

**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA  
FACULTAD DE VETERINARIA**

**DESCRIPCIÓN CLÍNICA Y DETERMINACIÓN DE ANTICUERPOS  
ANTI- *Toxoplasma gondii* Y *Neospora caninum* EN CANINOS  
CON LEISHMANIASIS VISCERAL CANINA EN LA CIUDAD  
DE BELLA UNIÓN, URUGUAY**

“por “

**JUAN BANCOFF, Soledad  
MIRANDA MOREIRA, Florencia  
SARLABÓS REISSIG, Lucila**

TESIS DE GRADO presentada como uno de los  
requisitos para obtener el título de Doctor en  
Ciencias Veterinarias.

Orientación: Medicina Veterinaria

MODALIDAD: Estudio Poblacional

**MONTEVIDEO  
URUGUAY  
2022**

**PÁGINA DE APROBACIÓN**

Tesis de Grado aprobada por:

Presidente de Mesa:



**Dr. LUIS DELUCCHI**  
#610  
Depto. de Clínicas y Hospital Veterinario  
Facultad de Veterinaria

Segundo Miembro (tutor):

*Juan Setregno* *Dinora Setregno*

Tercer Miembro:

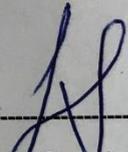
*Lozano Verger*

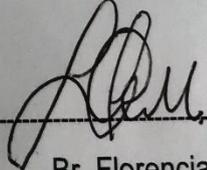
Cuarto Miembro (co-tutor):

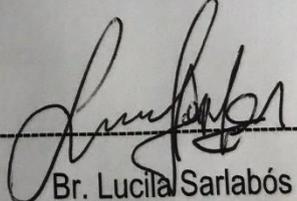
*Adrián Corzoli*

Fecha:

Autores:

  
-----  
Br. Soledad Juan

  
-----  
Br. Florencia Miranda

  
-----  
Br. Lucila Sarlabós

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradecemos a nuestra Tutora, la Dra. Dinora Satragno, por su confianza, paciencia y apoyo incondicional a nuestro proyecto de tesis, convirtiéndose en una gran amiga. Gracias al Co-Tutor, el Dr. Adrián Carzoli por ofrecer su conocimiento y dedicación.

Agradecemos a las familias que nos abrieron sus puertas para analizar a sus mascotas, las cuales fueron fundamentales para llevar a cabo este trabajo de investigación.

Gracias al Laboratorio de Análisis Clínicos de la Facultad de Veterinaria por permitirnos realizar las actividades prácticas necesarias para llevar a cabo nuestra tesis.

Al personal de biblioteca de la facultad por su colaboración, búsqueda y orientación bibliográfica.

Agradecemos a nuestros compañeros y amigos por acompañarnos en esta hermosa carrera, compartiendo cada sentimiento generado.

Un agradecimiento muy especial a nuestras familias, pilares fundamentales durante toda la carrera, apoyándonos en las frustraciones y celebrando las alegrías en este largo camino.

A la Facultad de Veterinaria, por ser nuestra segunda casa, capacitarnos y darnos la oportunidad de conocer amigos y futuros colegas, gracias!

## TABLA DE CONTENIDO

PÁGINA DE APROBACIÓN .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
AGRADECIMIENTOS .....	3
LISTA DE TABLAS Y FIGURAS.....	6
1. RESUMEN.....	7
2. SUMMARY .....	8
3. INTRODUCCIÓN.....	9
4. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA .....	15
4.1 GENERALIDADES DE LEISHMANIASIS.....	15
4.2 LEISHMANIASIS VISCERAL CANINA (LVC).....	17
4.2.2.1 Otras vías de transmisión no vectorial.....	20
6. OBJETIVOS .....	42
6.1 Objetivo general .....	42
6.2 Objetivos específicos.....	42
7. MATERIALES Y MÉTODOS .....	43
7.1 Descripción del área de estudio .....	43
7.2 Estrategia de muestreo de animales y registro epidemiológico.....	44
7.3 Evaluación clínica y colecta de muestras .....	45
8. DIAGNÓSTICO .....	48
9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	52
9.1 Población de estudio .....	52
9.2 Comparativa de variables poblacionales .....	52
10. RESULTADOS .....	53
10.1 Caracterización de la subpoblación positiva estudiada .....	53
10.2 Descripción de las manifestaciones clínicas en los perros seropositivos .....	55
10.3 Presencia de coinfección entre <i>Leishmania infantum</i> , <i>Toxoplasma gondii</i> y/o <i>Neospora caninum</i> .....	57
11. DISCUSIÓN.....	59
12. CONCLUSIONES.....	63

