificación de *Leishmanias* a niveles específicos e intraespecíficos (Gardener et al., 1974; Godfrey et al., 1979).

El uso de anticuerpos monoclonales contra antígenos específicos de género o de especie de *Leishmania*, permite identificar amastigotes en frotis y biopsias, o promastigotes en cultivos (McMahon Pratt et al., 1981 y 1986).

El uso actual de técnicas moleculares, particularmente la secuenciación genómica de *Leishmania*, permitirá completar y precisar las clasificaciones actualmente vigentes.

El desarrollo de la biología molecular, ha permitido la puesta en marcha de numerosas técnicas de identificación molecular, que permiten la identificación del genoma, de mayor sensibilidad y especificidad que las técnicas extrínsecas. Con este propósito se utiliza el aislamiento de fragmentos específicos de ADN mediante enzimas de restricción (RFLP), hibridación con sondas del ADN genómico y el ADNk del cinetoplasto y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con sus variantes RAPD (random amplified polymorphic DNA) y PCR-RFLP, que permite la identificación y diferenciación de estirpes genéticamente próximas (Dedet et al., 1999; Marfurt et al., 2003).

Así mismo, el vícerotropismo y dermatropismo siguen teniendo vigencia como criterios extrínsecos.

Algunas especies causan más de una forma de enfermedad. De todas ellas, la *L. donovani* (*L. archibaldi* en el este de Africa) y *L. infantum* (*L. chagasi* en el Nuevo Mundo), tienen un tropismo preferentemente visceral y el resto cutáneo o mucocutáneo. No obstante, algunas de estas especies víscerotrópicas pueden dar lugar a afectación exclusivamente cutánea (Green, 2008).

Podemos decir que la *L. chagasi*, agente de Leishmaniasis visceral en Sudamérica, es sinónimo de *L. infantum* en Europa sobre la base de distintos análisis genéticos (Solano-Gallego et al., 2009). La baja variabilidad genética de *L. chagasi* resulta consistente con una importación hacia el nuevo mundo y se cree que fue introducida por perros infectados provenientes de Europa (Green, 2008).

Características morfológicas del Protozooario

Las *Leishmanias* son parásitos digénicos, que se presentan bajo una forma intracelular, amastigote, que se encuentra dentro del mamífero huésped y una forma flagelada, promastigote, en el interior del vector.

Morfología del amastigote

Los amastigotes son redondeados u ovalados con 2 a 6 μm de largo y 1.5 a 2 μm de ancho, en los que se identifican un núcleo, un cinetoplasto puntiforme y un flagelo interno (ver anexo foto 1), éste último sólo visible al microscopio electrónico (M.E.). La tinción con las coloraciones Wright o Giemsa revela un citoplasma azul claro, mientras que el núcleo y cinetoplasto se tiñen de púrpura (Chang 1956; González González et al., 1976; Green, 2008).

Morfología del promastigote

Los promastigotes son alargados, de alrededor de 20 μm por 2-3 μm , con un núcleo central y un flagelo externo anterior, recubierto por una membrana plasmática y de longitud similar al cuerpo del parásito. Presenta un cinetoplasto, ubicado en el extremo anterior, en la proximidad del origen del flagelo (Chang 1956; González González et al., 1976; Dedet et al., 1999) (ver anexo foto 2).

Desde el punto de vista de su biología molecular y genética, debe señalarse que las *Leishmanias* tienen dos genomas, nuclear y cinetoplástico, este último equivalente al genoma mitocondrial de los mamíferos.

Vector

Taxonomía del vector

Los vectores de las Leishmaniasis son mosquitos del orden *Dipterae*, suborden *Nematocera*, familia *Psychodidae*, subfamilia *Phlebotominae* y géneros *Phlebotomus* (12 subgéneros) en el Viejo Mundo y *Lutzomyia* (25 subgéneros) en el Nuevo Mundo (Gil Collado et al., 1989).

Los dípteros son un orden de insectos neópteros caracterizados por sus alas posteriores que se han reducido a halterios, es decir que sólo poseen dos alas membranosas. Siendo los neópteros una agrupación taxonómica que incluye a casi todos los insectos alados, aquellos que pueden abatir sus alas sobre el abdomen, en contraste con los pertenecientes al grupo palaeóptera, cuyas alas permanecen desplegadas cuando el insecto está en reposo (Soulsby, 1992).

Nematóceros es un suborden de dípteros que se caracteriza por presentar largas antenas filiformes, multisegmentadas. En este grupo se incluye la mayoría de los dípteros conocidos como mosquitos (Soulsby, 1992).

El flebótomo es el único artrópodo que se adapta a la transmisión biológica de la *Leishmania* (Solano-Gallego et al., 2009).

La hembra del género *Phlebotomus* (viejo mundo) y *Lutzomyia* (nuevo mundo) es el principal vector de la Leishmaniasis (Solano-Gallego et al., 2009).

Existen muchas especies de *Lutzomyia*, pero sólo algunas de ellas actúan como vectores de la enfermedad, se detectaron unas 70 especies en diferentes regiones geográficas y nichos ecológicos capaces de transmitir la *Leishmania*. Algunas de estas se han adaptado a una especie de flebótomo, mientras que otros vectores pueden transmitir varias *Leishmanias* (Gil Collado et al., 1989; Green, 2008; Solano-Gallego et al., 2009).

La posibilidad de actuar como vector que puedan tener las distintas *Lutzomyias* parece estar relacionada con la capacidad de los promastigotes para unirse a los receptores de las células intestinales. Cuando no logran esta unión, los parásitos que en un principio se replicaron en el lumen del intestino son excretados en las heces de los mosquitos, y se presume que no alcanzan la masa crítica necesaria para infectar un huésped durante una segunda ingesta de sangre (Green, 2008).

Morfología del vector

Los flebótomos son insectos pequeños con una longitud corporal que rara vez excede los 3 mm (más pequeños que los *Culex* que pueden medir de 4-10 mm), de color variable, blanquecinos a casi negros, tres pares de patas muy largas, cuerpo y alas pilosos, éstas insertadas en el tórax, junto con los balancines o halterios. Cuando se posan, las alas ovaladas quedan en una posición de V sobre el cuerpo, de modo que parecen minúsculas polillas. La cabeza tiene dos ojos compuestos y probóscide transformada en aparato picador-chupador (Soulsby, 1992; García Almagro, 2004) (Ver anexo foto 3).

Un dato importante de su anatomía, como la de otros insectos hematófagos, es la existencia de dos glándulas salivares saculares, localizadas en el tórax, que vierten su secreción a través de conductos salivares que forman un canal a lo largo de la hipofaringe. En el momento de la picadura, los parásitos son inyectados en la dermis del huésped junto con la saliva del mosquito, lo cual tiene una gran trascendencia en la facilitación de la infección (García Almagro, 2004).

Ecología del vector

El mosquito se distribuye preferentemente en las zonas tropicales y subtropicales, encontrándose desde el Suroeste de Canadá hasta el norte de Uruguay (Salomón et al., 2011). En cuanto a la altura, su distribución va desde el nivel del mar hasta 3.300 m sobre el nivel del mismo (Lane et al., 1993; Killick-Kendrick et al., 1999).

Su rango de actividad es entre 15 a 28°C de temperatura ambiental, asociado a alto grado de humedad y ausencia de viento o lluvia. Por ello en algunos países de América Latina, presentan actividad durante todo el año, mientras que en otros su actividad se extiende desde primavera hasta el otoño (Solano-Gallego et al., 2009).

Los mosquitos adultos tienen actividad picadora crepuscular y nocturna (a diferencia del *Aedes Aegypti*, de actividad diurna), y, aparentemente, no se desplazan lejos de su entorno habitual. No viajan largas distancias y rara vez se dispersan a más de 2.5 km de su lugar de concepción. El vuelo es corto y silencioso, sólo unas pocas centenas de metros y su máxima velocidad alcanzaría al parecer no más de 1m/seg, como lo haría un volador saltante (Killick-Kendrick et al., 1986; Solano-Gallego et al., 2009).

Habitan en las zonas peridomiciliaria, aunque pueden adaptarse a ambientes modificados, incluyendo el interior de las casas. Durante las horas de inactividad se refugian en casas, bodegas, establos, huecos de las paredes, basureros, madrigueras de sus reservorios y vegetación (Killick-Kendrick et al., 1986; Soulsby, 1992; Solano-Gallego et al., 2009).

La mayor parte de los flebótomos entran a las casas por la noche por su fototropismo positivo, por lo que penetran en las viviendas iluminadas y actúan endofágicamente. Sin embargo algunas especies son preferentemente exofágicas, es decir, pican con más frecuencia en el exterior de las edificaciones (Killick-Kendrick et al., 1986).

Ambos sexos se alimentan habitualmente de fuentes de azúcar vegetal, como la savia, pero mientras que los machos son exclusivamente fitófagos, las hembras necesitan alimentarse también de sangre, nutrición proteica imprescindible para la producción de huevos. Por este motivo los machos no pican (Lane et al., 1993; Killick-Kendrick et al., 1986; Killick-Kendrick et al., 1999).

El periodo de vida del flebótomo en la naturaleza varía de 40 a 50 días. La hembra produce cientos de huevos al cabo de haber ingerido sangre. Los huevos son depositados en lugares oscuros o poco iluminados, húmedos, arenosos, con temperatura constante y ricos en material orgánico en descomposición, que permita la alimentación de las larvas al eclosionar (García Almagro, 2004). Esto constituye

una importante diferencia a destacar respecto a los hábitos de las hembras *Culex* y *Aedes Aegypti*, cuyos huevos sólo eclosionan en el agua, sus larvas se alimenta de materia orgánica presentes en la misma, hasta alcanzar el estado de pupa.

Desde el estado de huevo hasta la forma adulta es necesaria una temperatura superior a 15°C, para experimentar su desarrollo, de otro modo el embrión permanece dormido y no eclosiona. Esta metamorfosis transcurre en aproximadamente 30 a 60 días, en condiciones ideales (Soulsby, 1992).

Reservorios

Los huéspedes reservorios varían según las diferentes regiones geográficas y pueden incluir animales domésticos o salvajes (Green, 2008).

Es innegable hablar del perro como el reservorio más importante para la Leishmaniasis visceral, por existir un tropismo positivo del parásito en estos animales y su importancia en la salud pública (Solano-Gallego et al., 2009). Recordemos que no es el único animal doméstico capaz de transmitir la enfermedad, no olvidar el gato como posible fuente de infección en las áreas endémicas (Martín-Sánchez et al., 2007). Si bien son pocos los reportes de infección por *Leishmania* en los gatos, tenemos que tener en cuenta que los mismos, cursan la enfermedad mayormente bajo la forma asintomática.

También se ha confirmado la parasitación en la rata, gallinas y équidos, pero sólo como huéspedes accidentales, ya que no hay evidencia científica de que ellos puedan actuar como reservorios (Portus et al., 2002), por lo tanto carecen de valor epidemiológico.

Los canidos salvajes como el zorro y algunos marsupiales de nuestra región como la comadreja son animales capaces de albergar los amastigotes. Ambos con la capacidad de generar un nicho biológico posible de mantener latente siempre la enfermedad.

Importancia del perro como reservorio de la enfermedad en áreas endémicas

Los perros domésticos infectados con *L. chagasi (infantum)* ofician como el más importante reservorio de la enfermedad para personas en áreas donde la Leishmaniasis es endémica.

En los meses de inactividad del flebótomo, la supervivencia del parásito es mantenida por la infección en el perro, ya que la transmisión transovárica de la *Leishmania* no fue descrita en el vector (Solano-Gallego et al., 2009).

La susceptibilidad de los perros a la infección es variable según las razas y, parece ser que los animales más seleccionados son más susceptibles, mientras que los mestizos de zonas endémicas y algunas razas como los *Ibizian Warren Hound* han desarrollado cierto grado de resistencia (García Almagro, 2004). Solano-Gallego et al. (2000) en un estudio realizado en las Islas Baleares (Mallorca), zona endémica de España, informaron que esta raza de perros suele ser más resistentes a la

infección por *Leishmania*, encontraron que estos desarrollan una respuesta celular significativa a la infección.

El perro infectado puede permanecer asintomático, aunque altamente infectivo, o bien desarrollar la enfermedad, aumentando su capacidad de infectar a los flebótomos que se alimentan de él (Alvar et al., 2001).

La eliminación de perros seropositivos con el objetivo de disminuir la incidencia de Leishmaniasis en Brasil es discutible y varios reportes han afirmado que no es muy útil en la disminución de la infección humana o canina a largo plazo (Solano-Gallego et al., 2009).

Importancia del perro como reservorio de la Leishmaniasis en áreas no endémicas

La enfermedad puede ser diagnosticada en áreas no endémicas, en perros que han vivido o viajado a regiones endémicas (Solano-Gallego et al., 2009).

El aumento de perros que viajan o se importan como animales de compañía de áreas endémicas han planteado serias preocupaciones sobre la introducción de enfermedades transmitidas por vectores, tales como la *Leishmania* a áreas no endémicas (Solano-Gallego et al., 2009).

Los perros infectados en áreas no endémicas también pueden contribuir al mantenimiento del parásito dentro de una población canina, a través de la rara pero posible transmisión no vectorial de la infección (Solano-Gallego et al., 2009).

Importancia del gato como reservorio de la Leishmaniasis

La infección por *Leishmania* en gatos solo ha sido reportada ocasionalmente en la literatura científica. Sergent et al. (1912) encontró la primera infección en gatos. Algunos casos de *Leishmania* en felinos por *L. infantum* fueron descritos en Francia, Italia, España y más recientemente en Brasil.

Las características clínicas asociadas con *Leishmania* no son patognomónicas y pueden ser confundidas con muchas otras enfermedades más comunes de los gatos, que probablemente ha conducido a una subestimación considerable de esta condición. Además, los gatos pueden sufrir diferentes condiciones inmunosupresoras causadas por virus (ViLeF, ViF), que pueden favorecer la multiplicación del parásito.

Martín-Sánchez et al. (2007), sostiene la hipótesis que en áreas endémicas de *Leishmania* como España el gato puede actuar de reservorio, en lugar de huésped accidental, y ella se basa en:

1. El alto porcentaje de gatos parasitados (25.7%) vinculada a una seropositividad de 60%. La combinación de ambos datos, 70.6% de la población felina es, o podría ser infectada por *L. infantum*.

2. Los gatos se infectan por varios meses hasta que se curan espontáneamente (ningún gato incluido en este estudio sobrevivió sin tratamiento) o son curados con tratamiento específico o mueren quizás por causas no relacionadas directamente relacionadas al parásito.

3. Mientras que los gatos están infectados, ellos pueden ser picados por el mosquito, como lo muestran varios estudios sobre las preferencias alimentarias de estos insectos (Bongiorno et al., 2003; De colmenares et al., 1995) y ellos son infecciosos para vectores competentes (Maroli et al., 2006).

Ciclo biológico

El ciclo natural de la infección por *Leishmania* involucra a un mosquito vector y a un huésped vertebrado, en los cuales se desarrollan distintas formas del parásito (Green, 2008).

La enfermedad es transmitida de un huésped a otro por la picadura del mosquito durante la ingesta de sangre. Para alimentarse, la hembra del insecto vector pica al mamífero reservorio (el perro), generalmente en regiones con poco pelo, como ser el puente nasal, pabellón auricular, región inguinal y perineal. De este modo, los amastigotes de la sangre del huésped infectado pasan al tracto digestivo del mosquito y en el segmento anterior del intestino, fundamentalmente, se liberan de las células del huésped, sufriendo una serie de alteraciones morfológicas, transformándose en promastigotes flagelados extracelulares en 24-36 horas tras la picadura, para luego iniciar una rápida multiplicación (Sacks et al., 1985; Green, 2008; Solano-Gallego et al., 2009).

Dentro del tubo digestivo del vector, las características del promastigote van cambiando desde la fase de nectomona, sujeto a las microvellosidades del tubo digestivo, a la de promastigote infectivo o metacíclico, libre en la hipofaringe, pasando por una fase intermedia de haptomona (Figura. 2). Este proceso se conoce como metaciclogénesis y dura unos 10 días (Sacks et al., 1985).

Los promastigotes metacíclicos rellenan la faringe y probóscide del mosquito y permanecen allí hasta una nueva picadura, momento en el que serán inoculados con la saliva en la piel del nuevo huésped vertebrado cuando el mosquito hembra vuelve a alimentarse (Kamhawi et al., 2000; Green, 2008).

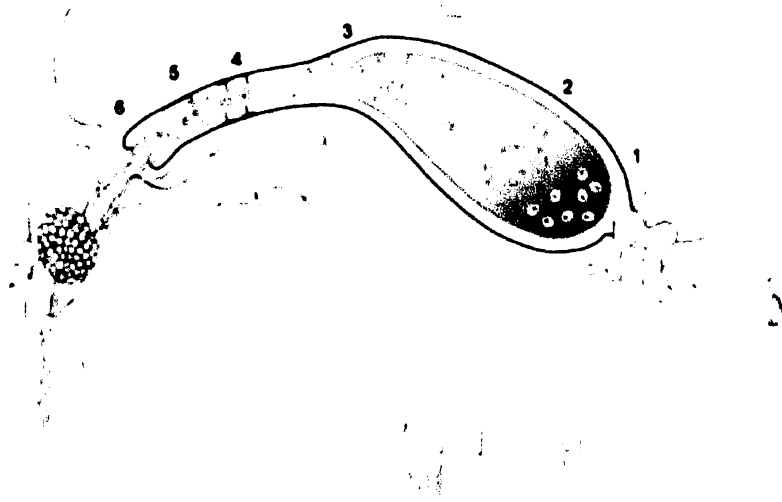


Figura 2: Metaciclologénesis en el vector.

- 1) Amastigote; 2) Promastigote procíclico; 3) Nectomona; 4) Haptomona; 5) Leptomona; 6) Promastigote metacíclico.

Fuente: modificado de Salomón, 2012.

Con cada picadura entran en la dermis entre 10 y 200 promastigotes metacíclicos, algunos de los cuales, probablemente, son destruidos por los leucocitos polimorfonucleares y eosinófilos, mientras que otros se adhieren a los receptores de superficie de los macrófagos y son fagocitados (Sacks et al., 1985).

Los macrófagos rodean el parásito en una vacuola fagosoma y trata de eliminarlo a través de una cascada a base de metabolitos del oxígeno como el óxido nítrico y la liberación de hidrolasas lisosomales vertidas en el interior de la vacuola parasitofora. La *Leishmania* evade las defensas no específicas para sobrevivir y multiplicarse en los macrófagos (Solano-Gallego et al., 2009).

Una vez dentro del macrófago, se va reduciendo el tamaño del flagelo y el cuerpo se va ovalando (paramastigote) hasta transformarse nuevamente en amastigotes, que vivirán en los fagolisosomas, o vacuolas parasitoforas del macrófago, que los separan de los mecanismos celulares de defensa del huésped. En estas estructuras, los amastigotes sobreviven y se multiplican por división binaria, hasta que el macrófago queda repleto de amastigotes, momento en el que se rompe y los parásitos pasan al espacio extracelular, donde serán nuevamente captados por otros macrófagos, infectando nuevas células del huésped, diseminándose desde el lugar de la picadura (Chang et al., 1956; Sacks et al., 1985; Green, 2008).

Viajan por todo el cuerpo del huésped, en especial a través de los órganos del sistema hemolinfático hacia áreas dérmicas remotas, hasta crear una infección generalizada (Green, 2008).

Los parásitos pueden ser ingeridos por otro flebótomo, cerrando así el ciclo.

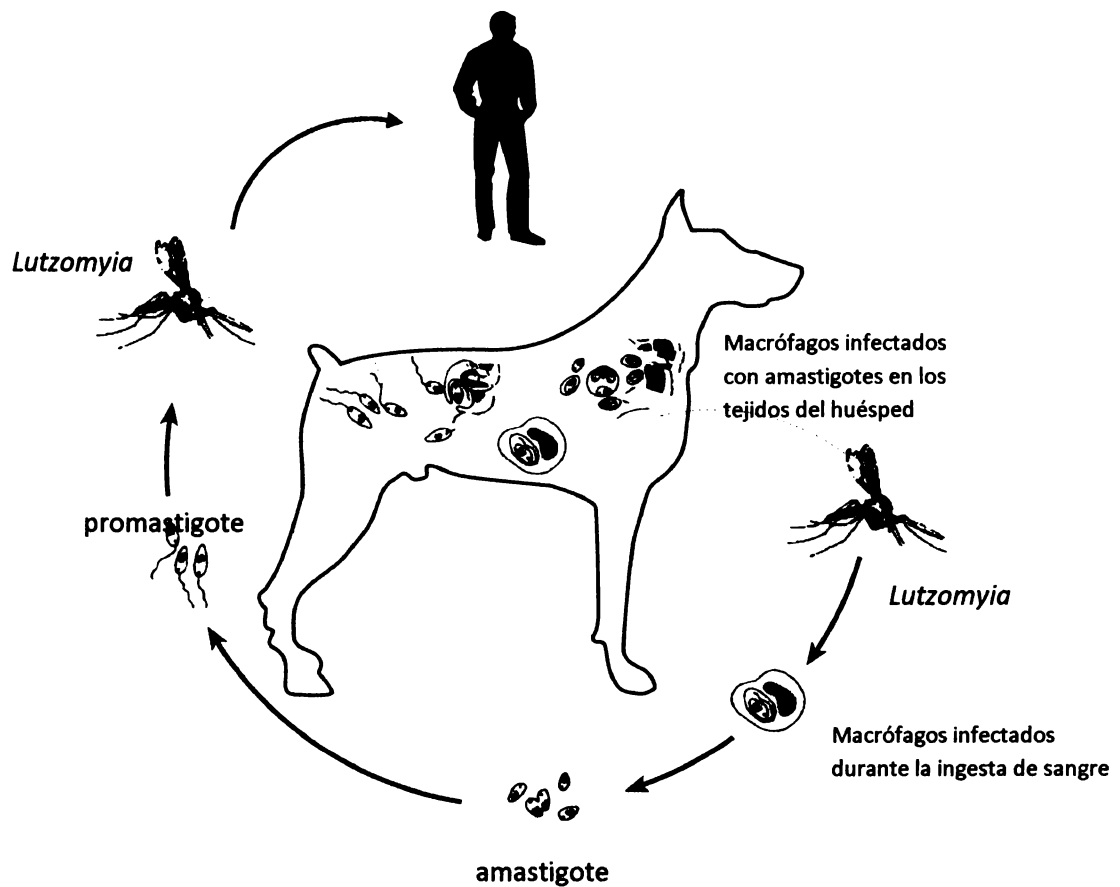


Figura 3: Ciclo biológico.

Fuente: modificado de www.malattiedeicani.it

Otras formas de transmisión

Transplacentaria

Si bien la Leishmaniasis se transmite naturalmente a través de las picaduras de mosquitos, se ha documentado la transmisión vertical intrauterina de la madre a sus crías, siendo la transmisión transplacentaria posible.

La literatura científica contiene raros reportes de casos de transmisión vertical en humanos. Low et al. (citado por Magno da Silva, 2009) describió el primer caso de *Leishmania visceral* en un recién nacido, donde la madre estaba enferma. Desde entonces algunos otros casos en seres humanos han sido reportados en varios países incluyendo Alemania, Sudan e India.