13. BIBLIOGRAFIA.....	65
14. ANEXOS.....	85
14.1. Anexo I. Ficha clínica epidemiológica.....	85
14.2. Anexo II. Test inmunocromatográfico rápido con antígeno recombinante rK39 (rK39-ICT) (Kalazar Detect™ Rapid test, InBIOS International, Seattle, WA).....	86
14.3 Anexo III TOXOTEST. Prueba de hemaglutinación indirecta (HAI) para la detección de anticuerpos contra el Toxoplasma gondii .....	87
14.4 Anexo IV MegaFLUO ® NEOSPORA caninum. Testkit para la detección indirecta semicuantitativa mediante inmunofluorescencia de anticuerpos IgG específicos contra Neospora caninum en plasma o suero del perro .....	89

## LISTA DE TABLAS Y FIGURAS

Figura 1. Distribución mundial de las diferentes formas clínicas de Leishmaniasis Cutánea y Visceral. Fuente: OMS, 2019. ....	12
Figura 2 Formas del parásito en las cuales alterna durante el ciclo de vida. A. Frotis teñido con giemsa que muestra amastigotes con núcleo y kinetoplasto (flecha) adentro de una célula fagocítica, Foto: Dinora Satragno B. Promastigotes en cultivo, Foto: Paula Faral. ....	19
Figura 3 Ciclo de vida de <i>Leishmania spp.</i> Fuente: <a href="http://www.redcanina.es">www.redcanina.es</a> . ....	20
Figura 4 Vector de LVC. Se visualiza hembra adulta de <i>Lutzomyia longipalpis</i> . ....	23
Figura 5 Manifestaciones clínicas de LVC sintomática. ....	31
Figura 6 Mapa de Uruguay. ....	43
Figura 7 Zona de muestreo en Bella Unión B. Se observan las manzanas dentro de las cuales se desarrolló el muestreo. Los puntos rojos, muestran las manzanas de perros positivos a LVC, mientras que los puntos amarillos muestran perros negativos. Fuente: Google M. ....	45
Figura 8 Signos clínicos encontrados durante la exploración clínica: Onicogrifosis, Lesiones ulcerativas, Queratoconjuntivitis, Lesiones ulcerativas en prominencias óseas, Vasculitis auricular y Epistaxis nasal. Fotos: Soledad Juan. ....	47
Figura 9 Kit Kalazar detect™ Rapid test ....	48
Figura 10 Tiras inmunocromatográficas indicativas de A) Resultado negativo y B) Resultado positivo. Fotos: Florencia Miranda. ....	49
Figura 11 A) Prueba de hemaglutinación indirecta (HAI) para la detección de anticuerpos contra <i>Toxoplasma gondii</i> . Fuente: <a href="https://www.wiener-lab.com.ar/es-UY/">https://www.wiener-lab.com.ar/es-UY/</a> B) Placa de hemoaglutinación indirecta (HAI). ....	50
Figura 12 Materiales de trabajo empleados para la técnica de Inmunofluorescencia indirecta (IFI). Foto: Florencia Miranda. ....	51
Figura 13 Taquizoitos de <i>Neospora caninum</i> control positivo. <b>Error! Bookmark not defined.</b>	

Tabla 1 Protocolos actuales de tratamiento para LVC. V.O.: vía oral; S.C.: vía subcutánea. Fuente: <https://www.leishvet.org/> .....**Error! Bookmark not defined.**

Tabla 2 Tabla de variables en estudio en la subpoblación positiva a LVC. .... 54

Gráfico 1 Positividad a LVC dividida en subgrupos de acuerdo a la sintomatología clínica. .... 55

Gráfico 2 Frecuencia de los principales signos clínicos relacionados a la LVC en perros positivos sintomáticos..... 56

Gráfico 3 Frecuencia de animales positivos para cada agente patógeno involucrado en el proyecto. .... 58

Gráfico 4 Presencia de coinfección entre *Leishmania infantum*, *Toxoplasma gondii* y *Neospora caninum*. .... 58

## 1. RESUMEN

Las leishmaniasis son un conjunto de enfermedades zoonóticas con un gran impacto en salud pública y medicina veterinaria. En humanos, la forma visceral es la presentación más grave de esta enfermedad y es causada por el parásito *Leishmania infantum*, cuyo principal reservorio es el perro doméstico que desarrolla una enfermedad llamada Leishmaniasis Visceral Canina (LVC). El ciclo biológico es complejo y las manifestaciones clínicas se destacan por ser muy amplias y variables, sin signos característicos. El objetivo de este trabajo fue realizar un relevamiento clínico en una muestra de 193 caninos de la ciudad de Bella Unión y determinar la presencia de anticuerpos anti-*Toxoplasma gondii* y *Neospora caninum* en la subpoblación positiva a *Leishmania infantum*. La población de estudio fue encuestada serológicamente a partir de un muestreo no probabilístico o bola de nieve, en los meses de agosto a diciembre de 2019, dentro de la zona que el MSP llevó a cabo sus actividades de vigilancia activa y estudio de prevalencia. Se estudiaron variables poblacionales que incluían la edad, raza, sexo y lugar donde pernoctaban en función de la sintomatología y de la positividad. Fue confeccionada una ficha clínica para el registro de datos identificatorios de cada perro y se procedió a la posterior extracción de sangre para la búsqueda de anticuerpos. La población canina analizada estuvo compuesta por un 55,13% de hembras, 67,95% de perros mestizos y el 67,95% de los positivos a *L.infantum* tenían entre 1 y 7 años. El 73,08% de este subgrupo positivo presentó síntomas clínicos, siendo las lesiones cutáneas el signo más frecuentemente documentado. Estos datos destacan la importancia de caracterizar las manifestaciones de la enfermedad en un contexto del estado general de la población. Las coinfecciones con *Neospora caninum* y *Toxoplasma gondii* fueron detectadas en un 14,51% de la subpoblación positiva. Teniendo en consideración éstos resultados, se puede concluir que éstos parásitos están presentes en la ciudad de Bella Unión y los caninos estuvieron en contacto con éstos protozoos. Por lo tanto, es necesario comunicar medidas preventivas acerca de éstas enfermedades para mantener el control de las mismas, ya sea en términos de salud animal como en salud humana.

## 2. SUMMARY

Leishmaniasis are a group of zoonotic diseases with a great impact on public health and veterinary medicine. In humans, the visceral form is the most serious presentation of this disease and is caused by the parasite *Leishmania infantum*, whose main reservoir is the domestic dog that develops a disease called Canine Visceral Leishmaniasis (CVI). The biological cycle is complex and the clinical manifestations stand out for being very broad and variable, without any characteristic signs. The objective of these research was to carry out a clinical survey in a sample of 193 canines from the city of Bella Unión and to determine the presence of anti-*Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* antibodies in the positive subpopulation for *Leishmania infantum*. The population under study was surveyed serologically from a non-probabilistic or snowball sampling, in the months of August to December 2019. They were randomly sampled within the area where the MSP carried out its active surveillance activities and prevalence study. Population variables were studied, including age, race, sex and place where they spent the night based on symptoms and positivity. A clinical record was prepared to record the identification data of each dog and a subsequent blood extraction was carried out to search for antibodies. The dog population analyzed was made up of 55.13% females, 67.95% mongrel dogs and 67.95% of those positive for *L. infantum* were between 1 and 7 years old. 73.08% of this subgroup presented clinical symptoms, with skin lesions being the most frequently documented sign. These data highlight the importance of characterizing the manifestations of the disease in a context of the general state of the population. Coinfections with *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* were detected in 14.51% of the positive subpopulation. Considering these results, it can be concluded that these parasites are present in the city of Bella Unión and the canines were in contact with these protozoa. Therefore, it is necessary to communicate preventive measures about these diseases to maintain their control, both in terms of animal health and human health.

### 3. INTRODUCCIÓN

Las leishmaniasis son un conjunto de enfermedades zoonóticas que tienen en común ser causadas por protozoarios del género *Leishmania sp.* que se transmiten a los animales y al humano mediante vectores dípteros hematófagos comúnmente llamados flebótomos (*Organización Panamericana de la Salud (OPS, 2013)*).

Son consideradas enfermedades reemergentes y un problema creciente de salud pública en el mundo debido a las condiciones ambientales y la mayor exposición de las personas a los vectores. Como consecuencia de ello se ha visto un aumento en la cantidad de afectados por la enfermedad, favoreciendo la transmisión y dificultando el control (*OPS, 2013*).