La posibilidad de transmisión transplacentaria de *Leishmania* fue confirmada por Rosypal y Lindsay (2005) que usó un modelo murino y sugiere que la frecuencia en ratones por esta ruta de transmisión sería muy baja.

De manera similar, se ha sugerido que la transmisión materna puede ocurrir en perros, lo cual fue demostrado en diversos estudios realizados.

Rosypal et al. (2005) utilizó hembras Beagle las cuales fueron infectadas experimentalmente con cepas LIVT-1 de promastigotes de *L. infantum* originalmente

aislados de una infección natural en Fox hound de Virginia (USA). Una de las cuatro perras quedo embarazada y fue capaz de mantener el embarazo, pero las otras tres o bien no concibieron o no lograron mantener su embarazo. Sus cachorros fueron extraídos por cesárea en el día 60 de gestación, los cuales fueron incapaces de respirar al nacer y murieron.

Muestras de hígado, médula ósea femoral, bazo, corazón, nódulos linfáticos, riñón y tejido placentario fueron colectados de los 3 cachorros remanentes para cultivo parasitario y PCR.

El ADN de *Leishmania* fue detectado por PCR en bazo, nódulo linfático y riñón de 2 cachorros al igual que en la placenta y tejido uterino de la madre. Este es el primer informe de la transmisión materna de una cepa de *Leishmania* de América del Norte en hembras infectadas en forma experimental.

Este artículo deja ver que la transmisión ocurre de forma transplacentaria, al eliminarse la posibilidad de contagio de los cachorros al evitar el transcurso del mismo por el canal de parto, ya que fue practicada la cesárea.

El primer reporte en Brasil de transmisión vertical de *Leishmania infantum* como punto de partida de la infección natural de una perra a sus hijos fue descrito por Magno da Silva et al. (2009). El caso reportado consistió en una Dogo Argentina de 36 meses con historial de infección con *L. infantum*. A lo largo del periodo de gestación, que se produjo normalmente, no presento signos clínicos de Leishmaniosis. Al día 68 ella fue examinada por ultrasonografía y se demostró la presencia de 2 cachorros, uno sin latidos cardiacos y el otro con sus latidos disminuidos. La cesárea fue indicada y trascendió que los 2 cachorros nacieron muertos. Muestras de útero y placenta de la madre, y muestras de piel de los oídos, hígado y bazo de los cachorros se tomaron, unas se fijaron en formol al 10%, y otras se procesaron por PCR e inmunohistoquímica (IHQ).

L. infantum se encontró en el bazo e hígado de los 2 cachorros, ambos por PCR e IHQ y en la placenta maternal por PCR. Estos resultados corroboran los de Rosypal et al (2005).

Tanto en los trabajos citados anteriormente Rosypal et al. (2005) y Magno da Silva et al. (2009) como en el realizado por Pangrazio et al. (2009), la transmisión transplacentaria fue demostrada por PCR.

Este último demostró por primera vez que la frecuencia de transmisión transplacentaria en hembras preñadas no difiere entre asintomáticas o sintomáticas, indicando que el estado clínico de las perras no es predictivo de su potencial de transmisión transplacentaria de *Leishmania*.

En este estudio 32% de los fetos y 49% de las placentas fueron PCR positivas. Este hallazgo soporta la moción que *Leishmania* es transmitida a la progenie sobre todo por la placenta en perros, y que la ruta transvaginal parece jugar un rol secundario. Esto último se afirma en algunos estudios que indicaron la ausencia de amastigotes en la mucosa vaginal de perras infectadas naturalmente (Silva et al. 2008).

A pesar de la ausencia de lesiones y detección de amastigotes en la placenta, ADN de *Leishmania* fue detectado en 49% de las placentas de ambos grupos de perras asintomáticas y sintomáticas. Lo que indica que aunque en cargas muy bajas, el organismo está a menudo presente. La placenta tiene una extremadamente alta irrigación sanguínea, que podrían llevar amastigotes, resultando en amplificación de ADN, aunque la ausencia de amastigotes en muestras teñidas con HE e inmunohistoquímica indican que la placenta no es probablemente un tejido diana para la infección de *Leishmania*, considerando que claramente sirve como una vía de transmisión a los fetos. Es de notar que el protocolo de PCR empleado en este estudio es extremadamente sensible, detectando hasta 0,0001 amastigote por reacción (Pangrazio et al., 2009).

Los caninos presentan una placenta del tipo endoteliocorial (Dyce, 1991) por lo que la circulación del parasito en la sangre de la perra y la irrigación de la placenta y anexos puede permitir el pasaje de *Leishmania* a través de la misma y en contacto directo con la circulación fetal, llevando a infección de los órganos y tejidos de los fetos (Rosypal et al., 2005; Magno da Silva et al., 2009).

Pangrazio et al. (2009) demostró que la distribución de amastigotes en los órganos fetales es similar a la observada postnatal o en perros adultos, con amastigotes distribuidos en su mayoría en órganos linforreticulares como son el bazo, médula ósea, nódulos linfáticos e hígado, en los cuales los amastigotes fueron observados en estos tejidos mediante la tinción con hematoxilina eosina (HE) e IHQ. Por lo que concluyó que la distribución de amastigotes es similar en los órganos fetales o perros adultos.

Por lo tanto cachorros nacidos de hembras infectadas deberían ser considerados potenciales reservorios y fuentes de infección de *Leishmania*. Si bien hay que tener en cuenta que la transmisión transplacentaria ocurre de la madre al feto, su incidencia es baja, donde posiblemente no todos los fetos de una camada al momento de nacer estén infectados, por lo cual en regiones endémicas esta forma de transmisión es de menor importancia, no así en aquellas regiones donde la enfermedad no existe y no hay presencia del vector.

Venérea

Silva et al. (2009) recientemente reportaron la transmisión venérea como vía alternativa de transmisión en ausencia del vector biológico.

El objetivo de este estudio fue investigar la posibilidad de transmisión venérea de *Leishmania* de perros machos naturalmente infectados a perras susceptibles libres.

Los perros fueron sometidos a recolección de semen por manipulación digital por lo menos 3 veces con rango de intervalo de 1 a 12 días. Las muestras de semen fueron procesadas por PCR. Basado en la presencia de ADN de *Leishmania* en el semen, 9 perros fueron seleccionados para aparearse con hembras susceptibles. 14 hembras serológicamente negativas fueron obtenidas en Barbacena, que son estados con no reporte de casos no autóctonos de *Leishmania* visceral. Estas hembras fueron colocadas en cuarentena por un mes previo al apareamiento. Ninguna de las 14 perras usadas en este estudio eran serológicamente,

parasitológicamente (punción de médula ósea) o PCR (sangre entera y punción de médula ósea) positivas a *Leishmania* hacia el final del periodo de cuarentena. 12 perras copularon con los perros infectados naturalmente que presentaban *Leishmania* en el semen, mientras que las otras 2 perras se mantuvieron en las mismas instalaciones, en las mismas condiciones, pero no copularon y sirvieron como controles. Durante el estro, las perras fueron destinadas a copular con 1 o más machos. Este diseño experimental fue un intento para reproducir el diseño sexual de perras callejeras que copulan varias veces durante el estro con diferentes machos.

Tres de las 12 perras que se aparearon, desarrollaron títulos serológicos entre los días 138 a 165 posteriores a la copula. De todas las perras se obtuvieron muestras de algunos órganos (vulva, vagina, cérvix, cuerno uterino, tuba uterina, ovarios, hígado, bazo, y nódulos linfáticos) para la realización de PCR, 6 de las 12 perras que copularon con perros infectados naturalmente fueron positivas y los animales controles fueron negativos.

Este estudio demostró que la transmisión de Leishmaniosis ocurrió en la ausencia del vector biológico.

Estudios previos demostraron que *L. chagasi* tiene un tropismo por el aparato genital canino, especialmente por el epidídimo, prepucio, y glande del pene, resultando en inflamación de estos órganos y presencia de amastigotes en el semen de perros infectados naturalmente (Diniz et al., 2005). Contrariamente, lesiones específicas no son observadas en el aparato genital de perras con Leishmaniosis (Silva et al., 2008).

Es importante destacar que el porcentaje de perros infectados que eliminan el organismo en el semen fue muy alto (86%) en el estudio realizado por Silva et al. (2009). Este estudio confirma que perros naturalmente infectados con *Leishmania chagasi* son capaces de eliminar los organismos en el semen tanto en perros sintomáticos como asintomáticos.

En conclusión, estos resultados previos (Diniz et al., 2005; Silva et al., 2008) junto con los datos reportados por Silva et al. (2009), soportan la moción que *L. chagasi* puede ser sexualmente transmitida de los perros infectados de forma natural a las perras susceptibles, en ausencia del vector biológico, además de que la transmisión venérea en perros es probable que sea unidireccional, preferiblemente de machos infectados a hembras susceptibles.

Transfusión sanguínea

La transmisión de la infección por sangre infectada en personas es de especial preocupación en zonas endémicas donde los donantes podrían ser portadores de la infección (Solano-Gallego et al., 2009).

En perros, la ocurrencia de transmisión del parásito de *Leishmania* por transfusión de sangre ha sido reportado (Owens et al 2001; De Freitas et al 2006).

Otros posibles vectores

Las garrapatas y pulgas han sido evaluadas como potenciales vectores de *Leishmania* pero no hay evidencia demostrada de que tengan un papel en la transmisión natural del protozooario (Green, 2008; Solano-Gallego et al., 2009).

Zanatta Coutinho et al. (2005) con el fin de evaluar el grado de infectividad de *Leishmania chagasi* en la garrapata, retiró de 21 perros que mostraban diversos síntomas de Leishmaniosis 39 ejemplares de *Rhipicephalus sanguineus*. Seis garrapatas dieron resultados positivos para *Leishmania* utilizando la técnica de PCR. Para determinar la infectividad de los parásitos, hámsters fueron inoculados por vía oral y peritoneal con macerados de las garrapatas. Después de 6 meses, los hámsters fueron sacrificados y se les practicó la necropsia tomándose muestras de suero para IFI, así como fragmentos de bazo e hígado para citología y PCR. Tanto este último como la IFI dieron resultado positivo en muchas de las muestras obtenidas.

Se ha probado que *Rhipicephalus sanguineus* posee organismos de *Leishmania* en sus intestinos luego de alimentarse de perros infectados, no obstante, su competencia como vector no ha sido confirmada (Green, 2008).

Patogenia

Con la picadura del flebótomo, los promastigotes de *Leishmania* se transfieren mediante la saliva del insecto a la piel del huésped vertebrado. Los promastigotes entonces son fagocitados por los macrófagos y se multiplican como amastigotes dentro de los fagolisosomas, que los separan de los mecanismos celulares de defensa del huésped. Cuando el macrófago se rompe, los amastigotes liberados penetran en otras células del huésped y se diseminan desde el lugar de la picadura. Viajan por todo el cuerpo del huésped, pero en especial a través de los órganos del sistema hemolinfático, hasta crear una infección generalizada (Green, 2008).

Tras la infección, por una parte, el huésped despliega su capacidad defensiva mediante la respuesta inflamatoria local y sistémica (respuesta de fase aguda) y la interacción de moléculas y células en lo que llamamos respuesta inmune adquirida y por otra parte, el parásito explotará al máximo sus posibilidades de infectividad y patogenicidad, para contrarrestar dichas defensas, eludiéndolas o anulándolas.

Hay dos factores relevantes en la eficiencia de la transmisión del parásito en relación con la picadura: el número de picaduras infligidas al huésped y la composición de la saliva del vector (García Almagro, 2004).

La frecuencia de las picaduras varía de una especie de flebótomo a otra y mientras unas se alimentan una sola vez para cada oviposición, otras se alimentan varias veces en días diferentes (Beach et al., 1985; Schlein et al., 1992).

En segundo lugar, la saliva del mosquito no sólo es capaz de provocar reacciones de hipersensibilidad retardada local, sino que tiene una serie de componentes proteicos con un determinante papel de interferencia en los mecanismos de defensa del huésped, como antiagregantes plaquetarios, vasodilatadores, inmunosupresores,

difusores y potenciadores de la infectividad del parásito. Entre estos factores están la apirasa, el maxadilán, la adenosina y su precursor 5'AMP, hialuronidasa y desintegrinas (Ribeiro et al., 1989; Ribeiro et al., 1999; Kamhawi, 2000).

Respuesta inmune innata y adquirida

La respuesta inmunológica innata o no específica es la primera línea de defensa que debe enfrentar el parásito cuando ingresa a un huésped susceptible. Uno de los mecanismos sugeridos a partir de los cuales los parásitos deprimen las defensas inmunológicas innatas del huésped involucra la capacidad de los amastigotes de sobrevivir y replicarse dentro de los fagolisosomas macrofágicos, al producir compuestos tales como los lipofosfogluanos, los cuales inhiben la maduración de los fagosomas (Green, 2008).

Una vez que los promastigotes se encuentran en la dermis se produce una reacción inflamatoria local, con acumulación de células de Langerhans, neutrófilos y eosinófilos inicialmente, seguidos de macrófagos, células natural killer (NK) y tardíamente linfocitos (Ramírez et al., 2006). Una parte de los promastigotes son eliminados en el espacio extracelular por neutrófilos y eosinófilos, otros son fagocitados por los macrófagos dentro de los cuales se multiplicarán bajo la forma amastigote.

La fagocitosis de los promastigotes está mediada por receptores de superficie específicos de los macrófagos (receptores del complemento CR3, CR1, CR2, CR4 o inmunoglobulinas que opsonizaron al parásito) y, de todos ellos, la fracción 3 del complemento parece jugar un papel predominante. Los ligandos de *Leishmania* para estos receptores son los glucoconjugados de su superficie como los lipofosfogluanos (LPG) y la gp63. Se piensa que estas y otras moléculas de superficie juegan algún papel en la supervivencia de las *Leishmanias* dentro de los fagolisosomas y su replicación (Gonçalves et al., 2004; Ramírez et al., 2006).

Las células de Langerhans están presentes en toda la dermis, son capaces de captar los antígenos de *Leishmania* y transportarlos hacia los nódulos linfáticos de drenaje. Carecen de función microbicida, pero son muy eficientes presentadoras de antígenos a los linfocitos T colaboradores (Tizard, 1998; Niederwieser, 2004; Abbas, 2008).

Para facilitar la comprensión de los mecanismos fisiopatológicos que configuran el desarrollo de la respuesta inmune adquirida, dividiremos esquemáticamente estos sucesos en distintas fases. No obstante, estos sucesos se imbrican muy pronto y esta división es sólo artificial.

La activación de los linfocitos T precisa de la función de las células presentadoras de antígeno (fundamentalmente las células de Langerhans) y de la interacción de los ligandos del linfocito con otros receptores de dichas células merced a moléculas coestimuladoras (interleucinas y moléculas de adhesión) que actúan sinérgicamente. En este punto tienen un papel fundamental los componentes de la respuesta inmune innata (complemento, células NK y macrófagos entre otros) (Abbas, 2008).

El antígeno de *Leishmania* procesado es presentado por las células de Langerhans y macrófagos, a la población de linfocitos llamada linfocitos T de helpers (Th) o colaboradores. Para esto las células presentadoras de antígenos se dirigen por los vasos linfáticos aferentes, hacia el nódulo linfático próximo (Hernández y Becker, 2006; Ramírez et al., 2006).

En el interior del macrófago las proteínas liberadas de los parásitos se asocian a las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH), que actúan como transportadoras de antígenos a la superficie del macrófago. Cuando los antígenos se asocian al CMH clase I, los antígenos son reconocidos por las células T del tipo CD8+ o citotóxicos (Tc) mientras que cuando se asocian a las de la clase II son reconocidos por las células T del tipo CD4+ o Th (Abbas, 2008).

Los linfocitos Tc son células que provocan la apoptosis celular al ser estimuladas por los antígenos presentados por el MHC clase I (Abbas, 2008).

La activación de las células Th permite establecer dos tipos de respuesta según se expresen las subpoblaciones T de helpers 1 (Th1) o T de helpers 2 (Th2) (Fig. 1). Esta activación está mediada por la presencia de diferentes interleucinas, producida por los macrófagos y otras células presentadoras de antígenos (Gállego y Riera, 2007; Ferrer c).

Para la activación de los Th1, es necesaria la presencia de interleucina-12 (IL-12), mientras que los Th2 necesitan interleucina-4 (IL-4) para su desarrollo. Ellas son determinantes del tipo de respuesta inmunitaria y del progreso o no de la infección (Ferrer c).

La IL-12 promueve la activación de la inmunidad celular mediante la activación de los linfocitos Th1, además de estimular la producción y citotoxicidad de las células Tc y de las células NK (Tizard, 1998; Niederwieser, 2004; Abbas, 2008).

La IL-4 participa en la regulación del sistema inmunitario en múltiples niveles. Entre otras funciones, promueve la diferenciación de linfocitos Th2, la proliferación y diferenciación de linfocitos B y es un potente inhibidor de la apoptosis (Abbas, 2008).

La inmunidad celular es fundamental en la defensa contra la *Leishmania* y está específicamente ligada a la función de los linfocitos Th1, mientras que la inmunidad humoral dada por los Th2 tiene un papel escaso y perjudicial. Dependiendo de las interleucinas que actúen en los primeros momentos de la infección, la respuesta se decantará hacia la protección (respuesta Th1) o a la progresión (respuesta Th2) (Figura 4) (Huaynates Orellana, 2009).

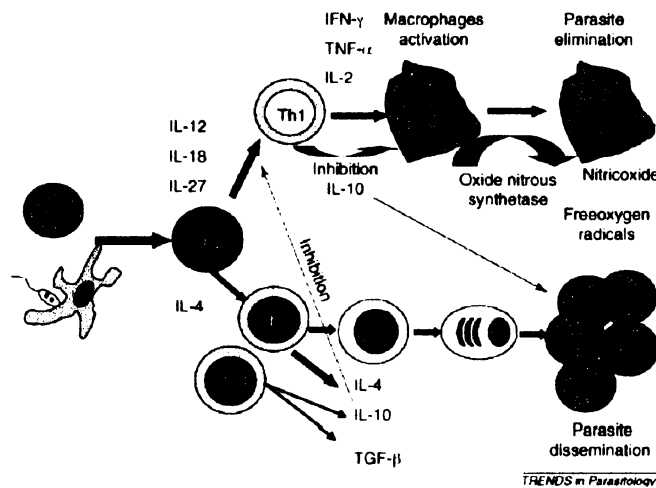


Figura 4: Respuesta Th1 y Th2.

Fuente: L. Ferrer (c).

Respuesta Th1 protectora

Las células Th1 producen principalmente interleucina-2 (IL-2), interferón gamma (IFN γ) y factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) durante las primeras horas que siguen a la estimulación por el antígeno y por la IL-12 (Ramírez et al., 2006).

Siendo la formación de IFN γ , el factor de activación de los macrófagos para matar a la *Leishmania* al determinar la producción de óxido nítrico por el macrófago y la posterior lisis del parásito. La producción de óxido nítrico es un potente y fundamental factor de defensa del macrófago activado y su inhibición por parte de las *Leishmanias* es totalmente determinante de la supervivencia de éstas (Ferrer c).

Respuesta Th2 no protectora

Las células Th2 secretan interleucinas 4, 5, 10 y 13 varios días después de la exposición al antígeno.

La IL-10 influye en la progresión de la enfermedad al tener un efecto antagónico sobre los macrófagos al hacerlos refractarios o poco susceptibles a la activación por el IFN γ , logrando que no se activen, dando por resultado la inhibición de la lisis del parásito al impedir la producción de óxido nítrico por el macrófago (Miles et al., 2005; Hernández y Becker, 2006).

La IL-4 estimula la proliferación de linfocitos B y la secreción de inmunoglobulinas principalmente IgG, las cuales no solo fallan en proteger contra el agente patógeno de localización intracelular, sino que contribuye a la progresión de la enfermedad. Esta hiperreactividad de células B inducida por la IL-4 conduce a la hipergammaglobulinemia policlonal y a altos títulos de anticuerpos anti-leishmania, generando una respuesta perjudicial en lugar de protectora para el huésped (Ferrer c).

También pueden producirse con frecuencia autoanticuerpos que pueden asociarse con el desarrollo de fenómenos patológicos como trombocitopenia y anemia inmunomediadas (Ferrer c).

Otro peligro potencial frente a la exuberante acción de los linfocitos B es la producción de grandes cantidades de complejos inmunológicos circulantes (CIC). El depósito de estos en las paredes de los vasos sanguíneos puede causar vasculitis, poliartritis, uveítis y glomerulonefritis. La vasculitis sistémica puede provocar la isquemia local que causa necrosis cutánea y visceral y, si bien es raro, también afectación del sistema nervioso (Ferrer c).

En los perros, el depósito de CIC en los riñones causa falla renal, que es la mayor causa de muerte en perros con Leishmaniosis (Green, 2008).

Manifestaciones clínicas

La Leishmaniosis canina es una enfermedad sistémica crónica, capaz de englobar una variada gama de manifestaciones, o inclusive cursar de forma asintomática.

Los principales hallazgos clínicos encontrados en el examen físico clásicamente incluyen, pérdida progresiva de peso, linfadenomegalia, esplenomegalia, onicogriposis, lesiones dermatológicas, atrofia muscular, intolerancia al ejercicio, letargia, poliuria-polidipsia, claudicación, vómitos, diarrea y epistaxis (Solano-Gallego et al., 2009).

Las lesiones cutáneas son las manifestaciones más comunes de la Leishmaniosis canina, con una incidencia del 56 al 90% (Green, 2008).

El animal puede presentar trastornos dermatológicos sin otros signos obvios de enfermedad. Estos pueden variar en características y extensión, pero rara vez son pruriginosos (Green, 2008).

La mayoría de los perros pueden desarrollar únicamente dermatitis descamativa. La alopecia puede ser generalizada o localizada, pudiendo comenzar en la cabeza, abarcando la región periocular y orejas, o extenderse al resto del cuerpo y extremidades (Scott, 2002).

Un hallazgo bastante específico es el desarrollo excesivo de las uñas (onicogriposis) y la presencia de vasculitis en los márgenes auriculares (Scott, 2002).

Algunos animales con la enfermedad más avanzada sufren dermatitis ulcerativa en sitios de prominencias óseas, al igual que en uniones muco-cutáneas, nariz y patas (Scott, 2002).

Con menor frecuencia se desarrollan dermatitis nodular focal o multifocal (Solano-Gallego et al., 2009).

Atípicas manifestaciones cutáneas tal como despigmentación, paniculitis, hiperqueratosis nasal y digital se pueden observar (Solano-Gallego et al., 2009).

Los signos más comunes de afección general son pérdida de peso, con o sin apetito y atrofia muscular marcada. Hay reducción de la actividad física asociada a debilidad y trastornos locomotores. Estos últimos pueden estar causados por poliartritis erosivas o no erosivas, lesiones óseas osteolíticas y osteoarticulares con periostitis proliferativa, neuralgia, polimiositis, hendiduras en las almohadillas y úlceras interdigitales (Solano-Gallego et al., 2009).

Con frecuencia se presenta linfadenomegalia generalizada, estos tienen de 2 a 6 veces su tamaño normal, por lo que en ocasiones semejan los hallazgos clínicos del Linfosarcoma. También suele detectarse esplenomegalia a partir de la palpación abdominal, la cual debe ser confirmada por ecografía (Green, 2008).