La Organización Mundial de la Salud (*OMS*) incluye a la leishmaniasis humana en la categoría de enfermedades emergentes y no controladas (*World Health Organization (WHO, 2011)*), enmarcada dentro del grupo de enfermedades tropicales olvidadas (*Brooker y Utzinger, 2007*). Por su asociación con la pobreza, la desnutrición, los sistemas inmunológicos débiles y la escasez de recursos disponibles para el diagnóstico, tratamiento y control, es reconocida mundialmente como una de las enfermedades infecciosas más importantes que afecta a poblaciones de zonas rurales y suburbanas de escasos recursos y con mayor dificultad de acceso a los servicios de salud (*Alvar et al., 2006*).

Se extienden por todo el mundo, infectando a más de 12 millones de personas, con un estimado de 700.000 a 1 millón de nuevos casos y más de 50.000 muertes cada año. Son endémicas en 102 países, 72 de los cuales están en desarrollo, y se estima que 350 millones de personas viven en áreas con riesgo de infección. La verdadera escala de la enfermedad puede ser mayor, ya que solo un tercio de los países afectados declaran de forma obligatoria y aproximadamente el 45 % de los casos quedan sin registrar (*Alvar et al., 2012; OPS/OMS, 2006*).

Son varias las especies de *Leishmania* que pueden infectar a los humanos en las diferentes partes del mundo, como se muestra en la figura 1, Cada una de las mismas involucra en su ciclo biológico a diferentes insectos vectores y reservorios, expresándose bajo alguna de las tres formas clínicas principales: cutánea, mucocutánea y visceral.

*Leishmaniasis cutánea (LC)*: Es la forma más frecuente de leishmaniasis. Produce lesiones cutáneas en las zonas expuestas del cuerpo, sobre todo ulcerosas, que dejan cicatrices de por vida. Alrededor del 95% de los casos de LC ocurren en las Américas, la cuenca del Mediterráneo, el Medio Oriente y Asia Central. En 2017, más del 95% de los casos nuevos ocurrieron en seis países: Afganistán, Argelia, Brasil, Colombia, República Islámica de Irán y República Árabe Siria. Se estima que cada año se producen entre 600.000 y 1 millón de nuevos casos en todo el mundo (OMS, 2022).

*Leishmaniasis mucocutánea (LMC)*: Se considera una forma grave dentro de la LC, esta forma clínica produce la destrucción parcial o completa de las cavidades oronasales, y el tracto respiratorio superior. Más del 90% de los casos están en Brasil, Bolivia, Perú y Etiopía (OMS, 2022).

*Leishmaniasis visceral (LV)*: Es también conocida como Kala azar (fiebre negra en hindi) y es la presentación clínica más grave de esta enfermedad, con un 95% de letalidad si no es diagnosticada y tratada a tiempo. Se caracteriza por episodios irregulares de fiebre, cansancio, pérdida de peso, hepatoesplenomegalia y anemia. La mayor parte de los casos diagnosticados se registran en Brasil, África Oriental y la India. Se producen anualmente en todo el mundo entre 50.000 y 90.000 casos de LV, de los que el 25% al 45% son notificados a la OMS. En el 2018, más del 95% de los casos nuevos que fueron notificados se produjeron en 10 países: Brasil, China, Etiopía, India, Irak, Kenia, Nepal, Somalia, Sudán y Sudán del Sur (OMS, 2022).

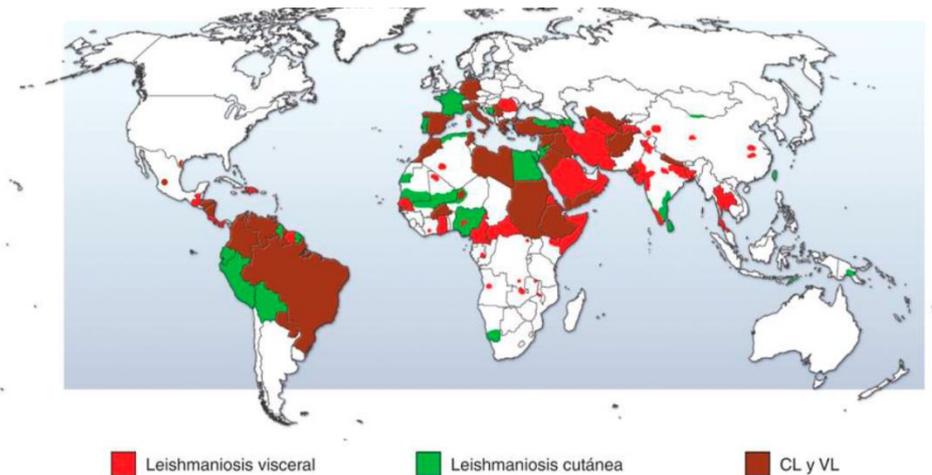


Figura 1. **Distribución mundial de las diferentes formas clínicas de Leishmaniasis Cutánea y Visceral.** Fuente: OMS, 2019.

En América del Sur se ha caracterizado la especie *Leishmania infantum*, que una vez dentro del organismo humano provoca Leishmaniasis visceral (LV). Se trata de una variedad grave de esta patología que puede alcanzar una mortalidad superior al 95% si no se realiza tratamiento adecuado.

La LV se ha descrito en al menos 12 países, con el 90% de los casos ocurriendo en Brasil, especialmente en la Región Nordeste (*Ministério da Saúde, 2014*), pero su distribución se ha expandido paulatinamente hacia el sur del continente llegando a zonas fronterizas con Uruguay.

La enfermedad (LV) también afecta a los perros, principales reservorios de la especie *infantum* en América Latina, es decir, sus organismos albergan al patógeno por un plazo muy prolongado durante el cual pueden permanecer asintomáticos, encontrando el parásito las condiciones adecuadas para ser transmitido a través de pequeños dípteros que se alimentan de sangre y contagiando la enfermedad a través de sus picaduras.

Tanto *L. infantum*, como su vector *Lutzomyia longipalpis*, se han expandido progresivamente en América Latina gracias a la globalización (*Ministerio de Salud Pública, 2016a*) y a consecuencia de factores de riesgo como ser las condiciones socioeconómicas, mal nutrición, la movilidad de las personas a zonas donde ya existen ciclos de transmisión, cambios ambientales, el cambio climático, donde a

consecuencia de lo anteriormente mencionado el número de perros infectados es estimado en millones (*Baneth et al., 2008*).

Se ha observado una asociación espacial entre la ocurrencia de casos humanos y caninos, siendo estos últimos un precedente para el establecimiento de la infección en humanos en el medio urbano (*Camargo-Neves et al., 2001; di Lorenzo y Proietti, 2002*). Además, las personas afectadas con LV no transmiten la enfermedad, ya que desde el organismo humano el parásito no se transfiere a los vectores. Por esta razón, su incidencia en los perros es siempre superior a la incidencia en humanos (*Ministério da Saúde, 2014*).

En el año 2010, *Lutzomyia longipalpis* fue hallada por primera vez en Uruguay en las localidades de Bella unión y Salto con los primeros reportes de perros seropositivos a *Leishmania infantum* en febrero del 2015 en el paraje Arenitas Blancas en el departamento de Salto y en el 2016 en la ciudad de Bella Unión.

Esto trajo cambios epidemiológicos a nuestro país al confirmarse los primeros casos autóctonos (*Satragno et., 2017*). A finales de 2018 se registró el primer caso humano de LV en un residente urbano de la ciudad de Salto y al día de hoy ya van 7 casos registrados con un fallecimiento reportado. En la ciudad de Bella Unión no se han diagnosticado aún casos humanos de LV (*MSP, 2021*).

Es bien conocido el impacto positivo que tienen las mascotas en la salud y bienestar humano, a lo que se le suma el rol de ser un miembro más de la familia. Sin embargo, esta relación obliga a minimizar algunos riesgos zoonóticos. El aumento desmedido de mascotas empieza a plantear problemas de cohabitación, por lo que la estrecha interacción entre humanos y animales conduce a una mayor propagación de enfermedades zoonóticas.

Las manifestaciones clínicas encontradas en los perros afectados varían ampliamente, debido principalmente a la diversidad de respuestas inmunitarias y mecanismos patogénicos (*Solano-Gallego et al., 2013*), donde los perros naturalmente infectados pueden presentar desde una manifestación asintomática o leve a una sintomatología severa de la enfermedad con infección generalizada (*Barbieri, 2006; Reis y et al., 2010*).