Alrededor del 20 al 40% de los perros diagnosticados presentan lesiones oculares que incluyen conjuntivitis, blefaritis, queratoconjuntivitis ya sea común o seca y uveítis anterior, granulomatosa o linfoplasmocítica. En algunos casos, los trastornos oculares constituyen el único signo clínico. Consecuencias oculares de hipertensión sistémica (desprendimiento de retina e hifema) se ve en solo el 5,7% de los perros con Leishmaniosis (Green, 2008; Solano-Gallego et al., 2009).

La epistaxis también puede aparecer en conjunto con otros trastornos típicos o bien ser el único signo de Leishmaniosis (Green, 2008).

La temperatura rectal puede fluctuar, pero suele ser normal o estar en valores subfebriles, no siendo un signo importante de la enfermedad (Green, 2008).

En etapas avanzadas de la enfermedad puede aparecer falla renal crónica, complicando aun más el cuadro clínico y esto llevar a anorexia, depresión mental, poliuria, polidipsia, vómitos, diarrea y ser la principal causa de muerte.

La falla renal dada por la glomerulonefritis y nefritis tubulointersticial son los hallazgos patológicos más comunes, mientras que la amiloidosis es muy rara. La glomerulonefritis es frecuentemente asociada a depósitos de inmunocomplejos en los glomérulos y es principalmente membranoproliferativa o mesangioproliferativa (Solano-Gallego et al., 2009).

Se ha presentado además trombosis como consecuencia de un síndrome nefrótico causado por la glomerulonefritis. Puede haber signos causados por la coagulación intravascular diseminada o sus complicaciones.

La enfermedad renal puede ser el único signo clínico, por lo cual perros de áreas endémicas con este trastorno deben ser evaluados por Leishmaniosis.

La inmunosupresión puede promover la aparición de infecciones concomitantes; por lo tanto, el cuadro clínico puede complicarse con patologías tales como demodicosis, piodermia superficial o profunda, enfermedad gastrointestinal y neumonía (Green, 2008).

Son comunes las infecciones combinadas con Ehrlichia, Babesia, Hepatozoon, Trypanosoma y Dirofilaria cuando se presenta Leishmaniasis en regiones donde aquellos organismos también son endémicos (Green, 2008).

Formas clínicas poco comunes incluye hepatitis crónica, pancreatitis, colitis crónica recidivante, enfermedad neurológica debido a meningitis y miositis atrófica del musculo masetero o polimiositis, desordenes autoinmunes, y desordenes cardiovasculares como pericarditis, taponamiento pericárdico, vasculitis sistémica y tromboembolismo (Green, 2008; Solano-Gallego et al., 2009).

Basado en los signos clinicopatológicos, en el grado de afección renal y según el título serológico presente, Ferrer (d) clasifica a la enfermedad en cuatro estadios clínicos:

- I. Estadio I: enfermedad leve con mínimas alteraciones clinicopatológicas, sin enfermedad renal y con bajos niveles de anticuerpos.
- II. Estadio II: enfermedad moderada con signos clinicopatológicos y mínimo daño renal.
- III. Estadio III: enfermedad grave, con signos clinicopatológicos y enfermedad renal.
- IV. Estadio IV: enfermedad muy grave, con daño renal irreversible.

Diagnóstico

Para arribar al diagnóstico de Leishmaniosis en un paciente se debe tener en cuenta un gran número de factores. Comenzar con una minuciosa anamnesis, signos clínicos en caso de estar presentes y la realización de diferentes métodos paraclínicos que ayudan a conocer el estado general del paciente. Seguido por determinación de anticuerpos anti-leishmania e identificación del parásito, ya sea por visualización directa del mismo, o métodos moleculares.

Hallazgos de laboratorio

Los hallazgos en el hemograma y bioquímica de un paciente que padece la dolencia, no es de gran utilidad para el diagnóstico, ya que no muestran alteraciones patognomónicas.

Con frecuencia suele detectarse anemia no regenerativa de leve a moderada; en casos más excepcionales, se encuentra anemia hemolítica no regenerativa causada por mecanismos inmunomediados (Green, 2008).

Hallazgos menos consistentes son la trombocitopenia, leucocitosis leve o leucopenia; sin embargo, se informa con frecuencia la presencia de linfopenia en perros con Leishmaniosis (Green, 2008; Solano-Gallego et al., 2009).

Los hallazgos bioquímicos más contundentes en el suero de perros con Leishmaniosis clínica son la hiperproteinemia con hiperglobulinemia e hipoalbuminemia, como resultado de una reducción en la relación albúmina/globulina (Green, 2008).

En los casos de hiperglobulinemia marcada sin causa aparente, en perros provenientes de áreas endémicas o en aquellos que hayan viajado a tales regiones, debe investigarse la posibilidad de Leishmaniosis (Green, 2008; Solano-Gallego et al., 2009).

Una leve elevación en la actividad de las enzimas hepáticas es frecuente, pero rara vez se encuentra un incremento marcado (Green, 2008).

En la mayoría de los perros se desarrolla proteinuria persistente y azoemia renal; debido a glomerulonefritis y falla renal progresiva, en la etapa terminal de la enfermedad (Green, 2008; Solano-Gallego et al., 2009).

Pruebas serológicas

El diagnóstico de *Leishmania*, puede ser hecho por la detección de anticuerpos específicos anti-leishmania en suero (principalmente IgG y especialmente IgG1 e IgG2), usando técnicas serológicas cuantitativas como es la Inmunofluorescencia indirecta (IFI) o ELISA, siendo estas dos las técnicas más comúnmente usadas. Existen otros métodos serológicos para detectar anticuerpos en suero, entre los cuales se incluyen, las pruebas de aglutinación directa y el Western Blotting, esta última ha demostrado ser óptima para el diagnóstico, sin embargo no se utiliza de forma habitual por razones de tiempo de realización y costo económico (Ferrer et al., a).

Para la utilización e interpretación de estas técnicas se debe tener en cuenta que la producción de anticuerpos o seroconversión se desarrolla durante los meses siguientes al momento de la infección, siendo la media de unos 5 meses (intervalo: 1-22) para la infección natural (Ferrer et al., a). Los anticuerpos se presentan por lo general mucho antes de que aparezcan los signos clínicos de la enfermedad, debido al relativo largo periodo de incubación, por lo tanto perros asintomáticos infectados que de apoco muestran el desarrollo de la enfermedad suelen ser seropositivos, mientras algunos perros permanecen seronegativos por periodos variables después de ser infectados (Green, 2008).

Altos niveles de anticuerpos está asociado con alta parasitemia y por ello enfermedad. En un perro con signos de enfermedad, el resultado positivo de un título de anticuerpos sustenta de forma contundente un diagnóstico preliminar. Los anticuerpos en perros con signos clínicos de Leishmaniosis muy rara vez son indetectables (Green, 2008; Solano-Gallego et al., 2009).

Sin embargo, un título positivo bajo puede detectarse en animales que han estado expuestos pero que no desarrollaron la enfermedad, en los portadores asintomáticos permanentes, o en aquellos luego de un tratamiento satisfactorio. En presencia de estas circunstancias es preferible repetir el test aproximadamente a las 4-6 semanas para determinar si se trataba de un título residual que va decreciendo o de una infección activa en progreso (Solano-Gallego et al., 2009).

A estas dificultades de encontrar un test de sensibilidad y especificidad de 100% se une el hecho que ninguno de estos test, con la posible excepción del Western Blotting, permite el seguimiento de la evolución de la enfermedad de una forma eficaz (Ferrer et al., a).

En aquellos casos en que la serología no es concluyente, se recomiendan métodos adicionales de detección, como el PCR.

Inmunofluorescencia indirecta

La Inmunofluorescencia indirecta (IFI) se realiza colocando el suero del paciente a examinar en portas donde están presentes promastigotes de *Leishmania*. Los anticuerpos eventualmente presentes se fijan a los promastigotes y la positividad se evidencia utilizando anti-anticuerpos fluorescentes. También hace posible determinar el título de anticuerpos utilizando diluciones seriadas del suero a examinar (Ferrer et al., a).

La sensibilidad y la especificidad de la IFI son cercanas al 100% y por este motivo es la prueba considerada de referencia por la Organización Internacional de Epizootias. Sin embargo, en esta prueba el componente subjetivo del operador es más elevado, ya que la lectura de fluorescencia es realizada por un técnico utilizando un microscopio de fluorescencia. La variabilidad de los resultados, por lo tanto es muy elevada (Ferrer et al., a).

Enzimoinmunoensayo

Para realizar esta prueba, el suero a examinar se coloca en un micro-pocillo recubierto con antígenos de *Leishmania*. En caso de positividad, se aprecia una reacción colorimétrica cuantificable mediante espectrofotómetro y, por tanto, no sujeta a una variabilidad subjetiva ligada al operador (Ferrer et al., a).

Es una prueba con una especificidad y sensibilidad media-alta (70-100%). La sensibilidad es mucho más elevada si se utilizan múltiples antígenos de *Leishmania*, con lo que aumenta el número de lugares donde se pueden fijar los eventuales anticuerpos presentes en el suero (Ferrer et al., a).

La sensibilidad y especificidad del ELISA depende del antígeno empleado, que incluye extracto soluble de promastigote y proteínas purificadas o recombinantes (rK9, rK26 y rK39) (Green, 2008; Solano-Gallego et al., 2009).

Al utilizar el parásito entero como antígeno se puede obtener resultados falsos positivos debido a reacción cruzada con otras especies de *Leishmania*, o con otros patógenos. Esto ha sido bien descrito en regiones donde existe la presencia de *Trypanosoma cruzi*, principalmente en norte, centro y sur América. La reacción cruzada es menos probable que ocurra cuando se utilizan péptidos recombinantes (Green, 2008; Solano-Gallego et al., 2009)

Cuando hablamos de ELISA e IFI, es oportuno asegurarse que el laboratorio realiza titulaciones "end point" (punto de corte) es decir, hasta la última dilución positiva y no simplemente hasta un predeterminado valor de positividad. Debido que no siempre hay una correlación directa entre la gravedad de los signos clínicos y el título de anticuerpos (sobre todo para valores medios-bajos), los títulos de anticuerpos permiten diferenciar a los perros infectados pero no enfermos, que tienden a tener títulos bajos, de los perros infectados y enfermos, que tienden a tener un título de anticuerpos alto. La definición de título "bajo" o "alto" va siempre relacionada con la zona de corte de cada laboratorio para su positividad (Ferrer et al., a).

La mayor parte de laboratorios considera negativos a perros con títulos IFI inferiores a 1:40, positivos aquellos con títulos iguales o superiores a 1:80 y dudosos los títulos entre 1:40 y 1:80. Algunos laboratorios usan otras zonas de corte, con lo que es oportuno (sobre todo en los casos donde se quiera verificar un aumento o una disminución del título) hacer siempre referencia al mismo laboratorio. En cada caso, visto el alto coeficiente de variación intra-test que caracterizan a todas estas pruebas serológicas, es oportuno considerar como "alto" sólo los títulos que superan al menos en 4 veces el valor que tiene el laboratorio de referencia como zona de corte (por ejemplo, si el laboratorio considera "positivo" un título igual o superior a 1:80 se considera "alto" un título superior a 1:640) (Ferrer et al., a).

La presencia de un positivo, en cualquiera de estas pruebas, no indica la presencia de infección activa. No hay que olvidar que puede tratarse de un residuo de una antigua infección, ya controlada por el sistema inmunitario. Sin embargo, está claro que cuando los títulos son altos, las posibilidades de falsos positivos disminuyen, pero siempre dependiendo de los límites establecidos para cada técnica (Ferrer et al., a).

Western Blotting

La técnica del Western Blotting también es llamada Inmunoblotting, debido a que se utilizan anticuerpos para detectar el antígeno o los antígenos específicos de interés. Es una técnica analítica que detecta proteínas específicas en una muestra determinada. Por lo tanto ella es capaz de detectar que proteína del parásito tiene mayor poder antigénico (Técnica Western...).

El primer paso del Western Blotting es la separación de las macromoléculas (cadenas peptídicas) mediante geles de electroforesis; después de la misma, las macromoléculas ya separadas en función de su diferente peso molecular se transfieren a una segunda matriz, generalmente una membrana de nitrocelulosa. Este proceso es necesario ya que todas estas macromoléculas están embebidas dentro de la matriz que forma el gel, lo que imposibilita realizar su detección, mientras que en la membrana, se encuentran accesibles al estar adheridas sobre la superficie de la misma (Técnica Western...).

Esta transferencia, se basa en la movilidad electroforética de las proteínas para transferirlas desde el gel hasta la membrana, e implica poner en contacto directo el gel de poliácridamida conteniendo las proteínas con la membrana de nitrocelulosa y al aplicar el campo eléctrico, las proteínas migran fuera del gel hacia la superficie de la membrana donde quedan fuertemente adheridas, por lo que la membrana resultante es una copia exacta del patrón de proteínas que se tenía en el gel de poliácridamida (Técnica Western...).

Posteriormente, se bloquea los sitios de unión de la membrana sin reaccionar con el antígeno para evitar la unión. En la actualidad se utilizan una amplia variedad de tampones de bloqueo, desde la simple leche o suero hasta proteínas altamente purificadas. Estos tampones de bloqueo, lo que hacen es incrementar la sensibilidad del ensayo reduciendo la interferencia por el ruido de fondo (background) (Técnica Western...).

En el siguiente paso, se agrega el anticuerpo específico marcado con una enzima, el cual se unirá a dicha proteína transferida y finalmente, se añade un sustrato apropiado para dicha enzima con lo que se produce un producto detectable como, por ejemplo, un precipitado cromogénico o fluorogénico en la membrana (Técnica Western...).

La especificidad de la unión antígeno – anticuerpo permite la detección de una única proteína dentro de una mezcla compleja de otras proteínas, la cual puede ser detectada tanto por métodos directos como indirectos (Técnica Western...).

En el método directo de detección, el anticuerpo primario que se utiliza para detectar el antígeno sobre la superficie de la membrana, debe ir marcado con una enzima o sonda fluorescente (Técnica Western...).

En el método indirecto, se añade primero un anticuerpo primario sin marcar contra el antígeno de la superficie de la membrana; posteriormente se añade un anticuerpo secundario marcado contra el anticuerpo primario (Técnica Western...).

Esta técnica de diagnóstico es utilizada en esta enfermedad con el objetivo de investigación, no así como técnica diagnóstica de rutina, por requerir mayor tiempo de procesamiento, en comparación con otras ya mencionadas anteriormente.

Prueba de inmunocromatografía indirecta (Test rápidos)

La prueba de inmunocromatografía indirecta es de muy fácil realización y se puede llevar a cabo en la propia clínica veterinaria o ambulatorio, con esta técnica se determina la presencia o no de anticuerpos frente a *Leishmania*, pero es de una eficacia diagnóstica inferior a las técnicas de ELISA e IFI (Ferrer et al., a).

Varios kits de pruebas rápidas son comercializados en diferentes países, Speed Leish K, Speed Duo Leish/Ehrli, Test Leish, Ingezim Leishmacrom, SensPERT Leishmania test kit entre otros.

El kit consiste en una membrana de nitrocelulosa que tiene una almohadilla absorbente en un extremo, una banda de anticuerpo inmovilizado anti-proteína A en el otro, para detectar IgG (zona de control) y una banda de antígeno en el centro (zona de prueba). Se emplea un conjugado proteína-A-oro coloidal como reactivo de detección inmunocromatográfica. Se coloca una pequeña gota (20 µl) del suero a examinar sobre la almohadilla absorbente antes de añadir dos gotas mayores (100 µl) del tampón de la prueba y se deja que la mezcla emigre por la tira mediante capilaridad (Manual de OIE, 2008).

A la membrana de nitrocelulosa se encuentra fijado el antígeno, que puede estar formado por promastigotes formalizados, o por antígeno recombinante como es el rK39 (Manual de OIE, 2008).

Tras 2 a 10 minutos, se puede leer la reacción, el resultado es positivo si aparecen dos líneas rojas definidas (una en la zona de la prueba y otra en la zona del control),

es negativo cuando no aparece la línea roja en la zona de la prueba, y se considera inválido si no aparece ninguna línea en la zona del control (Manual de OIE, 2008).

Antiguamente el antígeno utilizado estaba formado por promastigotes obtenidos en cultivos de *Leishmania infantum*, pero en los últimos tiempos ha sido sustituido por el antígeno recombinante rK39 para dotar de una mayor especificidad a la prueba (Manual de OIE, 2008).

En el caso de resultado positivo, el límite lo tiene en que es una técnica cualitativa y no cuantitativa, por tanto no permite valorar el título de anticuerpos, que es interesante para identificar los perros con diseminación del parásito y la monitorización del paciente. Siempre que sea positivo se recomienda realizar una prueba cuantitativa de anticuerpos para seguir adecuadamente la respuesta al tratamiento (Ferrer et al., a).

La especificidad es media-alta pero la sensibilidad es baja (30-70%) y por tanto nos puede dar resultados falsos negativos. En estos casos, si persiste una fuerte sospecha diagnóstica, se recomienda utilizar alguna de las otras técnicas (Ferrer et al., a).

Identificación del organismo por microscopia

Uno de los métodos para alcanzar el diagnóstico definitivo se basa generalmente en la identificación citológica o histológica de los amastigotes (libres o contenidos en macrófagos) en frotis con tinción de rutina (Green, 2008).

La especificidad de estos métodos alcanza casi el 100%; sin embargo, según el tiempo que se destine a la búsqueda de parásitos y la experiencia del operador, su sensibilidad máxima es de aproximadamente 80% en perros con signos clínicos de enfermedad y menor en aquellos seropositivos asintomáticos (Green, 2008).

Estudio Citológico

Es un procedimiento sencillo y útil, consistiendo en la observación al microscópico del frotis tras la punción-aspiración con aguja fina, para comprobar la existencia de amastigotes (García Almagro, 2004).

Las muestras pueden ser tomadas del bazo uno de los órganos de mayor sensibilidad para el diagnóstico, con el inconveniente de ser un órgano no muy práctico de puncionar. En regiones endémicas es poco útil para ser utilizados en una población grande de animales. Por ello es preferible utilizar los nódulos linfáticos como primera opción, seguido de la médula ósea o viceversa (Green, 2008; Solano-Gallego et al., 2009).

Los nódulos a ser puncionados involucran cualquiera de los superficiales, teniendo en cuenta que la propia enfermedad se presenta con linfadenomegalia. Ahora si la punción es realizada en un animal sin linfadenomegalia, el nódulo más utilizado para la punción es el poplíteo (Green, 2008; Solano-Gallego et al., 2009).

Las muestras de médula ósea pueden ser extraídas desde costilla, esternón, fémur y cresta ilíaca (Green, 2008; Solano-Gallego et al., 2009).

Una vez obtenida la muestra mediante la punción de los órganos mencionados anteriormente se confecciona un extendido, para con posterioridad ser teñido mediante la técnica rápida de Diff- Quik o la tinción con MayGrünwald-Giemsa, las cuales permiten ver los amastigotes, como cuerpos redondeados u ovals, de color azul claro, con un núcleo y un cinetoplasto puntiforme, ambos de color púrpura, en el interior de su citoplasma (García Almagro, 2004).

La búsqueda de amastigotes por citología puede ser infructuosa debido al bajo o moderado número detectable de parásitos presentes incluso en perros con la enfermedad clínica completa (Solano-Gallego et al., 2009).

Este método de diagnóstico que nos puede confirmar la existencia de la enfermedad, presenta las ventajas de ser rápido, poco oneroso y no es necesario un equipamiento muy sofisticado por lo cual puede ser realizado directamente en el consultorio veterinario. Su desventaja radica principalmente en tener un técnico idóneo adiestrado en la visualización del parásito.

Estudio Histopatológico

La histopatología es un método únicamente utilizable en los pacientes que manifiesten lesiones dermatológicas compatibles con la entidad, o de muestras extraída post mortem, a partir de nódulos linfáticos, bazo u otros órganos afectados (Green, 2008; Solano-Gallego et al., 2009).

Luego de procesar las muestras, los amastigotes de *Leishmania* deben verse en el interior de los macrófagos y/o en el espacio extracelular para confirmar la presencia de la enfermedad, más allá de encontrar alteraciones inespecíficas en los tejidos que pueden o no ser compatibles con la Leishmaniosis (Green, 2008; Solano-Gallego et al., 2009).

Reacción en cadena de la polimerasa o PCR

La PCR es uno de los métodos de mayor sensibilidad (92-98%) y especificidad (100%) para la detección de Leishmaniosis en perros (Green, 2008; Solano-Gallego et al., 2009).

La prueba puede realizarse a partir de muestreo de tejidos, sangre y fluidos biológicos. Las obtenidas de médula ósea, nódulos linfáticos, bazo o piel dan más sensibilidad y especificidad para el diagnóstico en comparación con las extraídas de sangre entera, semen y orina (Solano-Gallego et al., 2009).

PCR de aspirado de nódulos linfáticos y médula ósea ha demostrado ser más sensible que la detección microscópica de amastigotes en frotis teñidos (Solano-Gallego et al., 2009).

Es importante destacar que la información proporcionada por PCR no debería ser separada de los datos obtenidos de la clínica-patológica y de la evaluación serológica (Solano-Gallego et al., 2009).

La interpretación de resultados de PCR debe tomarse con mucha cautela en perros asintomáticos. Por ejemplo, con el propósito de identificar perros infectados e

impedir la importación a zonas no endémicas, donde la infección puede propagarse a través de flebótomos vectores, o impedir la transmisión vertical (Solano-Gallego et al., 2009).

No es una técnica utilizada de rutina en perros en zonas endémicas, por el equipamiento necesario para la realización del mismo y su alto costo. Si es la técnica más fiable para utilizar con fines de investigación.

Se la utiliza de rutina en humanos en regiones endémicas con propósitos de diagnóstico, estudios epidemiológicos y en el control de donantes de sangre (Green, 2008).

En la actualidad para el diagnóstico y evolución de posibles tratamientos existen dos técnicas disponibles, el PCR convencional y en tiempo real (Solano-Gallego et al., 2009).

PCR convencional

El PCR convencional nos permite detectar elemento genómicos (ADN o ARN) de un patógeno específico. El escaso número de copias de material genético de ciertos patógenos, ha llevado al desarrollo de métodos de amplificación de ácidos nucleicos, para aumentar la sensibilidad de los mismos.

El PCR es uno de los métodos que ha revolucionado la tecnología moderna y es utilizado tanto para estudios de enfermedades infecciosas como genéticas.

La técnica de PCR se basa en la amplificación in vitro de ADN. Brevemente la misma consiste en determinar una región del ADN a amplificar, por medio de secuencias (primers o cebadores) específicas que reconocen la región. Mediante ciclos consecutivos a diferentes temperaturas, el ADN es amplificado por la enzima polimeraza, obteniéndose más de 10^7 copias.

Primeramente el ADN de doble cadena, es desnaturalizado a $94\text{ }^{\circ}\text{C}$, separando las cadenas, las secuencias seleccionadas específicas, que van a determinar la región a amplificar (primers), se hibridizan (adhieren) a la cadena complementaria del ADN a $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ y son extendidas a $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ por una enzima polimeraza termofílica, produciendo una copia de cada cadena. De esta manera, de dos cadenas de ADN separada se obtienen cuatro. Estos pasos se repiten 30 veces o ciclos utilizando un aparato, termociclador, que realiza los cambios de temperatura rápidamente. Por lo tanto, luego de los 30 ciclos, el PCR produce teóricamente $2,3 \times 10^{11}$ amplificaciones.