El diagnóstico clínico de la Leishmaniasis visceral canina (LVC) es difícil y complejo para los veterinarios privados y servicios de salud pública debido al gran porcentaje de perros asintomáticos u oligosintomáticos existentes, aun así, el diagnóstico clínico junto con la anamnesis son herramientas fundamentales con las que cuenta el veterinario (Miró et al., 2001). Otra limitante en el diagnóstico es que, si bien existen una amplia variedad de técnicas diagnósticas, ninguna es 100% sensible o específica; pudiendo existir además, falsos positivos mediante técnicas serológicas debido a reacciones cruzadas con otros patógenos, como *Trypanosoma cruzi*, *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum*, *Ehrlichia*, *Leptospira* (Mettler et al., 2005; Otranto et al., 2005; Schallig et al., 2004). La toxoplasmosis y la neosporosis son enfermedades causadas por protozoos del Phylum Apicomplexa (Dubey y Lappin, 2006). La toxoplasmosis es producida por *Toxoplasma gondii*, parásito que afecta a los animales de sangre caliente, incluido el hombre, produciendo una gran variedad de manifestaciones clínicas (Tenter et al., 2000). La neosporosis es causada por *Neospora caninum*, parásito que fue erróneamente diagnosticado como *T. gondii* hasta su descripción en el año 1988 por Dubey (Dubey et al., 1988), que ocasiona enfermedad neuromuscular y muerte en caninos y es considerado uno de los principales agentes causantes de aborto en bovinos a nivel mundial (Dubey y Schares, 2011). En caninos, los signos de ambas enfermedades son similares, por lo que es necesario un diagnóstico diferencial para determinar su etiología.

## 4. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 4.1 GENERALIDADES DE LEISHMANIASIS

El parásito fue descrito por primera vez en 1903 por dos médicos británicos, Leishman y Donovan, quienes casi simultáneamente pero de forma independiente diagnosticaron *Leishmania* en el bazo de pacientes humanos en la India (Herwaldt, 1999). En 1908, Nicolle y Comte realizaron la primera descripción en el perro en Túnez (Solano-Gallego et al., 2009).

Se considera una enfermedad emergente y reemergente, así como un grave y creciente problema de salud pública en Asia, Europa, África y América debido al aumento en el número de personas afectadas, donde el hombre es un hospedador accidental en el ciclo del parásito que ocurre naturalmente entre mamíferos y flebotomíneos (Quiroz Romero, 1990; Ministerio de Salud, Presidencia de la Nación, 2010).

Dentro del género *Leishmania* se han descrito dos subgéneros según la ubicación de reproducción en el tracto digestivo del vector (Lainson y Shaw, 1987): subgénero -*Viannia* con multiplicación en el intestino posterior (desarrollo peripilórico) y restringida al Nuevo Mundo y subgénero -*Leishmania*, como *Leishmania infantum* (especie identificada con mayor frecuencia en los animales domésticos), que realiza la multiplicación en el intestino medio (desarrollo suprapilórico), presente tanto en el Viejo Mundo como en el Nuevo Mundo.

La clasificación de las distintas especies y cepas del género *Leishmania* siempre ha sido muy compleja debido a que son morfológicamente indistinguibles. Sin embargo, deben identificarse y caracterizarse para comprender la patogenia y epidemiología y así determinar las mejores medidas de diagnóstico, tratamiento y control (OMS, 2010). Se han identificado unas 30 especies, de las cuales al menos 20 son patógenas para los mamíferos (Baneth y Solano-Gallego, 2011; Iowa State University, 2009). Cada especie involucra diferentes vectores y reservorios en su ciclo biológico y se manifiesta en una de tres formas clínicas principales: cutánea, mucocutánea y visceral.

El método de identificación utilizado se basa en la comparación de secuencias de ADN, tipificación de isoenzimas por electroforesis y reactividad a anticuerpos monoclonales y antígenos de membrana (Baneth y Solano-Gallego, 2012).

El complejo *Leishmania spp.* se ha clasificado desde el punto de vista clínico e inmunológico, por las características morfológicas, bioquímicas y el crecimiento en flebotomíneos, diferenciándose cuatro grupos: *L. donovani* que causa el complejo visceral (donde se incluyen *L. donovani* y *L. infantum*), *L. tropica* responsable del complejo mucocutáneo (encontrándose *L. tropica*, *L. major* y *L. aethiopica*), *L. mexicana* que produce el complejo cutáneo (con *L. enrietti*, *L. mexicana*, *L. mexicana amazonensis*, *L. mexicana spp.* como sus integrantes) y *L. braziliensis* responsable del complejo mucocutáneo (integrado por *L. peruviana*, *L. braziliensis panamensis*, *L. braziliensis guayanensis* y *L. braziliensis*) (Quiroz Romero, 1990).

Nuestra región se encuentra actualmente afectada por la forma visceral (LV) americana producida por *Leishmania infantum*. El origen se encuentra en el Viejo Mundo con evidencias de que llegó desde la Península Ibérica junto con los conquistadores al ingresar estos al territorio brasileño, adaptándose en nuestro continente al flebotomíneo vector *Lutzomyia longipalpis* (Killick-Kendrick, 1985).

Tanto *Leishmania infantum*, como su vector se han expandido progresiva y efectivamente hacia el sur de América Latina debido a cambios en las condiciones ambientales (deforestación y cambio climático), por aumento del tránsito, tráfico y cambios culturales del manejo de las mascotas y por las migraciones con rápida y desorganizada urbanización, que incluyen deficiencias en el saneamiento ambiental (disposición inadecuada de excretas y basura) y viviendas precarias (Ministerio de Salud, Presidencia de la Nación, 2010). En América Latina, la enfermedad fue descrita en por lo menos 12 países, ocurriendo el 90% de los casos en Brasil, especialmente en la Región Nordeste (Ministério da Saúde, 2014). Las altas tasas reproductivas y el aumento de las poblaciones caninas abandonadas, sumado a la adaptación a los ambientes urbanos y la dispersión de los vectores, han resultado en un aumento de la morbilidad, mortalidad y distribución geográfica en nuestro continente en los últimos años, observándose un cambio en la epidemiología de la enfermedad que ya se ha instalado en áreas urbanas y peri-urbanas (Ministerio de Salud, Presidencia de la Nación, 2010).

## 4.2 LEISHMANIASIS VISCERAL CANINA (LVC)

### 4.2.1 GENERALIDADES DE LVC

*Leishmania infantum* es la especie más importante en referencia a la infección de perros en América del Sur, siendo estos el principal reservorio de la enfermedad, albergando al patógeno por un plazo muy prolongado durante el cual pueden permanecer asintomáticos, otorgando al parásito las condiciones adecuadas para ser transmitido. De evolución crónica y potencialmente mortal en los animales afectados, tratándose además de una importante zoonosis con repercusiones en salud pública (Solano-Gallego., 2013).

Se conocen características que involucran a estos como principales reservorios, como ser la presencia de un número elevado en el nicho ecológico, su longevidad, el tiempo alto de exposición de los perros al vector (ya que generalmente permanecen muchas horas en el exterior de las viviendas) y la convivencia con el humano en estrecha relación (Maidana, LLano, Báez, Cabrera, López, 2011). Los perros pueden infectarse a cualquier edad, pero la prevalencia de infección presenta una distribución bimodal, con una proporción de perros infectados menores de 3 años y otro grupo de perros entre 8 y 10 años (Paltrinieri et al., 2011).

Cualquier raza puede ser afectada, aun así, está descrita la resistencia a la infección en el podenco ibicenco, el cual desarrolla una inmunidad celular protectora (Solano-Gallego et al., 2000). Sin embargo, la situación de resistencia o susceptibilidad no es estática, dependiendo de la capacidad del sistema inmunitario del animal para hacer frente a *L.infantum*. Cualquier situación de estrés, un tratamiento farmacológico o una enfermedad inmunosupresora concomitante repercutirá en su sistema inmunitario, dando como resultado una enfermedad clínica en un perro que era capaz de controlar la enfermedad (Solano-Gallego et al., 2009).

La predilección por sexo no está descrita, pudiendo enfermar tanto machos como hembras, sin embargo, en algunas regiones los machos se enferman más, especialmente si estos cumplen un rol de vigilantes en el hogar permaneciendo afuera durante la mayor actividad del vector y por lo tanto con mayor riesgo de exposición (Miranda, Roura, Picado, Ferrer y Ramis, 2008).

La presentación clínica es muy amplia, debido a la variedad de tipos de respuestas inmunes y mecanismos patogénicos presentes en los perros.

El diagnóstico clínico debe incluir la exploración física y alteraciones clínico-patológicas, pudiendo existir animales enfermos que, en ausencia de signos clínicos presentan alteraciones laboratoriales o viceversa (Maidana et al., 2011).

La importancia diagnóstica de la infección en perros con o sin manifestaciones clínicas radica en que son reservorios urbanos de *Leishmania infantum* siendo la principal fuente de infección para los vectores a pesar del tratamiento que solo mejora su condición clínica (Maidana et al., 2011).