La extracción del ADN del amastigote es a partir del cinetoplasto, y las fracciones de la cadena a amplificarse dependerán de cada kit de PCR para *Leishmania* específica (Solano-Gallego et al., 2009).

El resultado de la multiplicación del material genético obtenido a partir del PCR debe ser visualizado por corrida electroforética, previa tinción con Bromuro de etidio.

PCR en tiempo real

La Reacción en Cadena de la Polimerasa en tiempo real, también conocida como Real Time PCR (RT-PCR) muestra la capacidad de monitorear el progreso de la reacción de PCR a medida que esta ocurre. Los datos son colectados a lo largo del proceso de PCR y no al final como se realiza en el PCR convencional (Rodríguez et al., 2006).

La tecnología del RT-PCR está basada en la detección de una señal fluorescente producida proporcionalmente durante la amplificación del ADN blanco. Esta técnica combina los pasos de amplificación de ADN y la detección en un único ensayo y evita tener que preparar geles de electroforesis para detectar los productos amplificados (Rodríguez et al., 2006).

Ella permite la detección y cuantificación de cargas muy pequeñas de secuencias específicas de ácidos nucleicos en tejidos de perros infectados. Durante la amplificación, la velocidad en que se llega a un nivel determinado de fluorescencia (umbral) se correlaciona con la cantidad de ADN que tenemos al inicio. Por lo tanto cuanto más alto es el número de copias iniciales de los ácidos nucleicos a amplificar, más pronto se observa un aumento significativo en la fluorescencia (Rodríguez et al., 2006).

Si bien por intermedio de esta técnica se puede obtener el diagnóstico de la enfermedad, su principal importancia radica en ser la única utilizada para el seguimiento de una posible respuesta terapéutica durante el tratamiento de Leishmaniasis (Solano-Gallego et al., 2009).

Francino, et al. (2006) en un estudio utilizando PCR en tiempo real para diagnóstico y monitoreo de Leishmaniosis canina, observaron que la parasitemia oscilaba entre 1 y 10^7 parásitos/ml, sin embargo en la gran mayoría de los casos sintomáticos presentaba una carga parasitaria superior a 10^3 parásitos/ml y aquellos asintomáticos su carga fue mayor de 100 parásitos/ml.

Diagnóstico diferencial

Dentro de las enfermedades a tener en cuenta en el diagnóstico diferencial debemos incluir al Pénfigo foliáceo, Lupus eritematoso sistémico o discoide, Dermatitis sensible al zinc, Eritema migratorio necrolítico, Adenitis sebácea y Linfoma cutáneo (Scott, 2002).

Es importante destacar que algunos pacientes pueden presentar un cuadro clínico dermatológico que es típico de Leishmaniosis canina pero también de otras enfermedades (Ferrer f).

Por ejemplo, un cuadro de dermatosis exfoliativa-costrosa que implica la región facial (periocular y pabellones auriculares), las extremidades y puntos de presión, puede ser producida por la dermatosis sensible al zinc. Si bien hay que considerar que esta última suele presentarse en razas nórdicas como Malamute de Alaska y

Siberian Husky, y no suelen presentarse con otros signos clínicos asociados (Ferrer f).

Un cuadro de dermatosis erosiva-ulcerativa de la trufa se puede deber a lupus eritematoso sistémico o discoide. Estas últimas son enfermedades de etiología autoinmune. Se suele detectar hiperproteinemia en estas enfermedades, con aumento de las beta y gamma globulinas aunque en la Leishmaniosis son más intensos. Igualmente la Leishmaniosis se puede diferenciar de estas últimas con la realización del estudio histopatológico de las lesiones, al visualizar los amastigotes de *Leishmania* en las mismas (Ferrer f).

En el caso de dermatosis exfoliativa con hipotricosis, esta puede deberse a adenitis sebácea granulomatosa idiopática. Esta última suele presentarse en Caniche Gigante, Akita, Samoyedo y Pastores Belgas. Se observa alopecia, descamación, piel gruesa, material queratosebáceo amarillento y cilindros foliculares. Si bien la histopatología es similar, ya que en ambas se puede presentar adenitis sebácea granulomatosa, en la Leishmaniosis se busca la presencia de los amastigotes (Ferrer f).

Tratamiento

El tratamiento contra *Leishmania* no logra la eliminación del parásito, ni interrumpe el ciclo de transmisión o las recaídas clínicas de la enfermedad. Solamente ofrece mejoría clínica temporalmente, por lo que los perros tratados se convierten en una fuente de infección para el vector (Baneth, 2007).

Las drogas utilizadas para el tratamiento al día de hoy incluyen una variada gama de fármacos donde se incluyen, los Antimoniales pentavalentes, Miltefosine, Aminosidine, Pentamidine, Allopurinol, Anfotericina B, entre otros.

Antimoniato de meglumina, Aminosidine y Miltefosine son al día de hoy las únicas drogas licenciadas en Europa específicamente para el tratamiento de *Leishmania*.

Antimoniales Pentavalentes

Los Antimoniales pentavalentes (Sb^{+5}) son considerados los fármacos de elección para el tratamiento de la Leishmaniosis. Se han utilizado en perros dos agentes que contienen Sb^{+5} , el Antimoniato de meglumina (Glucantime; Merial, Lyon, Francia) y el Estibogluconato de sodio (Pentostam; Welcome Foundation Ltd, Reino Unido) (Green, 2008).

Ellos son fármacos parasiticidas que actúan inhibiendo en forma selectiva las enzimas necesarias para la oxidación glucolítica y de los ácidos grasos indispensables en el metabolismo del protozoario (Green, 2008; Plumb, 2010).

Ambos fármacos son excretados con rapidez en la orina y sólo una pequeña parte se reduce al Sb^{+3} tóxico que puede acumularse en el cuerpo. Sin embargo, las dosificaciones normales rara vez ocasionan signos de toxicidad, a menos que la administración dure más de dos meses o se utilice en pacientes con insuficiencia hepática, cardíaca o renal. La insuficiencia renal puede aumentar su vida media y la

toxicidad por lo tanto puede aumentar en los perros con reducida velocidad de filtración glomerular (Solano-Gallego et. al., 2009; Plumb, 2010).

Los antimoniales pueden inyectarse por vía intramuscular (IM), intravenosa (IV), o subcutánea (SC). Las inyecciones IM en el muslo han provocado claudicación grave como resultado de la fibrosis muscular. Las posibles complicaciones locales de la administración SC son menos graves pero incluyen la inflamación local; las inyecciones IV pueden causar tromboflebitis y por lo tanto trombosis (Green, 2008).

El Glucantime se administra a la dosis de 100 mg/kg por vía IV o SC a un intervalo de cada 24 horas, o SC divididos en dos dosis diarias con una duración total del tratamiento de 3 a 4 semanas (Green, 2008; Plumb, 2010).

El Estibogluconato de sodio (Pentostam) se administra a la dosis de 30 – 40 mg/kg por vía IV o SC a un intervalo de cada 24 horas, con una duración total del tratamiento de 3 a 4 semanas (Green, 2008; Plumb, 2010).

Ambos pueden ocasionar efectos secundarios serios, el Antimoniato de meglumina pareciera ocasionar efectos secundarios más leves. Entre los efectos secundarios más frecuentes se observan reacciones en el sitio de inyección, letargo y efectos gastrointestinales como inapetencia y vómitos. Se ha descrito un aumento transitorio de las enzimas hepáticas (Plumb, 2010).

Ellas son las drogas de elección para el tratamiento tanto en personas como en perros. Dada la posible presentación de resistencia a estas drogas por parte del parásito, cada país tiene su propia legislación para la utilización en los animales.

Miltefosina

Desde el año 1940 se emplean los Antimoniales pentavalentes para el tratamiento de las diversas formas clínicas de Leishmaniasis, pero desde hace años se vienen reportando fallas terapéuticas en algunas regiones endémicas, razón por la cual se han hecho ajustes en las dosis diarias y el tiempo de administración, con lo que se ha logrado mantener su eficacia, pero con el inconveniente del incremento de la frecuencia y severidad de los efectos secundarios. Esto junto a los reportes de resistencia han forzado la búsqueda de un medicamento que pueda remplazarlos en el tratamiento de la Leishmaniasis (Soto et al., 2006).

Croft et al (1987), encontró a principios de los 80´ un nuevo compuesto, la Miltefosina (hexadecilfosfolina), un análogo de la fosfatidil-colina, compuesto de ésteres con varios grupos alquilo de cadena larga saturados e insaturados, que se mostró similar a compuestos metabolizados por *Leishmania*.

Fue originalmente desarrollada como un agente antineoplásico, pero las similitudes en el metabolismo ester-fosfolipídico de la *Leishmania* con las células cancerosas hizo que se iniciaran los estudios in vitro e in vivo para demostrar la actividad de Miltefosina contra estos parásitos. Se vio que eliminaba rápida y eficazmente de los cultivos a los promastigotes de *Leishmania*, y paso a constituir una nueva herramienta para el tratamiento clínico y parasitológico de los enfermos de Leishmaniosis (Soto et al., 2006; Pérez Tort et al., 2009).

Este nuevo compuesto posee una potente actividad leishmanicida, siendo una molécula lipofílica e hidrofóbica, y por ello es capaz de penetrar membranas celulares e interferir en el metabolismo ester-fosfolípidos e inducir apoptosis del parásito (Soto et al., 2006; Pérez Tort et al., 2009).

Recientemente se demostró in vitro una diferencia en la susceptibilidad a Miltefosina entre amastigotes de *L. donovani* y *L. braziliensis* del orden de 3 a 20 veces, lo que evidencia una notable diferencia en la sensibilidad intrínseca de las especies de *Leishmania* (Soto et al., 2006).

En lo que respecta a su farmacocinética tiene una rápida y completa absorción en el tubo digestivo después de su administración oral, con una biodisponibilidad del 94% y con una concentración máxima entre 4 y 48 hs, alcanzando concentraciones eficaces con rapidez y llegando a los tejidos profundos donde se ocultan los amastigotes de *Leishmania* (Pérez Tort et al., 2009).

Su dosificación es a razón de 2 mg/kg de peso corporal vía oral una vez al día durante 28 días (Plumb, 2010).

Hay que tener en cuenta que dosis elevadas inducen efectos adversos gastrointestinales, aunque éstos son leves y autolimitantes, tales como náuseas, vómitos, diarrea y pérdida de peso 5-7 días después de iniciado el tratamiento, por lo que debe ser administrado mezclado con la comida y no directamente en la boca. No se mencionan efectos nocivos en sistema nervioso, respiratorio, ni alteraciones en los parámetros hematológicos y bioquímicos, particularmente renales y hepáticos, a dosis recomendadas. Por este motivo puede ser utilizada en perros con distinto grado de falla renal, y lo que es más no requiere ajuste posológico cuando la función renal está disminuida (Pérez Tort et al., 2009).

Otra de las ventajas para el propietario es su facilidad de uso, al ser su administración en forma oral una vez al día sin inyecciones dolorosas para el animal.

Debido a su toxicidad reproductiva no debe usarse en perras gestantes ni lactantes ya que durante el desarrollo embriológico temprano y durante la fase de organogénesis tiene riesgo de embriotoxicidad, fetotoxicidad, teratogenicidad y abortos (Pérez Tort et al., 2009).

La limitante en nuestro país para el uso de esta droga es su alto costo y la falta de disponibilidad de dicho fármaco, empleado como alternativa terapéutica en la Leishmaniasis.

Allopurinol

Este es un compuesto de hipoxantina, que *Leishmania* spp metaboliza para producir un análogo de inosina. El análogo luego se incorpora en el ARN del parásito y provoca una traducción proteica errónea que inhibe su multiplicación, por lo cual tiene efecto leishmaniostático (Green, 2008).

Se administra a una dosis de 20 mg/kg por vía oral a un intervalo de cada 12 – 24 horas, la recuperación clínica con frecuencia se obtiene dentro de las 4 semanas. Sin embargo, las recaídas ocurren consistentemente cuando se interrumpe el tratamiento; incluso luego de una administración perfecta del fármaco durante 6 meses, la recuperación completa es muy rara, por lo que debe administrarse en forma indefinida.

Su uso puede producir hiperxantinuria, llegando a causar urolitiasis. Siendo este el efecto secundario que se presenta luego de la administración prolongada del fármaco (Plumb, 2010).

Este fármaco es más económico que los Antimoniales pentavalentes y se encuentra disponible con facilidad.

Fármacos adicionales

Entre los fármacos adicionales descritos para el tratamiento de la Leishmaniosis se encuentran la Anfotericina B, la Pentamidina y la Aminosidina, aunque ellos no son empleados como primera opción terapéutica.

2.6.4.1. Anfotericina B (AMB)

Es un polieno macrólido derivado del *Streptomyces nodosus* usado principalmente como fármaco antifúngico, que también presenta acción frente a algunos protozoarios (García Almagro, 2004; Plumb, 2010).

Funciona ligándose al ergosterol y alterando así la permeabilidad de la membrana celular (Plumb, 2010).

Esta droga tiene serias desventajas, tal como la ruta de administración IV y un profundo efecto tóxico sobre los riñones, ya que causa vasoconstricción renal y una reducción de la tasa de filtración glomerular y tal vez también actúe directamente sobre las células epiteliales del mismo, requiriéndose por tanto sesiones de fluidoterapia pre y post aplicación (Green, 2008; Solano-Gallego et al., 2009; Pérez Tort, 2009).

Su alta toxicidad ha sido disminuida por el desarrollo de formulaciones liposomiales. Esta formulación resultó eficaz en el tratamiento de personas, por lo cual ha remplazado los Antimoniales pentavalentes en Italia y otros países europeos (García Almagro, 2004).

Sin embargo, un estudio sobre su uso en perros no logró demostrar mejorías clínicas a largo plazo y eliminación de la infección en los pacientes tratados (Green, 2008).

Pentamidina

La Pentamidina es una diamidina aromática utilizada para neumocistosis (*Pneumocystis carinii*), babesiosis y tripanosomiasis (*T. gambiense* y *T. rhodesiense*) que posee también actividad antileishmania (García Almagro, 2004; Green, 2008).

Se ha utilizado sobre todo en el Nuevo Mundo, a dosis de 2-3 mg/kg en días alternos, de 4 a 7 inyecciones de tratamiento total. Se inyecta de forma IM en perros y puede causar una irritación grave en el sitio de la inyección (García Almagro, 2004; Green, 2008).

Entre los efectos secundarios puede causar dolor en el lugar de la inyección, mialgias, hipotensión, taquicardia, náuseas y vómitos. La falta de estudios controlados y comparativos mantienen a este medicamento como una opción secundaria (García Almagro, 2004; Green, 2008).

Aminosidina

El sulfato de Aminosidina es un antibiótico aminoglucósido, que resulta tóxico en las dosis efectivas contra *Leishmania* (Green, 2008).

Tiene efectos secundarios graves como nefro y ototoxicidad, por lo que su uso como terapia de primera línea no es recomendado (Solano-Gallego et al., 2009).

Aparte de los medicamentos antes mencionados otros varios medicamentos candidatos contra Leishmaniosis han sido estudiados in vitro o en animales de laboratorio, pero rara vez en ensayos clínicos controlados. Entre estos se incluyen, Ketoconazol, Metronidazol, Espiramicina y Marbofloxacina (Green, 2008).

Protocolos terapéuticos

Se han alcanzado mejores resultados terapéuticos en el tratamiento de la Leishmaniosis al utilizar combinación de drogas leishmanicidas (Antimoniales pentavalentes o Miltefosina) con leishmaniostáticas (Allopurinol), en contraste con la utilización de protocolos monodroga.

El protocolo de tratamiento que combina Antimoniato de meglumina junto con Allopurinol, consiste en la administración de las drogas por 30 días, continuando luego con el Allopurinol en forma ininterrumpida, para sustentar la remisión clínica (Green, 2008; Solano-Gallego et al., 2009).

Otro protocolo de tratamiento alternativo consiste en el uso de Miltefosina combinado con Allopurinol durante 28 días, seguido de Allopurinol solo, durante varios meses, como terapia de mantenimiento (Solano-Gallego et al., 2009; Pérez Tort et al., 2009). Esta combinación se ha sugerido recientemente como una alternativa a la combinación de Antimoniato de meglumina con Allopurinol, en pacientes comprometidos en su función renal (Pérez Tort et al., 2009).

Seguimiento del paciente

El seguimiento del tratamiento y su retirada están aún poco definidos porque no hay suficientes evidencias científicas para tomar decisiones claras. Por tanto, es una decisión clínica tomada por el veterinario que será diferente en función de cada caso (Ferrer et al., b).

Se sugiere suspender el tratamiento de mantenimiento cuando los signos clínicos han desaparecido, el análisis de sangre está dentro de los valores normales, el

proteínograma es normal y si es posible dos exámenes PCR de médula ósea, separados por seis meses den resultado negativo (Solano Gallego et al., 2009).

Se ha utilizado la reducción en los títulos de anticuerpos como forma de controlar el progreso del tratamiento; sin embargo, éstos pueden bajar por una disminución de la carga parasitaria pero no necesariamente implica una eliminación total de los parásitos. Por lo tanto, los resultados en general no son compatibles con la cura parasitaria, y con frecuencia ocurren recaídas a pesar de la reducción inicial en los títulos de anticuerpos (Green, 2008).

Si no hay enfermedad renal, hepática, dermatológica u ocular grave, se recomienda que el seguimiento se realice al mes de inicio del tratamiento y a partir de allí, cada 6 meses los primeros años. Si existe alguna de estas enfermedades hay que realizar los seguimientos recomendados en cada una de estas situaciones clínicas, no en función de lo recomendado en la Leishmaniosis (Ferrer et al., b).

En muchos perros se puede detener el tratamiento después de 12-18 meses. Aunque la decisión de continuar, parar o reiniciar variará según cada caso (Ferrer et al., b).

Cuando los perros no están sometidos a un tratamiento de mantenimiento, el seguimiento del proteínograma con el incremento de las globulinas gamma puede ser el primer signo de recaída (Ferrer et al., b).

Pronóstico

El tratamiento médico con agentes antileishmaniáticos y especialmente con la combinación de Antimoniato de meglumina/Allopurinol solo conduce a la curación clínica, sin embargo algunos perros que inicialmente respondieron a la terapia pueden experimentar una recaída clínica tras suspender el tratamiento o durante el mismo, lo que sugiere que la infección no fue eliminada. Ningún fármaco ha logrado la cura parasitológica ni efectividad profiláctica frente a la infección en perros tratados, incluso aquellos con un régimen prolongado de Allopurinol siguen albergando el parásito y son infecciosos para el flebótomo, aunque en menor medida (Ikeda García et al. 2007; Manna et al., 2008; Ribeiro et al., 2008; Green, 2008).

El pronóstico de la Leishmaniosis canina depende de la gravedad de las lesiones en los distintos órganos al momento del diagnóstico, así como de la respuesta individual y la velocidad del deterioro. En los pacientes que no han alcanzado un estado de falla renal progresiva, el tratamiento por lo general mejora significativamente los signos viscerales y dérmicos de la enfermedad (Green, 2008).

Debemos recordar que la Leishmaniosis por sí misma no provoca la muerte de los animales que afecta, si la falla renal provocada por los inmunocomplejos que genera la parasitosis.

Control y prevención

Las medidas utilizadas para el control y prevención de la Leishmaniasis incluyen aquellas destinadas a evitar la picadura del agente vector, a la eliminación tanto del

flebótomo como del reservorio y las que apuntan a disminuir la población de perros susceptibles mediante la vacunación.

Dentro de las medidas preventivas para evitar la picadura del flebótomo se incluyen:

1. Mantener los perros en el interior de las casas tanto como sea posible entre una hora antes del atardecer y una hora después del amanecer, durante la estación de flebótomos, ya que coincide con el período de mayor actividad del vector (Green, 2008).
2. Recurrir a la instalación de mallas mosquiteras para mantener los insectos alejados de los criaderos (Green, 2008).
3. El empleo de insecticidas tópicos a ser utilizados en perros con actividad demostrada frente al flebótomo, incluyen la utilización de collares, pipetas (spot-on), aerosoles y soluciones. Este método de protección es de utilidad en las áreas de endemia durante las estaciones de transmisión o para aquellos animales que viajan a tales regiones (Green, 2008).

Los collares impregnados con Deltametrina liberan gradualmente el insecticida, el cual se distribuye en el tejido adiposo subcutáneo del animal dentro de 1 a 2 semanas de su aplicación, y en condiciones óptimas el efecto repelente puede durar hasta 6 meses (Solano-Gallego et al., 2009).

Formulaciones en spot-on y spray también ofrecen un alto nivel de protección, aunque de una duración más corta, 3 y 2 semanas respectivamente. Estas formulaciones tópicas necesitan algunos días para que el insecticida pueda extenderse por toda la capa cornea, en contraste las formulaciones en polvo logran un efecto inmediato pero tienen una menor duración (Solano-Gallego et al., 2009).

La aplicación tópica de Permetrinas ofrece buena acción repelente y efecto insecticida que dura varias semanas. La acción sinérgica del Imidacloprid, un insecticida nicotinoide, mejora las propiedades de los piretroides como la Permetrina, de esta manera, un fuerte efecto repelente que dura 3 – 4 semanas se ha logrado (Solano-Gallego et al., 2009).

Una buena educación del veterinario al propietario de los perros sobre el uso de los productos, como aplicarlos y la frecuencia de aplicación, es también crucial para la prevención de la enfermedad (Solano-Gallego et al., 2009).

Las medidas preventivas que se deben utilizar en perros que viajan de zonas no endémicas a zonas endémicas, deben ser las mismas que las descritas para los perros sanos y enfermos que viven en zonas endémicas. Se recomienda que los collares se coloquen 2 semanas antes del viaje y cambiarlos cada 5 meses. Alternativamente piretroides en spot-on o spray deberían ser aplicados 2 días antes del viaje y repetir la aplicación cada 2 a 3 semanas, dependiendo del tipo de producto utilizado (Solano-Gallego et al., 2009).

Las medidas destinadas para disminuir la población del flebótomo incluyen, reducir el microambiente favorable para su sobrevivencia, ya sea en la vecindad de los

hogares o en los criaderos y el uso de insecticidas (Deltametrina al 10%) para la fumigación ambiental.

La fumigación contra los flebótomos vectores y la erradicación de sus supuestos focos de cría presentan una eficacia limitada contra la propagación de la enfermedad (Green, 2008).

En algunos países se apunta a la eliminación del reservorio, por medio del sacrificio de los perros sintomáticos y seropositivos. Esto por supuesto es inaceptable por parte de sus dueños; de todos modos, este procedimiento también es ineficaz, ya que tal vez los cánidos salvajes, así como una población de perros vagabundos u otros animales posibles reservorios, pueden ser fuentes de transmisión de los parásitos (Green, 2008; Solano-Gallego et al., 2009).

Vacunas disponibles para Leishmaniosis

A pesar de las mejoras en los regímenes terapéuticos que están disponibles, es probable que la disminución o eliminación de la Leishmaniosis canina sólo pueda ser lograda a través de la vacunación generalizada (Duthie et al., 2012).

El uso de una vacuna canina para la prevención podría proporcionar una reducción a largo plazo, de este potencial reservorio estrechamente relacionado con la infección humana, interrumpiendo la transmisión del parásito de *Leishmania* al humano pudiendo eliminar la necesidad de la eutanasia en aquellos países donde su legislación lo indica (Duthie et al., 2012).

En lo que respecta a la evolución de las vacunas contra esta enfermedad, debemos referirnos a dos generaciones de vacunas a lo largo del tiempo.

Primera generación de vacunas

La vacunación con parásitos virulentos, denominada Leishmanización se practicaba desde los tiempos antiguos hasta hace poco, en muchas zonas endémicas. La inoculación de parásitos de *Leishmania* vivos dentro de la piel de niños induce leve infección e inmunidad posterior. Esta práctica ha sido abandonada por ser insegura (Duthie et al., 2012).

Ensayos que involucran vacunas con parásitos enteros muertos se llevaron a cabo entre 1970 y 1980. Ensayos recientes se llevaron a cabo con vacunas inactivadas de parásitos enteros en varios países, pero ninguna de ellas demostró protección (Duthie et al., 2012).

Avances hacia una definitiva segunda generación de vacunas

Luego de décadas de intentos de producir una segura y efectiva vacuna contra *Leishmania*, con un éxito muy limitado, varias vacunas caninas se encuentran bajo evaluación experimental con resultados prometedores (Solano-Gallego et al., 2009).

Las vacunas de segunda generación con productos refinados, tales como proteínas recombinantes con adyuvantes o la expresión en vectores microbianos heterólogos,

representan una opción más factible para las campañas de vacunación masiva (Duthie et al., 2012).

Una variedad de proteínas recombinantes ha sido investigada como candidata de antígenos de *Leishmania* para la vacuna en modelos animales. La principal representante de este grupo de antígenos vacunales, es la glicoproteína de superficie GP63 de *Leishmania* enriquecida con fracción de *Leishmania donovani*, también llamada fucosa manosa ligando-vacuna (FML-vacuna), por lo que se habla de antígeno complejo glicoproteico FML. Este complejo está presente en todas las *Leishmanias*, como *donovani*, *infantum* y *chagasi* (Solano-Gallego et al., 2009; Duthie et al., 2012).

Los adyuvantes a utilizar son un paso importante a tener en cuenta durante el desarrollo de una vacuna. Los adyuvantes son utilizados con la finalidad de potenciar la respuesta inmune cuando son administrados junto con un antígeno, y no deben ser tóxicos ni causar efectos colaterales graves. El poder inmunogénico del antígeno FML es potencializado por la saponina, adyuvante de inmunidad utilizado en Leishmune. En los estudios publicados, la combinación FML-saponina fue capaz de inducir una elevada respuesta inmune sin causar efectos tóxicos locales o sistémicos graves (Santos, 1997; Santos, 2002; Palatnik de Sousa, 2004).

Leishmune no representa un riesgo de infectividad para el canino, por tratarse de una vacuna compuesta por antígeno purificado no patogénico. Trabajos científicos demostraron que los perros vacunados no desarrollan la enfermedad, y no presentan el parásito en la piel ni la sangre (Nogueira, 2005; Palatnik de Sousa, 2008).

Esta vacuna induce una respuesta Th-1, estimulando la producción de interferón- γ y citoquinas activadoras de macrófagos, responsables de la resistencia a la infección y destrucción del parásito, resultando en la protección de los caninos. También fue demostrado que la vacuna induce altos niveles de IgG2 (Th-1), inmunoglobulinas que demuestran resistencia natural a la enfermedad (Mendes, 2003).

El programa de vacunación con Leishmune debe ser iniciado a partir de los 4 meses de edad, y consiste en la aplicación de tres dosis con un intervalo de 21 días. La protección contra la Leishmaniosis es adquirida a los 21 días de la tercera aplicación. Si el perro es picado por un mosquito contaminado durante este periodo puede infectarse. La revacunación anual debe ser aplicada un año después de la primera dosis y repetida anualmente, proporcionando el mantenimiento de la respuesta inmune.

Durante el periodo de incubación de la Leishmaniosis, el perro puede no presentar manifestaciones clínicas ni serología indicativa de infección. La vacunación en este periodo no protegerá al perro, una vez que el ya este infectado. Por ello es recomendable asegurarse previamente que el animal sea seronegativo.

La FML- vacuna ha sido evaluada en pruebas de campo en Brasil, con una buena protección. Esta ha generado resultados prometedores en modelos animales después de la entrega de numerosos regímenes de inmunización, por lo que fue

licenciada y autorizada su industrialización en ese país, como la primera vacuna contra *Leishmania* para la comercialización en el 2004 (Solano-Gallego et al., 2009; Duthie et al., 2012).

En los trabajos de eficacia realizados en caninos, fue demostrada una protección del 92-95% en los animales vacunados y con un seguimiento durante 24 y 41 meses, respectivamente. Estos estudios fueron realizados en una región endémica para Leishmaniasis visceral (São Gonçalo do Amaranto – RN) (Silva, 2001; Borja-Cabrera, 2002).

Una investigación realizada en 2008, con médicos veterinarios usuarios de Leishmune mostró que la protección a campo tuvo una media de 97,3%. Estos datos fueron relevados por 89 clínicas localizadas en áreas de alto desafío con un muestreo de 8.393 perros vacunados entre agosto del 2004 y agosto del 2008, comprobando que la vacuna es altamente eficaz a campo (Borja-Cabrera, 2008).

Otra publicación, con 550 caninos vacunados y con un seguimiento de 2 años, demostró un 99% de protección. En este estudio todos los caninos susceptibles fueron sometidos a PCR de sangre y linfonódulos (Borja-Cabrera, 2008).

La ausencia de ADN de *Leishmania* y parásitos en animales vacunados con Leishmune indican la condición de no infección de los perros vacunados, lo que sugiere que ya no son capaces de transmitir los parásitos al vector durante la succión de sangre (Duthie et al., 2012).

Dicha vacuna también se ha propuesto para la terapia inmunológica de perros enfermos. La terapia con vacuna se evaluó sola o en combinación con Allopurinol o Anfotericina B en perros infectados con resultados alentadores (Solano-Gallego et al., 2009; Duthie et al., 2012).

Uno de los inconvenientes principales de la vacunación es el poder diferenciar la infección natural de aquellos vacunados, por intermedio de test serológicos, existiendo resistencia por parte de algunos veterinarios en Brasil al uso de la misma, donde los perros seropositivos deben oficialmente ser eliminados (Solano-Gallego et al., 2009).

Una segunda vacuna basada en un antígeno purificado a partir del sobrenadante del medio de cultivo específico de amastigotes de *L. infantum* ha sido estudiada en Francia con buena protección (Solano-Gallego et al., 2009).

Situación de la Leishmaniasis en el Viejo Mundo y América Latina.

Las epidemias ocurren frecuentemente en regiones de difíciles acceso, como Libo Kemkem, Etiopía (2005-06), Wajir, Kenya (2008) y del Alto Nilo, Sudán meridional (2009). La desnutrición es un factor de riesgo bien conocido, y las epidemias prosperan bajo condiciones de hambruna, emergencias complejas y movimientos masivos de población (WHO).

En Sudán una gran epidemia de Leishmaniasis visceral se produjo desde 1984 a 1994. Como esta fue la primera epidemia en la zona, la población era altamente

susceptible. Algunos estudios han estimado que la enfermedad causó 100.000 muertes en una población de alrededor de 300.000 en la zona oeste de Nilo. En algunos pueblos, más de la mitad de la población murió de la enfermedad (WHO).

En 1997, una nueva epidemia causó nuevos casos confirmados de Leishmaniasis visceral en Sudán aumentando en un 400% respecto al año anterior. Centros de tratamiento fueron aplastados y se agotaron las existencias de medicamentos de primera línea (WHO).

La migración de trabajadores estacionales y movimientos de gran población causados por disturbios civiles llevaron a la epidemia en Eritrea y Etiopía (WHO).

Dentro de la región europea, se han dado casos de LV en Albania, Bosnia y Herzegovina, Bulgaria, Croacia, Francia, Grecia, Hungría, Italia, Macedonia, Malta, Mónaco, Portugal, Rumania, España y Yugoslavia. La Leishmaniasis se transmite también en los países adyacentes de Azerbaiyán, Chipre, Georgia, Kazajistán, Tayikistán, Turquía, Turkmenistán y Uzbekistán (Figura 5) (WHO).



Figura 5: Distribución de la Leishmaniasis visceral en el viejo mundo.

Fuente: página de la WHO

Respecto a la incidencia de la Leishmaniosis canina, las regiones españolas más afectadas hasta el momento son Andalucía, Palma de Mallorca, Comunidad Valenciana y Cataluña. Sin embargo, en los últimos años se ha comprobado que no sólo las zonas de clima típicamente mediterráneo son proclives a la enfermedad. Según los últimos datos, las zonas del norte de España están registrando cada vez más casos de perros afectados por Leishmaniosis (WHO).

En América Latina se encuentra distribuida en varios países del continente, con excepción de Chile y Uruguay, encontrándose zonas endémicas en Brasil, Norte Argentino y Paraguay (Figura 6) (WHO).

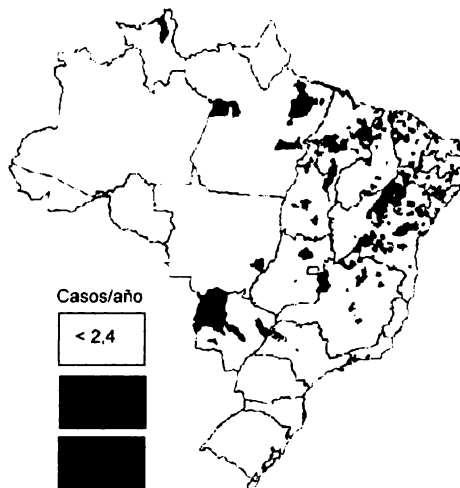


Figura 6: Distribución de la Leishmaniasis visceral en América Latina.
Fuente: página de la WHO

Brasil también ha experimentado un fuerte aumento en el número de casos de Leishmaniasis visceral desde 1999. Previamente, las epidemias rurales fueron vistas en ciclos de diez años. Ahora, la enfermedad también está apareciendo en las zonas urbanas. Olas de sequía, la falta de tierras disponibles y la hambruna han llevado a una gran migración de la población de los asentamientos de las zonas rurales, a los suburbios periféricos de las grandes ciudades, creando zonas densamente pobladas con mínima infraestructura y saneamiento. En estos asentamientos, el parásito recientemente introducido encuentra un vasto número de individuos no inmunes, que a menudo están desnutridos y por lo tanto más vulnerables. Los niños menores de 15 años son el grupo más gravemente afectado. Perros mantenidos habitualmente en el entorno doméstico son el principal reservorio animal de la infección (WHO).

La LV está ampliamente difundida en Brasil, donde se han notificado casos en por lo menos 17 de los 26 estados (Figura 7).

LEISHMANIASIS VISCERAL: BRASIL 2000-2004
PROMEDIO DE CASOS POR AÑO



FUENTE: SINAN/SVS-MS-Brazil

Figura 7: Leishmaniasis visceral distribución en Brasil.

Por su parte, la Leishmaniasis visceral se está dispersando a partir de focos de transmisión autóctona en Argentina.

La transmisión de Leishmaniasis visceral hasta el momento se ha registrado en Misiones y Corrientes, mientras que en Santiago del Estero hubo casos de Leishmaniasis visceral humana y en Formosa sólo Leishmaniosis canina.

Sin embargo, el vector se encuentra en dispersión activa, actualmente comprobada hasta el sur de la provincia de Corrientes (Figura 8).

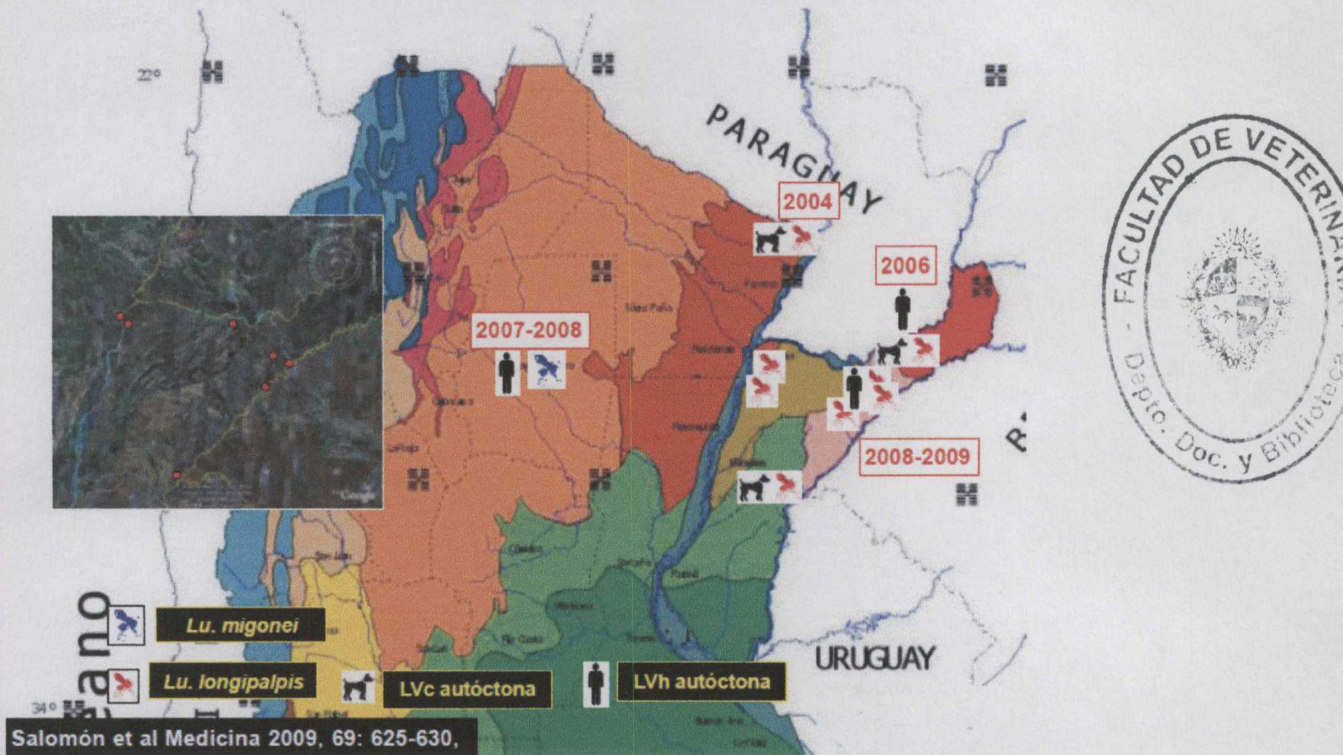


Figura 8: Leishmaniasis visceral distribución en Norte Argentino.

Fuente: modificado de Salomón, 2012.

En el censo poblacional del año 2010 reveló 1.097.829 habitantes en la provincia de Misiones y 323.739 habitantes en la ciudad de Posadas.

Entre el 2006 al 2012 los casos de Leishmaniasis visceral humana en la provincia de Misiones fueron de 101 casos, con 11 muertos hasta la fecha. Siendo la incidencia entre 2010 y 2011 de 0.5 a 1.0 casos cada 10.000 habitantes.

En este mismo período se detectaron 3200 casos de Leishmaniosis canina en Veterinaria del Oeste en la ciudad de Posadas.

Según el Ministerio de Salud Pública la tasa de prevalencia de Leishmaniosis canina en el sur de Misiones y norte de Corrientes es de 20 a 47 %.

La Leishmaniasis visceral es una enfermedad endémica en el Paraguay, esto significa que aparece cíclicamente en el país todos los años. La media local de afectados por año es de 113 casos, lo que significa más de una persona infectada por semana.

La zona de la Gran Asunción es endémica, teniendo en general rangos de perros infectados que oscilan entre el 10% y 30%. Las áreas más preocupantes, son Lambaré (60% de perros seropositivos en 2004), Villa Elisa y Limpio, permaneciendo Asunción con los índices más bajos.

En Uruguay, hasta el momento no se ha denunciado ningún caso autóctono de Leishmaniosis en perros, no así casos importados de perros de zonas endémicas.

Pacheco da Silva et al. (2009) describieron el caso de un perro de la raza Baset Hound que se presentó en la Facultad de Veterinaria de Montevideo, con lesiones dérmicas nodulares pruriginosas y ulceradas en su mayoría, distribuidas por todo el cuerpo, acompañadas por una adenomegalia generalizada.

Nacida el 5 de diciembre de 1999, en Salinas, Departamento de Canelones, lugar donde fue adquirida y trasladada a la ciudad de Montevideo, no registrándose más traslados ni viajes al exterior.

En la punción aspirativa con aguja fina (PAAF) de las lesiones dérmicas se observaron linfoblastos atípicos, macrófagos, abundantes leucocitos polimorfonucleares y monocitos, con fondo bacteriano copioso. Basados en los linfoblastos atípicos observados en la punción, se llega a un diagnóstico presuntivo de Linfoma cutáneo. El propietario decide realizar eutanasia, autorizando la autopsia. En ella se extraen muestras para histopatología de diferentes tejidos, revelando la presencia de estructuras subcelulares dentro de los macrófagos, cuya morfología era compatible con formas amastigotas de protozoarios flagelados.

Según Pacheco da Silva et al. (2009), si bien no hay reportes a la fecha de esta enfermedad en nuestro país, considerando las lesiones que presentaba el animal, los hallazgos citológicos e histopatológicos, y la presencia del vector en dicha zona ("mosca de los arenales") podemos concluir que estamos frente a una Leishmaniasis cutánea en perro.

Ellos afirman, necesitaríamos la reproducción experimental y la confirmación serológica, sin embargo no fueron realizadas porque al ser una enfermedad exótica no se tuvo en cuenta en el diagnóstico diferencial hasta la visualización del parásito en las muestras obtenidas. Si bien se tomaron muestras tisulares y de sangre del animal, no fueron conservadas apropiadamente ni colectadas en volumen suficiente.

El vector de la Leishmaniasis visceral fue capturado en nuestro país, en un estudio realizado por Salomón et al. (2011), los cuales hallaron la *Lutzomyia longipalpis* en los departamentos de Salto y en la ciudad de Bella Unión, Artigas en febrero del 2010. La captura del vector en Salto representa la más al sur conocida de *Lutzomyia longipalpis* hasta la fecha. Este es el primer informe de una zona de transmisión potencial de la LV en Uruguay (Figura 9).

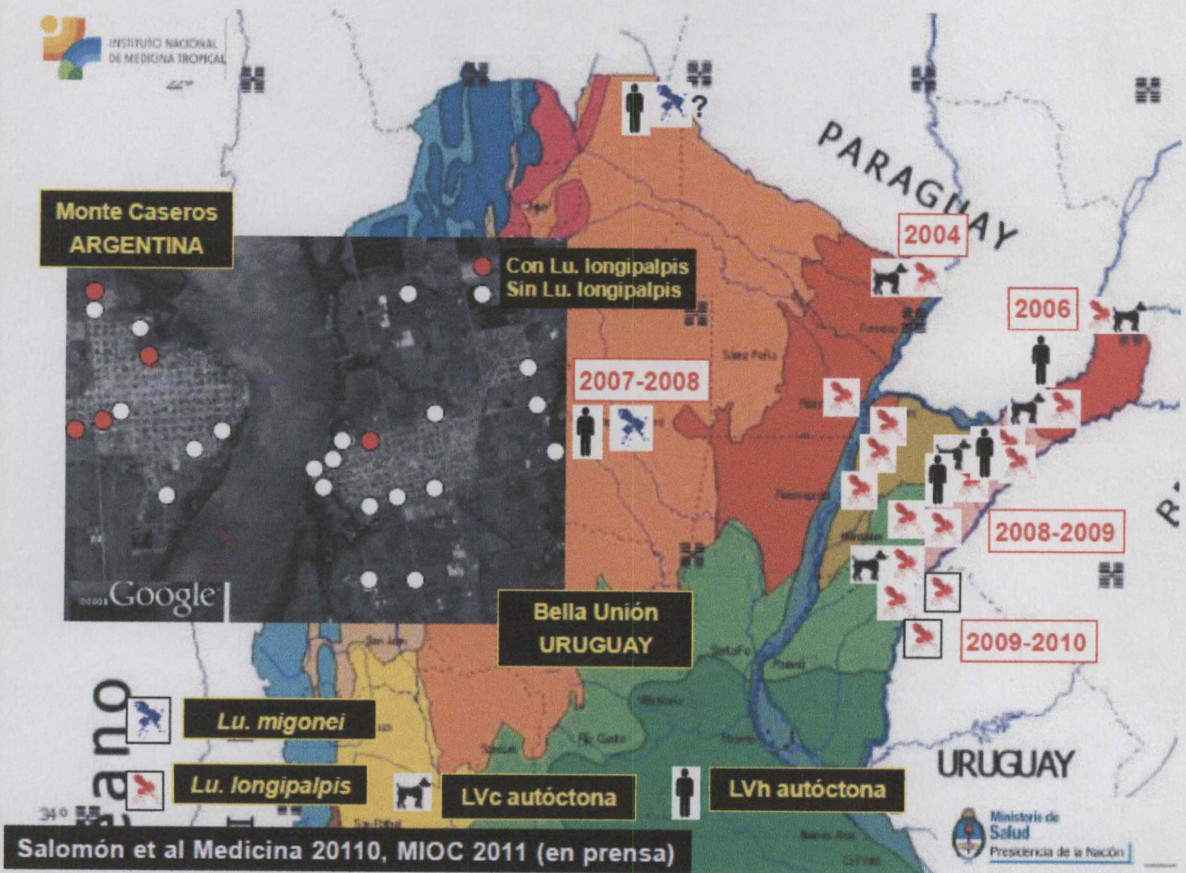


Figura 9: Distribución hacia el sur de *Lutzomyia Longipalpis*.
Fuente: modificado de Salomón, 2012.

3. OBJETIVOS

El objetivo general de esta tesis es hacer un estudio exhaustivo de la Leishmaniasis, describiendo su situación a nivel mundial, regional y nacional.

Como objetivos particulares:

1. Descripción de un caso clínico y analizar las posibilidades diagnósticas y terapéuticas en Uruguay
2. Evaluar la respuesta clínica del paciente durante el tratamiento utilizado.
3. Analizar la legislación sanitaria vigente en nuestro país.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

Un animal del genero canis familiaris, hembra entera, de la raza Labrador Retriever, de 4 años de edad, fue llevada a una clínica veterinaria de la ciudad de Montevideo, al presentar un cuadro dermatológico y de desmejoramiento general.

Dicha paciente presentaba vacunaciones al día y desparasitaciones regulares cada 3 o 4 meses y pipeta contra ectoparásitos aplicada mensualmente con Imidacloprid y Permetrina.

Su nacimiento fue en el barrio de Villa Morra en junio del año 2005, ciudad de Asunción (Paraguay), donde vivió hasta los 60 días de edad. Cuando fue adoptada por sus dueños definitivos, los cuales la trasladaron a Lambaré, ciudad perteneciente al Departamento Central de Gran Asunción (Figura 10 y 11).



Figura 10: Mapa de Paraguay distribución departamental

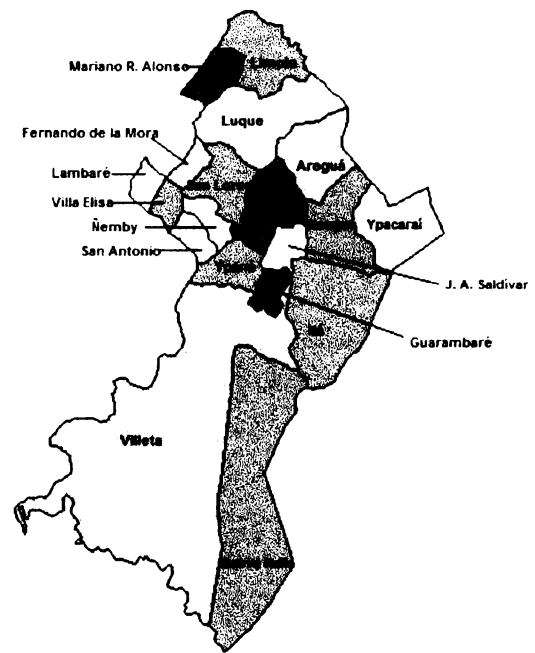


Figura 11: Mapa del Departamento Central con sus distritos

Viviendo hasta sus dos años en un barrio sub-urbano, muy cercano al Arroyo Lambaré y al Rio Paraguay (Figura 12).

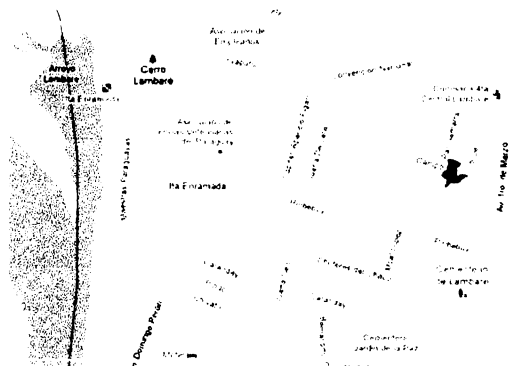


Figura 12: Mapa de la ciudad de Lambaré

En febrero de 2007 ingresa a Uruguay, vía aérea y se establece en el barrio Brazo Oriental en la ciudad de Montevideo, visitando nuevamente Paraguay a fines de ese año, hasta los primeros días de febrero del siguiente año, cuando regresa y no vuelve a salir de Montevideo por el resto de su vida.

Su casa presenta un jardín y un fondo con arbustos y plantas a los cuales ella tuvo siempre libre acceso, nunca compartiendo su casa con otra mascota.

Su alimentación fue realizada desde cachorra con ración, hasta su etapa adulta. Llevando siempre una vida sedentaria.

El segundo mes del año 2010, consulta por una dermatitis en muslo derecho (ver anexo foto 4) y un granuloma acral en miembro torácico derecho, en cuyo momento es tratada con glucocorticoide de depósito (Triancinolona) vía sub-cutánea y se le prescribe un antibiótico (Enrofloxacin) a una dosis de 150 mg cada 12 hs y la aplicación de spray con Gentamicina y Lidocaína dos veces al día.

Un mes después vuelve a consulta por claudicación en el miembro torácico izquierdo, presentándose en el carpo de dicha extremidad, los signos cardinales de la inflamación (ver anexo foto 5). Tratándose con Dexametasona 2 ml vía sub-cutánea y luego de 48 hs se comienza con ácido Tolfénico 120 mg por día por 3 días, descanso de 48 horas y volver a repetir el AINE por los 3 días siguientes. En el mismo momento es solicitada una radiografía de la articulación, para obtener el origen de dicha inflamación, siendo desestimada por el propietario.

A mediados del mes de septiembre retorna a la clínica con una lesión similar a la observada en el mes de febrero y por este motivo fue medicada de igual forma que en dicha oportunidad, con el agregado de una solución de Clorhexidina y Triancinolona para aplicación en spray.

Al cabo de tres meses retorna por el mismo tipo de lesión, con el agregado de linfadenomegalia generalizada de todos los nódulos linfáticos palpables. Se vuelven a tratar las lesiones de igual forma y se solicita realizar punción aspiración con aguja fina (PAAF) de dichos nódulos para obtener una citología en busca de la etiología de la linfadenomegalia.

En marzo del año siguiente vuelve con un cuadro de anorexia, depresión, apatía, pérdida de peso, atrofia de los músculos temporales (ver anexo foto 6), piodermia profunda (forunculosis en el mentón) y otitis bilateral. Al examen objetivo general se aprecia nuevamente linfadenomegalia generalizada y mucosas de la conjuntiva ocular hipocrómica. Su temperatura corporal se encontró dentro del rango normal.

Al examen objetivo particular dermatológico presentaba alopecia periocular con descamación, hiperqueratosis de las almohadillas plantares de los miembros torácicos y úlceras en la unión muco-cutánea oral (ver anexo fotos 7 y 8).

A la palpación del abdomen se detectó esplenomegalia, realizándose inmediatamente una ecografía, encontrándose esplenomegalia marcada y hepatomegalia moderada.

Se vuelve a solicitar citología de los nódulos linfáticos, conjuntamente con un hemograma y bioquímica sanguínea. Ese día se le administra Dexametasona por vía SC a una dosis de 6 mg totales en forma empírica.

Al día siguiente se encuentra, los mismos signos, con la aparición de úlceras en el miembro torácico derecho en la unión de la piel con las almohadillas digitales. Se instaura un tratamiento local con solución de Clorhexidina y se administra nuevamente Dexametasona SC a igual dosis.

Luego de 24 hs el paciente manifiesta leves mejorías en lo que respecta al apetito y sensorio. Como consecuencia de ello se repite la dosis de Dexametasona y se solicita un control cada 48 horas hasta la espera de los exámenes realizados días anteriores.

Siete días posteriores a la toma de muestras, los resultados mostraron nódulos linfáticos reactivos en la citología, anemia hipocrómica, trombocitopenia en el hemograma y la bioquímica con hiperproteïnemia, con marcada hiperglobulinemia e hipoalbuminemia, leve aumento de la creatinemia y las enzimas hepáticas (ver anexo tablas 1 y 2).

Con los resultados a la vista y los signos clínicos del paciente existe la sospecha de una enfermedad autoinmune. Entonces se comienzan a administrarle Prednisolona 30 mg por día en la mañana, para un peso de 23,3 kg.

A fines de ese mes la piel presentaba mejorías y las úlceras muco-cutáneas de la boca habían desaparecido. Sin embargo una úlcera marcada en el centro del pulpejo del segundo dedo del miembro torácico derecho, fue el causante de la nueva consulta (ver anexo foto 9). Los nódulos linfáticos disminuyeron su tamaño, algunos a la mitad como los cervicales superficiales y sensiblemente los poplíteos. Mejoró su apetito, al igual que el sensorio y aumento de peso a 23,7 kg. Con lo cual se decide no modificar el tratamiento y que vuelva a control en una semana.

Al cabo de 7 días su estado general continuaba mejorando. En la piel ya no se encuentran lesiones y la úlcera digital cicatrizó. Salvo los nódulos linfáticos cervicales superficiales que aún continúan disminuyendo de tamaño, el resto de ellos alcanzó su tamaño normal. Su peso siguió aumentando, alcanzando 24.3kg. No hay modificaciones en el tratamiento y nuevamente se indica un control clínico a los 10 días.

A mediados del mes de abril de ese año, el estado general del paciente estaba notoriamente mejor. Sus nódulos linfáticos volvieron al tamaño normal, a excepción del cervical superficial derecho aun levemente aumentado. Su peso fue de 25.2kg. Se fija un nuevo control pasado 10 días, sin cambios en el tratamiento.

A los 8 días, fue evidente una notoria mejoría clínica y su peso ha ascendido a los 28.3kg. Al ser muy importante su mejoría se toma la decisión de disminuir la dosis de Prednisolona, alternándose diariamente 30 y 20 mg por vía oral. La paciente debe volver a los 10 días.

Al disminuir la dosis del corticoide, se presenta un aumento de tamaño del nódulo linfático cervical superficial derecho, en el control siguiente. Se advierte la presencia

de una alopecia circular de unos 10cm de diámetro en la región lumbar izquierda, nuevamente el signo de alopecia peri-ocular y piodermia muco-cutánea en ambas comisuras de la boca, al igual que hiperqueratosis en las almohadillas de los miembros torácicos. El peso sigue en aumento, llegando a 29.4kg. Al existir la aparición de estos signos se decide retomar la dosis de 30mg diarios de Prednisolona.

Al quinto día de administrarle la nueva dosificación del corticoide su nódulo linfático volvió a su tamaño normal, manteniéndose las alopecias. Su peso sigue en aumento, en ese momento con 29.5kg. No se modifica la dosificación y se fija una próxima consulta.

A las dos semanas siguientes la alopecia lumbar siguió en aumento y el pelo de la periferia de la misma se desprende fácilmente a la tracción. Su nódulo linfático nuevamente ganó tamaño. El estado general, apetito y sensorio se mantuvieron normales. En esta primera vez desde instaurado el tratamiento su peso disminuyó a 28.6kg. Por la caída de peso, la alopecia y la variación del tamaño del nódulo se aumenta la dosis de Prednisolona a 40 mg en la mañana dosis total.

La primera semana del mes de julio los signos dermatológicos reaparecen a pesar de haber aumentado la dosis del inmunomodulador y pueden verse en el dorso del paciente lesiones de aspecto vesículo-ulceativas de un diámetro de 6cm (ver anexo fotos 10 y 11). Conjuntamente se prestan úlceras en labios y almohadilla digital.

Nuevamente su carpo izquierdo presentaba dolor e hipertermia, lo cual se manifestaba con claudicación del miembro en el momento del apoyo. La linfadenomegalia es notoria en los poplíteos, cervical superficial derecho y mandibular ipsilateral. Su sensorio decae al extremo de provocar anorexia en el paciente.

En este momento y por primera vez se toma una muestra para histopatología del borde de una de las lesiones ubicadas en el dorso del paciente. Sangre para hemograma y bioquímica, es extraída para tener un aspecto más certero de la enfermedad y su decaimiento a pesar del tratamiento.

Se realiza otra ecografía abdominal, la cual refuerza a la realizada anteriormente donde la única alteración observada fue la esplenomegalia moderada.

Un nuevo aumento de la dosis de Prednisolona a 60mg diarios y el agregado de Cefalexina 750 mg cada 12 hs fue la prescripción.

Los nuevos resultados de sangre obtenidos 18 días después no tienen demasiado cambios en relación al anterior, anemia hipocrómica, hipoproteinemia (hipoalbuminemia) y las enzimas hepáticas un discreto incremento (ver anexo tablas 3 y 4).

En el histopatológico hay leve a moderada foliculitis supurativa, donde el cuadro corresponde a un proceso inflamatorio principalmente a nivel folicular de tipo supurativo.

Clínicamente las lesiones dérmicas del dorso están resolviendo y cubiertas por una costra cicatrizal. No se indican cambios en la terapia.

El 7 de septiembre del 2011, un mes y diez días de la última visita las lesiones dermatológicas del dorso cicatrizaron completamente, aunque permanecía la alopecia a lo largo de la región. Pero la úlcera digital se mantuvo sin cambios. Los linfonódulos disminuyeron de tamaño.

El deambular era dificultoso dado por la claudicación del miembro torácico izquierdo, por la presencia de la artritis crónica del carpo.

El antibiótico es suspendido por la mejoría de la piel, sin variar la dosis de Prednisolona.

A los 15 días, una nueva muestra de sangre para medición de proteínas plasmáticas y celularidad sanguínea es obtenida. A los ocho días el hemograma era normal y únicamente hipoalbuminemia e hiperglobulinemia, fueron las alteraciones (ver anexo tablas 5 y 6).

Clínicamente la variación presente en ese momento, fue una poliartritis, ahora también con claudicación posterior derecha, al estar involucrado el tarso de dicho miembro, lo cual provocaba gran dificultad para la traslación del animal. La ulceración en la almohadilla digital no tiene resolución y se evidencia la presencia de excesivo crecimiento ungueal (onicogrifosis) (ver anexo foto 12).

Nuevamente se inicia antibioticoterapia, en dicha oportunidad con Enrofloxacin 150 mg dos veces al día y disminuir corticoterapia alternando 50 y 45 mg diariamente.

Unos días más tarde una nueva leve disminución de la Prednisolona a 40 mg diarios es instaurada con un peso de 31,4kg.

A los 11 días los signos de poliartritis desaparecieron, manteniéndose la claudicación del miembro anterior y la úlcera digital. Es suspendida la terapia antibiótica.

Casi un mes de la última consulta al ver que el paciente estaba estable en todos sus aspectos, se vuelve a disminuir a 30 mg diarios el inmunomodulador.

Al tercer día de la nueva dosis terapéutica, aparece disminución del apetito, la claudicación continua instaurada y nuevamente presenta ulceraciones en la mucosa oral.

Este día con la sedación del paciente, se realiza una biopsia de las úlceras bucales con punch número 6 y anestesia local, dichas muestras son remitidas a la ciudad de Buenos Aires para el estudio histopatológico de las mismas.

En suma al cabo de un año y ocho meses la paciente presentó los signos de manera reiterada, rondando siempre en signos generales de anorexia, decaimiento, pérdida de peso, linfadenomegalia, claudicaciones por artritis en diferentes articulaciones y como signos dermatológicos, onicogrifosis, la presencia de lesiones ulcerativas de forma reiterada en almohadilla digital y unión muco-cutánea oral.

Luego de tantas instancias por llegar a un diagnóstico definitivo, con la última muestra tomada de la mucosa y su histopatología, se informa la presencia de abundantes amastigotes de *Leishmania* en el interior de los macrófagos. Así se llega a un diagnóstico definitivo de Leishmaniosis.

El 12 de diciembre del año 2011 y por ser una enfermedad de denuncia obligatoria, se realiza la misma con los resultados a la vista ante el Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca en el servicio Ganadero.

Al segundo día de realizada la denuncia, nuevos estudios paraclínicos como radiografía del carpo izquierdo, ecografía abdominal, extracción de sangre para hemograma, bioquímica, punción aspiración con aguja fina del nódulo linfático poplíteo y serología previo al comienzo del tratamiento.

En la radiografía del carpo se evidencia una enfermedad degenerativa articular (ver anexo foto 13). En la bioquímica puede visualizarse aumento de la Fosfatasa alcalina y la aspartato aminotransferasa (AST), no encontrándose alteraciones en el hemograma (ver anexo tabla 7 y 8).

Se comienza con Allopurinol 300mg 1 comprimido cada 12 hs. y disminuir gradualmente la dosis de Prednisolona, con el agregado de Ranitidina 75 mg cada 12 hs.

Al mes de comenzado el nuevo tratamiento, por primera vez se puede visualizar un aspecto muy mejorado del paciente, tanto desde el punto de vista de su estado general como cutáneo. El corticoide se fue disminuyendo de forma gradual hasta este momento, en el cual se toma la decisión de su eliminación de forma permanente.

La semana anterior a la finalización del mes de enero se comienza la administración de Antimoniato de meglumine, a una dosis de 100 mg/kg diarios vía sub-cutánea, en combinación con allopurinol. Previo al comienzo del tratamiento con Glucantime se extrae sangre para hemograma, funcional hepático y evaluación de función renal.

A los tres días los exámenes de sangre muestran hipoproteïnemia con hipoalbuminemia, la AST y Fosfatasa alcalina se encuentran levemente aumentadas (ver anexo tablas 9 y 10). Se realiza una radiografía de caderas, al manifestar gran dificultad en el momento de incorporarse, a demás de rechazo al caminar.

En la radiografía fue evidente la presencia de una displasia coxofemoral bilateral muy avanzada. Se Instaura la administración de un antiinflamatorio (AINE) Firocoxib a razón de 5 mg/kg diarios.

El penúltimo día de ese mes el paciente se encuentra decaído, disminuyendo el apetito desde hace 2 días, conjuntamente con la presencia de sedimento en la orina. Presentó vómitos y deposiciones blandas con sangre.

Al día siguiente el paciente fallece y su cuerpo es depositado en una cámara de frío a 4 grados centígrados, para 24 hs más tarde realizarle la necropsia.

5. RESULTADOS

Obtener el diagnóstico definitivo fue la primera meta fijada, debido a que instancias anteriores no revelaron la etiología del presente caso. Dicho diagnóstico se obtuvo mediante la identificación de amastigotes de *Leishmania* a partir de la histopatología de las úlceras de la mucosa oral (ver anexo fotos 14, 15, 16 y 17).

Para complementar el diagnóstico, la serología positiva realizada en el exterior, así como la citología por punción aspiración con aguja fina de nódulos linfáticos reafirmaron la presencia del agente causal (ver anexo fotos 18 y 19).

El test de ELISA mostró un resultado positivo con una densidad óptica de 0,373, lo que concluye en un resultado altamente positivo, al encontrarse por encima del punto de corte de 0,1904.

En base a la bibliografía consultada se decide instaurar la terapia combinada de Antimoniato de meglumina y Allopurinol. En vista que la primera no está disponible en nuestro país para su comercialización y por no existir en el vademécum veterinario, se comenzó el tratamiento en su inicio únicamente con Allopurinol, por ser el único fármaco de fácil acceso y poco oneroso para comenzar la terapia.

Luego de un mes de iniciado este tratamiento se pudieron observar notorias mejorías del paciente, tanto de su estado general, cutáneo y en su bioquímica sanguínea.

Se vio mejoría en el sensorio del animal, así como en su apetito y estado corporal. Las úlceras de la mucosa oral remitieron en su totalidad y los nódulos linfáticos se redujeron a su tamaño normal, manteniéndose así durante el tratamiento. Sobre el dorso del paciente hubo recrecimiento piloso en las áreas alopecias (ver anexo fotos 20, 21, 22, 23 y 24).

En la bioquímica hubo disminución en la AST y Fosfatasa alcalina, cayendo a casi valores normales (ver anexo tabla 10).

Tras obtenerse el Antimoniato de meglumina (Glucantime) y a los 45 días de iniciado el tratamiento con Allopurinol, se comienza su administración. Luego de administrar 14 ampollas del Glucantime, lo que equivale a 7 días de terapia en conjunto con Allopurinol, el paciente comenzó a manifestar dolor abdominal, vómitos, diarrea con sangre, notoria depresión y anorexia. A raíz de este cuadro de gastroenteritis hemorrágica la paciente fallece e inmediatamente se decide realizar la necropsia en busca de la causa del deceso.

Al realizar la autopsia las lesiones principales fueron vistas en su aparato digestivo, observándose disminución del espesor de la pared del estómago con ulceraciones varias y la presencia de un contenido hemorrágico que implicaba el antro pilórico y primera porción del intestino delgado (ver anexo fotos 25 y 26).

Dado que el tratamiento con este fármaco se realizó solamente por una semana no fue posible evaluar los resultados de la terapia que combina ambas drogas, como es sugerido en la bibliografía.

6. DISCUSIÓN

Si bien el diagnóstico de Leishmaniosis no es difícil de realizar en zonas endémicas, en el presente caso existieron dificultades al momento del diagnóstico, por varias razones.

En primera instancia la falta de experiencia en enmarcar el conjunto de signos clínicos que manifiestan los pacientes con esta enfermedad y ellos ser compatibles con otras entidades, hace que esta enfermedad sea subestimada en un diagnóstico diferencial preliminar.

Conjuntamente con lo anterior es importante destacar que si bien contamos con métodos utilizados de rutina para llegar a un diagnóstico definitivo como son la citología e histopatología, notamos que existe falta de experiencia en la identificación de los amastigotes de *Leishmania* en las muestras a estudiar.

Esto último se vio reflejado en el estudio de este caso en los primeros intentos por llegar al diagnóstico, al realizar la punción aspiración con aguja fina de nódulos linfáticos su estudio citológico reflejo una hiperplasia reactiva. Similar situación ocurrió al momento de realizar la primera biopsia de piel, donde no fueron encontrados los amastigotes. Si bien en esta instancia puede existir otra variante, quizás debido a que las muestras no hayan sido tomadas de las lesiones más representativas.

Por lo expresado anteriormente se tomó la decisión de extraer nuevas muestras para histopatología de lesiones más representativas. Por ello se biopsio las lesiones ulcerativas de la mucosa oral, siendo las mismas enviadas a un laboratorio de referencia en la ciudad de Buenos Aires con mayor experiencia en histopatología dermatológica y en el diagnóstico de Leishmaniosis.

Una vez obtenido el diagnóstico definitivo, con el interés de indagar más en el estudio del caso clínico, se decidió realizar la cuantificación de los niveles de anticuerpos anti-leishmania, mediante la técnica de ELISA. Al enfrentarnos a la situación de que hasta el momento en nuestro país no existe un laboratorio veterinario privado u oficial que preste servicios de diagnóstico serológico tanto por ELISA como IFI específicamente para el diagnóstico de Leishmaniosis, se envió suero del paciente a un laboratorio en la ciudad de San Pablo con dicho objetivo.

En el Norte Argentino se utiliza uno de los tests rápidos como herramienta diagnóstica, el cual si bien presenta baja sensibilidad y especificidad, ellos lo utilizan en conjunto con la citología de ganglios y médula ósea para arribar al diagnóstico definitivo, considerando positivos aquellos pacientes que presenten amastigotes en las muestras citológicas acompañados o no por un test rápido afirmativo, y negativos a los pacientes en los que ambas instancias no son confirmatorias, sin embargo si un paciente presenta un test rápido positivo y una citología negativa será considerado sospechoso, realizándose posteriormente nuevas punciones para confirmar o no el caso.

Esta metodología diagnóstica es factible de adoptar en nuestro país, ya que no es necesario tener un laboratorio con gran tecnología montado e incluso podría ser

realizado en cualquier veterinaria. Lo que es imprescindible es tener un microscopio con buena resolución y técnicos capacitados en la identificación de los amastigotes en muestras citológicas, además de contar con algún tests rápido para serología, los cuales son de realización muy sencilla. Hoy en día en nuestro país contamos con un laboratorio veterinario que realiza la detección por medio de la utilización de estos tests rápidos (Speed Leish-K) para detectar anticuerpos anti-leishmania.

En relación al tratamiento, se decidió utilizar la asociación de Antimoniato de meglumina con Allopurinol por 30 días, continuando por tiempo indeterminado con este último. Al disponer solo hasta la fecha del Allopurinol en nuestro país, se comenzó el tratamiento en su inicio con dicho fármaco.

Si bien con la utilización de este fármaco se logró alcanzar una importante mejoría clínica, se presentó la posibilidad de asociarlo con Antimoniato de meglumina. Como dicha asociación pudo ser empleada solamente por un periodo de 7 días, dado el fallecimiento del paciente, y no de 30 días como indica la bibliografía consultada no se pudo evaluar una respuesta para dicha asociación.

Teniendo en cuenta que se realizó previamente al comienzo de la administración de Glucantime una bioquímica necesaria para valorar la funcionalidad renal, indispensable para la administración del fármaco, la cual no mostro alteración de dicha funcionalidad, y observarse en la necropsia únicamente una alteración gastrointestinal, nos queda la interrogante de cual pudo ser la causa del fallecimiento y de la vinculación del Glucantime con la misma.

Si bien en nuestro país no existe legislación que prohíba el uso de Antimoniales pentavalentes para el tratamiento de la Leishmaniosis canina, Brasil y Argentina presentan legislación sanitaria vinculada a esta enfermedad en caninos.

En Brasil el ministerio de salud prohíbe en el art. 1 de la ley 1426 del 11 de julio del 2008, que en todo el territorio nacional el tratamiento de la Leishmaniosis en caninos infectados o enfermos con productos de uso humano, o no registrados en el Ministerio de Agricultura, Pesca y Abastecimiento (MAPA).

Este artículo se basa en las siguientes consideraciones: primero que hasta el momento no existe ningún fármaco o esquema terapéutico que garantice la eficacia del tratamiento en caninos y su riesgo de transmisión, segundo que los caninos en tratamiento pueden mantenerse como reservorios y fuentes de infección para el vector por falta de evidencia científica que garantice la reducción o interrupción de transmisión, y por último la posibilidad de inducir a selección de cepas resistentes a dichos medicamentos disponibles para el tratamiento de Leishmaniasis en el hombre.

En Argentina existe una amplia legislación vinculada a la Leishmaniasis visceral, como ser la Ley 15.465/1960 del Congreso Nacional que establece la denuncia obligatoria de la Leishmaniasis, el Decreto Nacional 3640/1964 del Poder Ejecutivo que establece las responsabilidades del Médico, Veterinario y Laboratorista, y la Resolución 36/1999 de la Secretaría Programas de Salud quien estableció el Programa Nacional de Leishmaniasis, el cual actualmente está en proceso de revisión (Salomón, 2012).

Este último tiene como objetivo eliminar o mitigar las condiciones que permiten la producción y reproducción de la Leishmaniasis visceral humana (LVh), para ello se establece la vigilancia de Leishmaniasis visceral, que comprende la vigilancia clínica de casos humanos, de casos caninos y la vigilancia entomológica. Esta es una actividad continua, que incluye simultáneamente el diagnóstico temprano y tratamiento oportuno de casos humanos, el control de reservorios, el manejo ambiental (áreas públicas y privadas) y el control del vector.

La vigilancia según métodos y registros estandarizados permite: estratificar las áreas según el riesgo de transmisión de LV humana, determinar el sitio probable de infección (LV autóctona /importada), disminuir morbilidad - mortalidad humana mediante el diagnóstico temprano y tratamiento oportuno, diseñar e instrumentar las medidas apropiadas de prevención y control según riesgo de transmisión, investigar transmisión atípica, efectos adversos y fallas terapéuticas, conocer la tendencia de la incidencia en tiempo y espacio, y finalmente evaluar el impacto de las medidas de control.

De acuerdo a este programa, se estratifican las áreas según el riesgo de transmisión para posteriormente tomar acciones preestablecidas según los distintos escenarios de transmisión. El presente programa clasifica las distintas áreas según el riesgo de transmisión en: área en brote, área con transmisión intensa, área con transmisión moderada, área con transmisión esporádica, área con transmisión incipiente de LV humana, área con transmisión de LV canina, área receptiva y área vulnerable. Entendiéndose como:

Área en brote: área con transmisión humana con un número de casos de LV significativamente superior a la media de los últimos 3 años, o área de transmisión reciente con dos o más casos de LV humana notificada presumiblemente de transmisión autóctona.

Área con transmisión intensa: área con una media ≥ 5 casos/año de LV humana en los últimos 3 años.

Área con transmisión moderada: área con una media ≥ 2 y < 5 casos/año de LV humana en los últimos 3 años.

Área con transmisión esporádica: área con una media ≥ 0.3 y < 2 casos/año de LV humana en los últimos 3 años.

Área con transmisión incipiente de LV humana: área con primer caso de LV notificado de transmisión autóctona humana, o área con una media < 0.3 casos/año de LV humana en los últimos 3 años.

Área con transmisión de LV canina: área con al menos un caso de LV notificado de transmisión autóctona canina, y presencia verificada de *Lutzomyia longipalpis*.

Área receptiva: área con presencia verificada de *Lutzomyia longipalpis*, sin casos de LV humana o canina autóctona.

Área vulnerable: área sin casos de LV humana o canina autóctona, ni presencia de *Lutzomyia longipalpis*, pero contigua a áreas con casos de LV o con flujo migratorio intenso con éste (pueden existir canes infectados por transmisión no autóctona o no vectorial).

En lo que respecta al control del reservorio (canino) en este Programa, comprende: tenencia y procreación responsable (la erradicación de perros ambulantes y sin dueño es condición necesaria para que cualquier intervención de prevención y control sea efectiva, se establecen programas de castración/adopción), promoción de prevención sanitario-ambiental (que la mayoría de perros que son sanos, sigan estando sanos), evitar transporte de perros desde y hacia las zonas con transmisión de Leishmaniasis visceral, certificación de libre de parásitos de *Leishmania* en todo perro adoptado, cachorro o adulto (vecino-criadero-importado) y finalmente se establece la eutanasia de perros proveedores de parásitos *L. infantum/chagasi* (infectados) con o sin síntomas, mediante procedimientos humanitarios, según normativa de OIE. Si bien se demostró que la eutanasia en países en situación endémica como Brasil es ineficaz, ya que tal vez los cánidos salvajes, así como una población de perros vagabundos u otros animales posibles reservorios, pueden ser fuentes de transmisión de los parásitos (Green, 2008; Solano-Gallego et al., 2009).

No se recomiendan los tratamientos para Leishmaniosis canina como medida de control o prevención de casos humanos. No existe evidencia que disminuya el riesgo de transmisión a nivel comunitario, pues animales con cura clínica persisten como reservorios del parásito y suelen presentar recidivas. El uso en animales de los medicamentos (principios activos) destinados al tratamiento de LVh puede generar cepas resistentes. Las drogas distribuidas por el Ministerio de Salud de la Nación son de uso exclusivo para casos humanos, no deben derivarse para el tratamiento de animales domésticos. Los tratamientos de Leishmaniosis canina no han demostrado en América Latina ser una medida efectiva de control o prevención de casos humanos. Todo tratamiento se debe enmarcar en el diseño experimental y consideraciones éticas de ensayo clínico, sin exposición de riesgo para la población.

En Uruguay, por el contrario, no existe legislación sanitaria veterinaria específica relacionada al Leishmaniosis, salvo el artículo 2 de la ley 3.606 del 13 de abril de 1910, el cual hace referencia a la denuncia obligatoria de esta enfermedad frente a los servicios ganaderos del MGAP. En este artículo se incluye por medio del decreto 351/994 aprobado el 9 de agosto de 1994 a la Leishmaniosis en la lista de enfermedades de denuncia obligatoria.

Si tomamos como ejemplo el Programa Nacional de Leishmaniosis existente en Argentina desde el año 2009 y teniendo en cuenta la presencia confirmada de *Lutzomyia longipalpis* en nuestro país, en los departamentos de Salto y Artigas (Salomón et al., 2011), los cuales se encuentran próximos a zonas endémicas, como son el Norte Argentino y Sur de Brasil, junto al tránsito de personas y mascotas en la frontera, asociado con el diagnóstico de casos importados en caninos y humanos se

podría clasificar a nuestro país como área receptiva para la transmisión de Leishmaniasis visceral.

Por lo tanto, debería existir en nuestro país un marco regulatorio frente a esta zoonosis, más que la sola denuncia obligatoria de la misma, como ser: medidas a tomar frente a un diagnóstico confirmado, aquellas que involucren tratamiento, control de la enfermedad y medidas preventivas a ser aplicadas con el objetivo de evitar la expansión de la misma.

Teniendo en cuenta las acciones dispuestas según el escenario de transmisión en el Programa Nacional de Leishmaniasis de la legislación Argentina, y considerando a nuestro país como un área receptiva para la transmisión de esta enfermedad, se podrían tomar las siguientes acciones:

- 1) Capacitar y organizar el sistema asistencial para la captación, diagnóstico, tratamiento y notificación de LV humana.
- 2) Capacitar y organizar el sistema intersectorial para la captación, diagnóstico, control y notificación de reservorios infectados (errantes, comunitarios, con dueño).
- 3) Comunicar a la comunidad las medidas de prevención, manejo ambiental, tenencia y reproducción responsable de mascotas, tránsito y tráfico de mascotas (evitar transporte de perros desde y hacia las zonas con transmisión de LV).
- 4) Saneamiento ambiental en ámbito público.
- 5) Control de población canina errante y sin dueño, la erradicación de perros ambulantes y sin dueño es condición necesaria para que cualquier intervención de prevención y control sea efectiva, programas de castración/adopción.
- 6) Certificación de canes adoptados como "Libre de *L. infantum/chagasi*" por laboratorio certificado.
- 7) Monitoreo serológico canino por muestro estratificado en áreas con vector, como es el caso de los departamentos de Salto y Artigas.

Además dada la confirmación del caso en la presente tesis, por más que el mismo no sea autóctono, debería haberse planteado por parte de las autoridades sanitarias de nuestro país un relevamiento entomológico de la zona donde residía la paciente para definir la presencia o ausencia de *Lutzomyia Longipalpis* en dicha área.

7. CONCLUSIÓN

En conclusión es importante destacar la inexperiencia clínica, citológica e histopatológica, en relación a la Leishmaniosis en nuestra profesión por tratarse de una enfermedad hasta el momento no diagnosticada en nuestro país. Esto sumado a la falta de algunos métodos como ser ELISA, IFI y PCR utilizados para la detección de la enfermedad, hace muy dificultoso poder alcanzar un diagnóstico definitivo.

Debería existir en nuestro país un marco regulatorio que legisle la metodología diagnóstica a seguir frente a un caso sospechoso de Leishmaniosis. Que hacer frente a un diagnóstico confirmado, en relación a su tratamiento, control de la enfermedad y medidas preventivas a ser aplicadas con el objetivo de evitar la expansión de la misma.

Hoy en día existe en nuestro país el riesgo potencial de transmisión de la Leishmaniasis visceral, por constatare la presencia del vector (*Lutzomyia longipalpis*) en los departamentos de Salto y Artigas, los cuales se encuentran próximos a zonas endémicas, como son el Norte Argentino y Sur de Brasil. Lo antes mencionado, en conjunto con el movimiento de personas y perros a lo largo de la frontera, y la ausencia de legislación que controle el estado sanitario al ingreso de animales provenientes de dichas regiones, hacen a nuestro país muy vulnerable para el ingreso de esta zoonosis.

Teniendo en cuenta la experiencia obtenida durante el estudio de esta enfermedad y dada la situación epidemiológica regional y nacional, sumada a la rápida expansión de la misma hacia el sur del continente, es muy probable en un futuro no muy lejano estar conviviendo junto a la Leishmaniasis visceral.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. (2008). *Inmunología celular y molecular*. 6a. ed. Barcelona. Elsevier, 572p.
2. Alvar J, Nieto J. (2001). *Leishmaniasis canina, en las leishmaniasis: de la biología al control*. 2ª ed. Laboratorios Intervet, 95p.
3. Beach R, Kiilu G, Leeuwenburg J. (1985). Modification of sand fly biting behaviour by *Leishmania* leads to increase parasite transmission. *Am J Trop Med Hyg*; 34:278-282.
4. Bongiorno G, Habluetzel A, Khoury C, Maroli M. (2003). Host preferences of phlebotomine sand flies at a hypoendemic focus of canine leishmaniasis in central Italy. *Acta Trop*; 88: 109-116.
5. Borja-Cabrera GP. (2002). Long lasting protection against kala-azar using the FML-QuilA saponin vaccine in an endemic area of Brazil. *Vaccine*; 20: 3277-3284.
6. Borja-Cabrera GP. (2008). Immunogenicity assay of the Leishmune vaccine against canine visceral leishmaniasis in Brazil. *Vaccine*; 26: 4991-4997.
7. Chang PCH. (1956). The ultrastructure of *Leishmania donovani*. *J.Parasitol*; 42:126-136.
8. Croft SL, Neal RA, Pndergast W, Chan JH. (1987). The activity of alkyl phosphocholines and related derivates against *Leishmania donovani*. *Biochem Pharmacol*; 36: 2633-2636.
9. De Colmenares M, Portus M, Botet J, Dobano C, Gallego M, Wolf M, Segui G. (1995). Identification of blood meals of *phlebotomus perniciosus* (Diptera: Psychodidae) in Spain by a competitive enzyme-linked immunosorbent assay biotin/avidin method. *J Med Entomol*; 32: 229-233.
10. Dedet JP, Pratlon F, Lanotte G. (1999). The parasite. *Clin Dermatol*; 17:261-268.
11. De Freitas E, Melo MN, Da Costa-Val AP, Michalick MS. (2006). Transmission of *Leishmania infantum* via blood transfusion in dogs: potential for infection and importance of clinical factors. *Vet Parasitol*; 137: 159–167.
12. Desjeux P. (2004). Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*; 27: 305–318.
13. Diniz SA, Melo MS, Borges AM, Bueno R, Reis BP, Tafuri WL, Nascimento EF, Santos RL. (2005). Genital lesions associated with visceral leishmaniasis and shedding of *Leishmania* sp. in the semen of naturally infected dogs. *Vet Pathol*; 42: 650-658.

14. Duthie MS, Raman VS, Piazza FM, Reed SG. (2012). The development and clinical evaluation of second-generation leishmaniasis vaccines. *Vaccine*; 30: 134-141.
15. Dyce KM, Sack WO, Wensing CJG. (1991). *Anatomía veterinaria*. Buenos Aires. Medica Panamericana, 845p.
16. Ferrer L, Roura X. (a). La serología y la leishmaniosis canina. Disponible en: argos.portalveterinaria.com/.../LEISHMANIA.../serología-leishmanio. Fecha de consulta: 10 de mayo del 2012.
17. Ferrer L, Roura X. (b). Tratamiento de la leishmaniosis canina. Disponible en: argos.portalveterinaria.com/.../LEISHMANIA.../tratamiento-leishman. Fecha de consulta: 15 de mayo del 2012.
18. Ferrer L. (c). Infección e inmunidad en la Leishmaniosis canina. Simpósio de Leishmaniose – ANCLIVEPA Minas Gerais 18-19 julho del 2009. Disponible en: www.anclivepa-mg.com.br/.../1_Infeccion_e_inmunidad_en_la_LCa. Fecha de consulta: 25 de abril del 2012.
19. Ferrer L. (d). Clasificación clínica y diagnóstico de la Leishmaniosis canina. Simpósio de Leishmaniose – ANCLIVEPA Minas Gerais 18-19 julho del 2009. Disponible en: www.anclivepa-mg.com.br/.../2_Diagnostico_y_classificacion_clinic Fecha de consulta: 25 de abril del 2012.
20. Ferrer L. (e). 10 preguntas claves en relación al diagnóstico de la Leishmaniosis canina. Simpósio de Leishmaniose – ANCLIVEPA Minas Gerais 18-19 julho del 2009. Disponible en: www.anclivepa-mg.com.br/.../3_10_preguntas_claves. Fecha de consulta: 25 de abril del 2012.
21. Ferrer L. (f). Problemas diagnósticos en la Leishmaniosis canina. Simpósio de Leishmaniose – ANCLIVEPA Minas Gerais 18-19 julho del 2009. Disponible en: www.anclivepa-mg.com.br/.../4_Problemas_en_el_diagnostico_de_la. Fecha de consulta: 25 de abril del 2012.
22. Ferrer L. (g). Tratamiento de la Leishmaniosis canina: el protocolo HCV-UAB. Simpósio de Leishmaniose – ANCLIVEPA Minas Gerais 18-19 julho del 2009. Disponible en: www.anclivepa-mg.com.br/.../5_tratamiento_de_la_LCa. Fecha de consulta: 25 de abril del 2012.
23. Francino O, Altet L, Sánchez-Robert E, Rodríguez A, Solano-Gallego L, Alberola J, Ferrer L, Sánchez A, Roura X. (2006). Advantages of real-time PCR assay for diagnosis and monitoring of canine leishmaniosis. *Vet Parasitol*; 137: 214-221.
24. Gállego M, Riera C. (2007). Barcelona: Facultad de Farmacia, Universidad de Barcelona. Disponible en: www.bvs.insp.mx/articulos. Fecha de consulta: 2 de julio del 2012.

25. García Almagro D. (2004). Leishmaniasis cutánea: estudio en el área sanitaria de Toledo. Tesis doctoral. Universidad Complutense de Madrid. 196p. Disponible en: www.ucm.es/BUCM/tesis/med/ucm. Fecha de consulta 10 de abril del 2012.
26. Gardener PJ, Chance ML, Peters W. (1974). Biochemical taxonomy of Leishmania. II Electrophoretic variation of malate dehydrogenase. *Ann Trop Med Parasit*; 68:317- 325.
27. Gil Collado J, Morillas F, Sánchez MC. (1989). Los flebótomos en España. *Rev San Hig Pub*; 63:15-34.
28. Godfrey DG. (1979). The zymodemes of trypanosomes. Problems in the identification of the parasites and their vectors. *Proceedings of the Symposium of the British Society of Parasitology*; 17:31-53.
29. Gonçalves R, Vieira ER, Melo MN, Gollob KJ, Mosser DM, Tafuri WL. (2004). A sensitive flow cytometric methodology for studying the binding of *L. chagasi* to canine peritoneal macrophages. *BMC Infectious Diseases* 5. Disponible en: www.biomedcentral.com. Fecha de consulta: 25 de marzo del 2012.
30. González González G, Rodríguez González C, Simón Merchán A. (1976). Morfología de la leishmania trópica en su estado intracelular en la dermis humana. *Actas Dermo Sif*; 67:527-34.
31. Greene CE. (2008). *Enfermedades infecciosas del perro y el gato*. 3a. ed. Buenos Aires. Intermédica, 1500p.
32. Hernández JR, Becker I. (2006). Linfocitos Tcitotóxicos CD8+ en la leishmaniasis cutánea. *Rev Salud Pú b México* 48:430-439.
33. Huaynates Orellana GM. (2009). *Leishmaniasis canina*. Tesis para optar el título profesional de Médico Veterinario. 123p. Disponible en: www.cybertesis.edu.pe. Fecha de consulta: 30 de mayo del 2012.
34. Ikeda-Garcia FA, Lopes RS, Marques FJ, De Lima VM, Morinishi CK, Bonello FL, Zanette MF, Perri SH, Feitosa MM. (2007). Clinical and parasitological evaluation of dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi* submitted to treatment with meglumine antimoniate. *Vet Parasitol*; 143: 254–259.
35. Killick-Kendrick R, Wilkes TJ, Bailly M. (1986). Preliminary field observations on the flight speed of a phlebotomine sandfly. *Trans R Soc Trop Med Hyg*; 80:138-42.
36. Killick-Kendrick R. (1999). *The Biology and control of Phlebotomine Sand Flies*. *Clin Dermatol*; 17:279-89.
37. Kamhawi S. (2000). The biological and immunomodulatory properties of sand fly saliva and its role in the establishment of *Leishmania* infections. *Microbes Infect*; 2: 1765-1773.

38. Lane RP. (1993). Sandflies (Plebotominae). En: Lane R.P. Crosskey R.W. eds. *Medical insects and arachnids*. London: Chapman; p. 78-119.
39. Magno da Silva S, Ribeiro VM, Ribeiro RR, Tafuri WL, Melo MN, Marques Michalick MS. (2009). First report of vertical transmission of *Leishmania infantum* in a naturally infected bitch from Brazil. *Vet Parasitol*; 166: 159-162.
40. Manna L, Reale S, Vitale F, Picillo E, Pavone LM, Gravino AE. (2008). Real-time PCR assay in *Leishmania*-infected dogs treated with meglumine antimoniate and allopurinol. *Vet J*; 177: 279–282.
41. Manual de la OIE sobre animales terrestres (2008). Disponible en: www.oie.int/fileadmin/Home/esp/. Fecha de consulta: 10 de julio del 2012.
42. Marfurt J, Niederwieser I, Makia ND. (2003). Diagnostic genotyping of Old and New World *Leishmania* species by PCR-RFLP. *Diagn Microbiol Infect Dis*; 46:115-124.
43. Maroli M, Pennisi MG, Gramiccia M, Di Muccio T, Khoury C, Lo Giudice S, Gradoni L. (2006). First report of experimental leishmania infection in *Phlebotomus perniciosus* fed on a cat with natural acquired leishmaniasis in Italy. *Parasitol* 48: 322-328.
44. Martín-Sánchez J, Acedo C, Muñoz-Pérez M, Pesson B, Marchal O, Morillas-Márquez F. (2007). Infection by *leishmania infantum* in cats: Epidemiological study in Spain. *Vet Parasitol*; 145: 267-273.
45. McMahon Pratt D, David JR. (1981). Monoclonal antibodies that distinguish between New World species of *Leishmania*. *Nature*; 291:581-583.
46. McMahon Pratt D, Jaffé CL, Bennett E. (1986). Studies employing monoclonal antibodies for the analysis of the genus *Leishmania* Ross, 1903. En: Rioux JA ed. *Leishmania. Taxonomie et phylogénèse*. Montpellier; 173-178.
47. Mendes CO. (2003). IgG1/IgG2 antibody dichotomy in sera of vaccinated or naturally infected dogs with visceral leishmaniasis. *Vaccine*; 21: 2589-2597.
48. Miles SA, Conrad SM, Alves RG, Jeronimo SM, Mosser DM. (2005). A role for IgG immune complexes during infection with the intracellular pathogen *Leishmania*. *J Exp Med*; 201:747-754.
49. Niederwieser I. (2004). *Leishmania infantum*: molecular analysis for identification of potential virulence factors and genes of diagnostic use. Inaugural dissertation Philosophisch Naturwissenschaftlichen Fakultät. Basel: Fakultät der Universität Basel. 65p. Disponible en: edoc.unibas.ch/440/1/Dissb_7571.pdf. Fecha de consulta: 2 de agosto del 2012.

50. Nogueira FS. (2005). Leishmune vaccine blocks the transmission of canine visceral leishmaniasis. Absence of *Leishmania* parasites in blood, skin and lymph nodes of vaccinated exposed dogs. *Vaccine*; 23: 4805-4810.
51. Organizacion Mundial de la Salud. Disponible en: www.who.int/leishmaniasis. Fecha de consulta 1 de agosto de 2012.
52. Owens SD, Oakley DA, Marryot K, Hatchett W, Walton R, Nolan TJ, Newton A, Steurer F, Schantz P, Giger U. (2001). Transmission of visceral leishmaniasis through blood transfusions from infected English foxhounds to anemic dogs. *J Am Vet Med Assoc*; 219: 1076-1083.
53. Pacheco da Silva JP, Arredondo C, Tricca G, Pedrana G. (2009). Leishmaniasis en Uruguay: Descripción de un caso clínico en canino y su diagnóstico Histopatológico. Disponible en: www.veterinaria.org/revistas/redvet. Fecha de consulta 26 de febrero del 2012.
54. Palatnik de Sousa CB. (2004). Protective vaccination against murine visceral leishmaniasis using aldehydecontaining *Quilaja saponaria sapogenins*. *Vaccine*; 22: 2470-2479.
55. Palatnik de Sousa CB. (2008). FML vaccine against canine visceral leishmaniasis: from second-generation to synthetic vaccine. *Expert Rev Vacc*; 7: 833-851.
56. Pangrazio KK, Costa EA, Amarilla SP, Cino AG, Silva TMA, Paixao TA, Costa LF, Dengues EG, Ruiz Diaz AA, Santos RL. (2009). Tissue distribution of *Leishmania chagasi* and lesions in transplacentally infected fetuses from symptomatic and asymptomatic naturally infected bitches. *Vet Parasitol*; 165: 327-331.
57. Pérez Tort G, Marchesi D. (2009). Miltefosina: Una nueva alternativa para el tratamiento de la leishmaniasis canina. Perfil farmacológico. *Rev Vet Arg*. Disponible en: www.veterinariaargentina.com. Fecha de consulta: 23 de junio del 2012.
58. Plumb DC, Pharm D. (2010). Manual de farmacología veterinaria. 6a Ed. Buenos Aires. Intermédica, 1239p.
59. Portus M, Gallego M, Riera C, Aisa MJ, Fisa R, Castillejo S. (2002). Wild and domestic mammals in the life cycle of *leishmania infantum* in Southwest Europe. A literature review and studies performed in Catalonia (Spain). *Rev Iber Parasitol*; 62:72-76.
60. Ribeiro RR, Moura EP, Pimentel VM, Sampaio WM, Silva SM, Schettini DA, Alves CF, Melo FA, Tafuri WL, Demicheli C, Melo MN, Frezard F, Michalick MS. (2008). Reduced tissue parasitic load and infectivity to sand flies in dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi* following treatment with a liposome formulation of meglumine antimoniate. *Antimicrob Agents Chemother*; 52: 2564-2572.

61. Ramírez MA, Ortega PS, Robledo SR. (2006). Efecto de la interleuquina-1 y el factor de necrosis tumoral alfa en la inducción de la respuesta inmune adquirida durante la infección por *Leishmania (Viannia) panamensis*. *Rev Méd Univ Ind San*; 19(4):251-265.
62. Ribeiro JMC, Vachereau A, Modi GB. (1989). A novel vasodilatory peptide from the salivary glands of the sand fly *Lutzomyia longipalpis*. *Science*; 243: 212-214.
63. Ribeiro JMC, Katz O, Pannell LK. (1999). Salivary glands of the sand fly *Phlebotomus papatasi* contain pharmacologically active amounts of adenosine and 5' AMP. *J Exp Biol*; 202:1551-1559.
64. Rodríguez MG, Rodríguez WL. (2006). PCR en Tiempo Real. Disponible en: www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/.../realtime_pcr. Fecha de consulta: 30 de marzo del 2012.
65. Romero MH, López MC, Echeverry MC, Rivas F. (2009). Comparative Study of Serological Test for the Diagnosis of Canine Visceral Leishmaniasis: Technical Note. *Rev Cien FCV-LUZ*. 19(6): 584-588.
66. Romero Peñuela M, Sánchez Valencia J, Hayek Peñuela LC. (2010). Canine visceral Leishmaniasis diagnosis by means of western blot and indirect immunofluorescence test. *Ha Promoc Sal*. 15(1): 55-62.
67. Rosypal AC, Lindsay DS. (2005). Non-sand fly transmission of a north American isolate of *Leishmania infantum* in experimentally infected balb/c mice. *J Parasitol*; 91: 1113-1115.
68. Rosypal AC, Troy GC, Zajac AM, Frank G, Lindsay DS. (2005). Transplacental transmission of a North American isolate of *Leishmania infantum* in an experimentally infected beagle. *J Parasitol*; 91: 970-972.
69. Salomón OD, Basmajdian Y, Fernández MS, Santini MS. (2011). *Lutzomyia longipalpis* in Uruguay: the first report and the potential of visceral leishmaniasis transmission. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 106: 381-382.
70. Salomón OD. (2012). Leishmaniasis Visceral. Curso zoonosis emergentes y re-emergentes. Montevideo 29 de junio del 2012.
71. Santos WR. (1997). Haemolytic activities of plant saponins and adjuvants. Effect of *Periandra mediterranea* saponin on the humoral response to the FML antigen of *Leishmania Donovanii*. *Vaccine*; 15: 1024-1029.
72. Santos WR. (2002). Saponins, IL12 and BCG adjuvant in the FML-vaccine formulation against murine visceral leishmaniasis. *Vaccine*; 21: 30-43.

73. Schlein Y, Jacobsen RL, Messer G. (1992). Leishmania infections damage the feeding mechanism of the sandfly vector and implement parasite transmission by bite. *Proc Natl Acad Sci*; 89:9944-9948.
74. Scott DW, Miller WH, Griffin CE. (2002). *Dermatología en pequeños animales*. 6a. ed. Buenos Aires. Intermédica, 1572p.
75. Silva FL, Rodrigues AAM, Rego IOP, Santos RLH, Oliveira RG, Silva TMA, Xavier MN, Nascimento EF, Santos RL. (2008). Genital lesions and distribution of amastigotes in bitches naturally infected with *Leishmania chagasi*. *Vet Parasitol*; 156: 86-90.
76. Silva FL, Oliveira RG, Silva TMA, Xavier MN, Nascimento EF, Santos RL. (2009). Venereal transmission of canine visceral leishmaniasis. *Vet Parasitol*; 160: 55-59.
77. Silva VO. (2001). A phase III trial of efficacy of the FML vaccine against canine kala-azar in an endemic area of Brazil (São Gonçalo do Amarante, RN). *Vaccine*; 19: 1082-1092.
78. Solano-Gallego L, Llull J, Ramosa G, Riera C, Arboix M, Alberola J, Ferrer L. (2000). The Ibiza hound presents a predominantly cellular immune response against natural *Leishmania* infection. *Vet Parasitol*; 90: 37-45.
79. Solano-Gallego L, Koutinas A, Miró G, Cardoso L, Pennisi MG, Ferrer L, Bourdeau P, Oliva G, Baneth G. (2009). Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniasis. *Vet Parasitol*; 165: 1-18.
80. Soto J, Soto P. (2006). Miltefosina oral para el tratamiento de la leishmaniasis. *Biomédica* 26 (supl.1): 207-217.
81. Soulsby E.J.L. (1992). *Parasitología y enfermedades parasitarias en los animales domésticos*. 7a. ed. México. Interamericana, 823p.
82. Tizard IR. (1998). *Inmunología Veterinaria*. 5ª ed. México. McGraw-Hill, 567 p.
83. Técnica Western Blotting. Disponible en: www.cultek.com/inf/otros/soluciones/CULTEK-TecnicaWB.pdf. Fecha de consulta: 1 de agosto del 2012.
84. World Health Organization. Leishmaniasis visceral Epidemics. Disponible en: <http://www.who.int/leishmaniasis/epidemic>. Fecha de consulta: 25 de marzo del 2012.
85. Zanatta Coutinho MT, Lacerda Bueno L, Sterzik A, Toshio Fujiwara R, Botelho JR, De Maria M, Genaro O, Linardi PM. (2005). Participation of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) in the epidemiology of canine visceral leishmaniasis. *Vet Parasitol*; 128: 149-155.

9. ANEXO

Tabla 1

HEMOGRAMA	resultado	unidades	valor de referencia
HEMATOCRITO	25	%	37 - 55
HEMOGLOBINA	7,4	g / dl	12,7 - 16,3
GL. ROJOS	3,59	mill. / ml	5.2 - 6.57
V.C.M.	68	fL	64 - 75
C.H.C.M.	30,3	g / dl	33 - 36
H.C.M.	20,7	pg	19.5- 24.5
LEUCOCITOS	12100	/ ml	6.0 - 17.0 x 10 ³
NEUTRÓFILOS	79	%	60 a 77
LINFOCITOS	18	%	12 a 30
MONOCITOS	1	%	2 a 10
EOSINÓFILOS	2	%	2 a 10
BASÓFILOS	0	%	RAROS
NEUTRÓFILOS	9559	/ ml	3000 - 11000
LINFOCITOS	2178	/ ml	1000 - 5000
MONOCITOS	121	/ ml	200 - 1500
EOSINÓFILOS	242	/ ml	200 - 1500
BASÓFILOS	0	/ ml	RAROS
PLAQUETAS	168000	/ ml	200 - 400x 10 ³

Tabla 2

BIOQUIMICA	resultados	unidades	valor de referencia
UREA	28,7	mg / dl	21 - 60
CREATININA	1,67	mg / dl	0,5 - 1,5
PROTEINAS TOTALES	8,27	g / dl	5,6 - 7,1
ALBÚMINA	1,88	g / dl	2,5 - 4,1
GLOBULINAS	6,39	g / dl	1,9 - 3,6
ALT (GPT)	50	UI / L	25 - 106
AST (GOT)	118	UI / L	16 - 50
Fosf. Alcalina	203	UI / L	12 - 122

Tabla 3

HEMOGRAMA	resultado	unidades	valor de referencia
HEMATOCRITO	35	%	37 - 55
HEMOGLOBINA	9.56	g / dl	12,7 - 16,3
GL. ROJOS	4.81	mill. / ml	5.2 - 6.57
V.C.M.	72.77	fL	64 - 75
C.H.C.M.	27.31	g / dl	33 - 36
H.C.M.	19.88	pg	19.5- 24.5
LEUCOCITOS	10400	/ ml	6.0 - 17.0 x 10 ³
NEUTRÓFILOS	72	%	60 a 77
LINFOCITOS	19	%	12 a 30
MONOCITOS	6	%	2 a 10
EOSINÓFILOS	3	%	2 a 10
BASÓFILOS	0	%	RAROS
NEUTRÓFILOS	7488	/ ml	3000 - 11000
LINFOCITOS	1976	/ ml	1000 - 5000
MONOCITOS	624	/ ml	200 - 1500
EOSINÓFILOS	312	/ ml	200 - 1500
BASÓFILOS	0	/ ml	RAROS

Tabla 4

BIOQUIMICA	resultado	unidades	valor de referencia
CREATININA	0.96	mg / dl	0.5 - 1.5
PROTEINAS TOTALES	4.68	g / dl	5,6 - 7,1
ALBÚMINA	2.38	g / dl	2,5 - 4,1
GLOBULINAS	2.3	g / dl	1,9 - 3,6
BILIRRUBINA TOTAL	0.56	mg / dl	0.1 - 0.7
BILIRRUBINA DIRECTA	0.28	mg / dl	
COLESTEROL	133.3	mg / dl	120 - 260
ALT (GPT)	82.7	UI / L	25 - 106
AST (GOT)	94.3	UI / L	16 - 50
Fosf. Alcalina	442.8	UI / L	12 - 122

Tabla 5

HEMOGRAMA	resultado	unidades	valor de referencia
HEMATOCRITO	40	%	37 - 55
HEMOGLOBINA	14,8	g / dl	12,7 - 16,3
GL. ROJOS	5.8	mill. / ml	5.2 - 6.57
V.C.M.	69	fL	64 - 75
C.H.C.M.	36,8	g / dl	33 - 36
H.C.M.	25,4	pg	19.5- 24.5
LEUCOCITOS	15400	/ ml	6.0 - 17.0 x 10 ³
NEUTRÓFILOS	74	%	60 a 77
LINFOCITOS	20	%	12 a 30
MONOCITOS	3	%	2 a 10
EOSINÓFILOS	3	%	2 a 10
BASÓFILOS	0	%	RAROS
NEUTRÓFILOS	11396	/ ml	3000 - 11000
LINFOCITOS	3080	/ ml	1000 - 5000
MONOCITOS	462	/ ml	200 - 1500
EOSINÓFILOS	462	/ ml	200 - 1500
BASÓFILOS	0	/ ml	RAROS
PLAQUETAS	222000	/ ml	200 - 400x 10 ³

**Tabla 6**

BIOQUIMICA	resultado	unidades	valor de referencia
PROTEINAS TOTALES	6,79	g / dl	5,6 - 7,1
ALBÚMINA	2,31	g / dl	2,5 - 4,1
GLOBULINAS	4,48	g / dl	1,9 - 3,6

Tabla 7

HEMOGRAMA	resultado	unidades	valor de referencia
HEMATOCRITO	43	%	37 - 55
HEMOGLOBINA	11.7	g / dl	12,7 - 16,3
GL. ROJOS	5.88	mill. / ml	5.2 - 6.57
V.C.M.	73.13	fL	64 - 75
C.H.C.M.	27.21	g / dl	33 - 36
H.C.M.	19.9	pg	19.5- 24.5
LEUCOCITOS	10500	/ ml	6.0 - 17.0 x 10 ³
NEUTRÓFILOS	71	%	60 a 77
LINFOCITOS	19	%	12 a 30
MONOCITOS	5	%	2 a 10
EOSINÓFILOS	5	%	2 a 10
BASÓFILOS	0	%	RAROS
NEUTRÓFILOS	7455	/ ml	3000 - 11000
LINFOCITOS	1995	/ ml	1000 - 5000
MONOCITOS	525	/ ml	200 - 1500
EOSINÓFILOS	525	/ ml	200 - 1500
BASÓFILOS	0	/ ml	RAROS

Tabla 8

BIOQUIMICA	resultado	unidades	valor de referencia
UREA	49	mg / dl	21 - 60
CREATININA	0.97	mg / dl	0.5 - 1.5
PROTEINAS TOTALES	5.94	g / dl	5,6 - 7,1
ALBÚMINA	3.04	g / dl	2,5 - 4,1
GLOBULINAS	2.9	g / dl	1,9 - 3,6
BILIRRUBINA TOTAL	0.8	mg / dl	0.1 - 0.7
BILIRRUBINA DIRECTA	0.4	mg / dl	
COLESTEROL	171.7	mg / dl	120 - 260
ALT (GPT)	84.6	UI / L	25 - 106
AST (GOT)	117.2	UI / L	16 - 50
Fosf. Alcalina	1427	UI / L	12 - 122

Tabla 9

HEMOGRAMA	resultado	unidades	valor de referencia
HEMATOCRITO	52	%	37 - 55
HEMOGLOBINA	14.3	g / dl	12,7 - 16,3
GL. ROJOS	7	mill. / ml	5.2 - 6.57
V.C.M.	72.29	fL	64 - 75
C.H.C.M.	27.5	g / dl	33 - 36
H.C.M.	20.43	pg	19.5- 24.5
LEUCOCITOS	9760	/ ml	6.0 - 17.0 x 10 ³
NEUTRÓFILOS	73	%	60 a 77
LINFOCITOS	16	%	12 a 30
MONOCITOS	5	%	2 a 10
EOSINÓFILOS	6	%	2 a 10
BASÓFILOS	0	%	RAROS
NEUTRÓFILOS	7125	/ ml	3000 - 11000
LINFOCITOS	1561	/ ml	1000 - 5000
MONOCITOS	488	/ ml	200 - 1500
EOSINÓFILOS	586	/ ml	200 - 1500
BASÓFILOS	0	/ ml	RAROS

Tabla 10

BIOQUIMICA	resultado	unidades	valor de referencia
UREA	55	mg / dl	21 - 60
CREATININA	1.1	mg / dl	0.5 - 1.5
PROTEINAS TOTALES	3.96	g / dl	5,6 - 7,1
ALBÚMINA	2.22	g / dl	2,5 - 4,1
GLOBULINAS	1.74	g / dl	1,9 - 3,6
BILIRRUBINA TOTAL	0.62	mg / dl	0.1 - 0.7
BILIRRUBINA DIRECTA	0.33	mg / dl	
COLESTEROL	100.3	mg / dl	120 - 260
ALT (GPT)	44.3	UI / L	25 - 106
AST (GOT)	60.9	UI / L	16 - 50
Fosf. Alcalina	136.2	UI / L	12 - 122



Foto 1: Amastigotes de *Leishmania*.

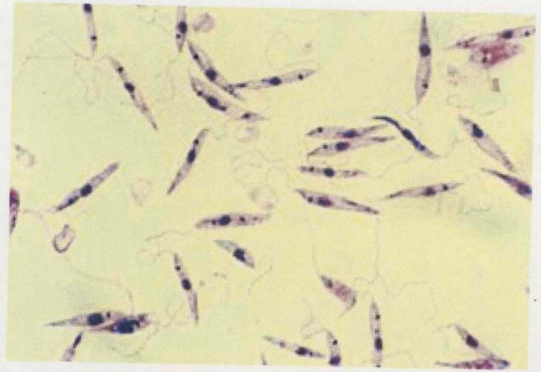


Foto 2: Promastigotes de *Leishmania*.
Fuente: www.alimentacioncanina.com



Foto 3: *Lutzomyia longipalpis*.
Fuente: wikipedia.org



Foto 4: Dermatitis en muslo derecho.



Foto 5: Inflamación del carpo izquierdo.



Foto 6: Atrofia de los músculos temporales.



Fotos 7 y 8: Úlceras en la unión muco-cutánea oral.



Foto 9: Úlcera en pulpejo del segundo dedo del miembro torácico derecho.



Foto 10: Alopecia y lesiones vesículo-ulcerativas en dorso.



Foto 11: Ampliación de lesiones de la foto 10.



Foto 12: Onicogriphosis.



Foto 13: Enfermedad degenerativa articular de carpos.

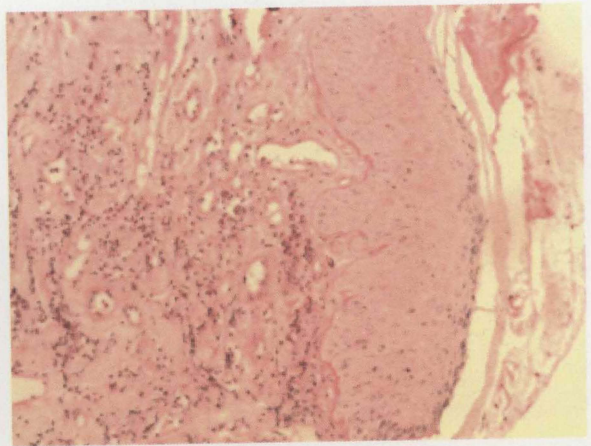


Foto 14: Corte histopatológico de las úlceras de la unión muco-cutánea oral.

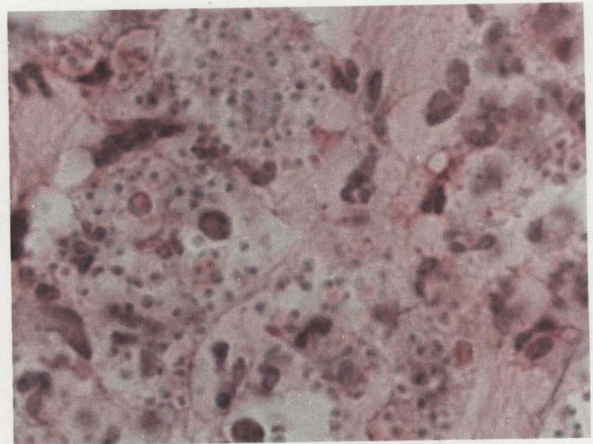
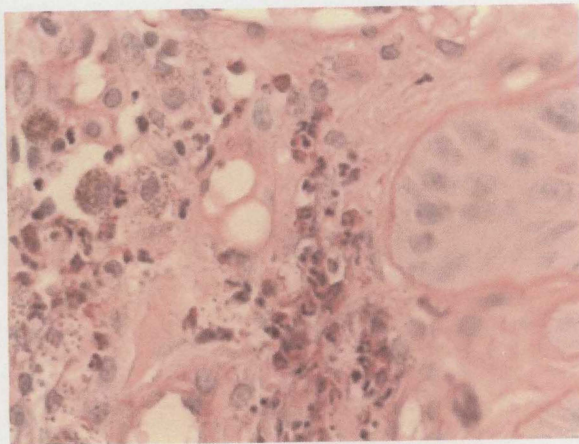


Foto 15 y 16: Histopatología que muestra macrófagos con amastigotes de *Leishmania* en su interior.

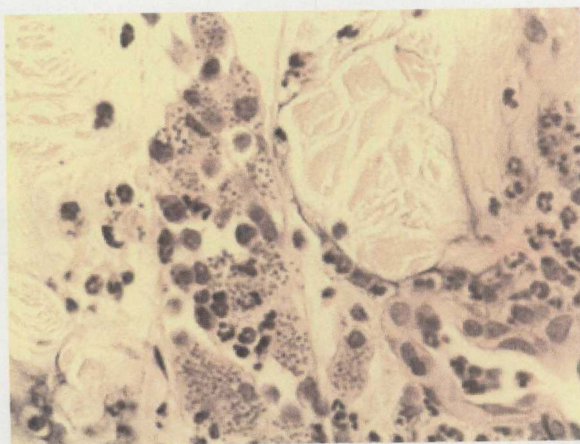


Foto 17: Idem fotos 15 y 16.



Foto 18: PAAF de nódulo linfático poplíteo donde se observan amastigotes de *Leishmania* libres en el frotis.

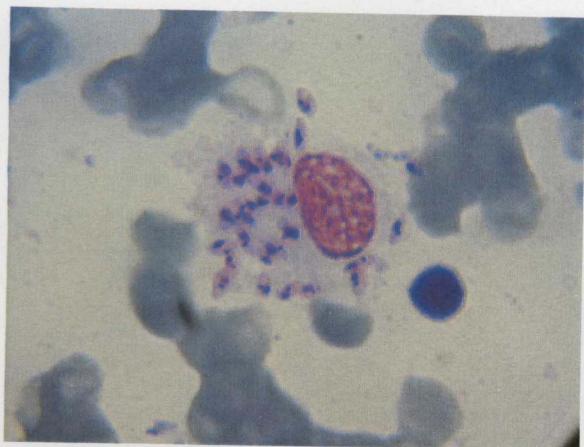
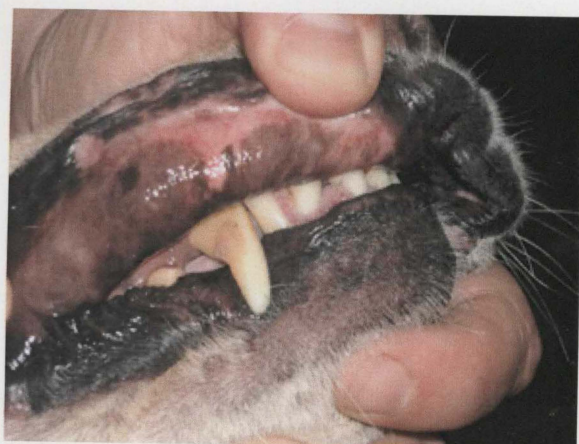


Foto 19: PAAF de nódulo linfático poplíteo, donde se observa macrófagos con amastigotes internalizados.



Foto 20: Mejor estado general post-tratamiento.



Fotos 21 y 22: Mejoría post-tratamiento evidenciada por remisión de úlceras en unión muco-cutánea.



Foto 23: Evolución de lesiones del dorso vistas en fotos 10 y 11 post-tratamiento.



Foto 24: Cicatrización de úlcera del pulpejo de la foto 9 post-tratamiento.

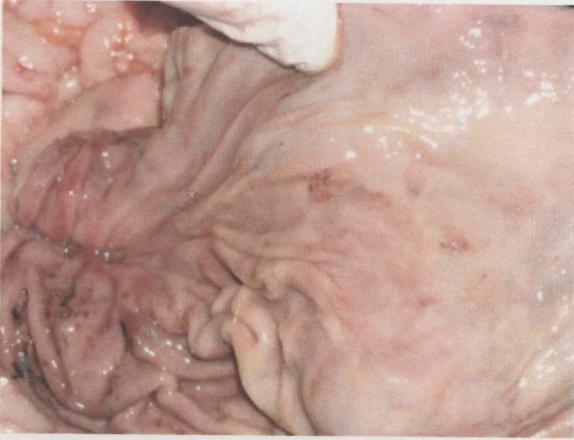


Foto 25: Úlceras en mucosa gástrica



Foto 26: Contenido sanguinolento en intestino delgado.