#### **4.2.2 CICLO DE VIDA Y TRANSMISIÓN DE *Leishmania infantum***

El agente causal de la leishmaniasis es un protozooario dimórfico del género *Leishmania*, que pertenece al reino Protista, subreino Protozoa, orden Kinetoplastida y a la familia Trypanosomatidae.

Durante el ciclo de vida, *Leishmania infantum* transita en dos formas morfológicas diferentes: una intracelular o amastigote en las células del sistema retículo-endotelial del hospedador vertebrado y una forma extracelular o promastigote en el hospedador invertebrado o en cultivos "in vitro" (Gállego y Riera, 2000).

Los amastigotes son inmóviles, de forma ovalada y con un tamaño de 3-5  $\mu\text{m}$  x 1,5-2,5  $\mu\text{m}$ . En el citoplasma se observa un núcleo esférico, voluminoso, generalmente excéntrico y un kinetoplasto próximo al núcleo de aspecto bacilar (Chang, 1956; González et al., 1976), como se observa en la figura 2A.

Los promastigotes son fusiformes, extracelulares y móviles; de mayor tamaño que los amastigotes (10-30  $\mu\text{m}$  de largo y 1,5-3  $\mu\text{m}$  de ancho), con un largo flagelo libre en la región anterior, un núcleo ovalado situado en la región central y un kinetoplasto bastoniforme (Chang, 1956; Dedet., 1999; González et al., 1976), como se observa en la figura 2B.

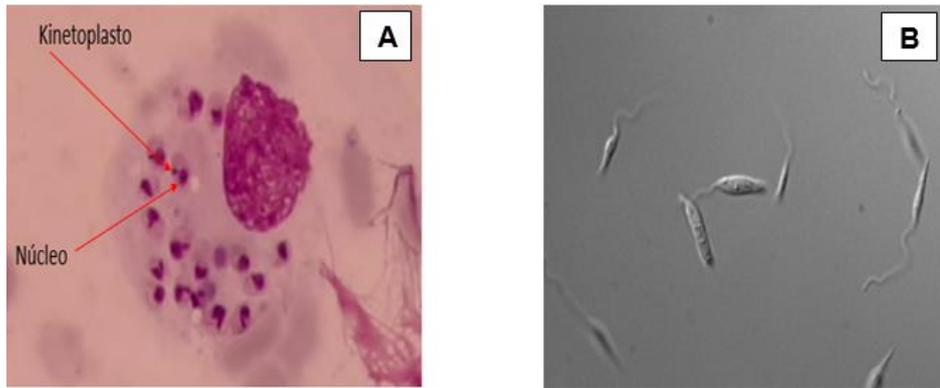


Figura 2 **Formas del parásito en las cuales alterna durante el ciclo de vida.** **A.** Frotis teñido con giemsa que muestra amastigotes con núcleo y kinetoplasto (flecha) adentro de una célula fagocítica, Foto: Dinora Satragno **B.** Promastigotes en cultivo, Foto: Paula Faral.

Todas las leishmanias tienen un ciclo de vida similar y es importante conocer cada etapa para comprender y aplicar ciertas medidas de control. El ciclo de vida de *L.infantum* es diheteroxeno, el cual se completa en dos hospedadores; el insecto vector y el hospedador vertebrado (*Harhay, Olliaro, Costa, Costa CH, 2011*), como se muestra en la figura 3.

La principal vía de transmisión es a través de la picadura de un flebótomo infectado que actúa como vector biológico; cuando pica, posterior a la succión de sangre del hospedador, ingiere macrófagos infectados con los protozoos en forma de amastigote. En el tracto digestivo del vector, los amastigotes se convierten en las formas flageladas o promastigotes en el intestino medio y grueso (especies peripilóricas del subgénero *Viannia*), o sólo en el intestino medio (especies suprapilóricas del subgénero *Leishmania*) que posteriormente se multiplican y de ahí migran a la probóscide del insecto vector. Estos promastigotes sufren una serie compleja de transformaciones dentro del flebotomíneo hasta alcanzar la capacidad infectante, en un proceso conocido como “metaciclogénesis” (*Dostálová y Volf, 2012; Miró et al., 2001; Quiroz Romero, 1990*), siendo transmitidos a un nuevo hospedador susceptible en la próxima picadura. Una vez que el parásito logra atravesar la dermis del hospedador vertebrado, estas formas de promastigotes son fagocitadas por macrófagos u otras células fagocíticas mononucleadas.

El macrófago rodea a los promastigotes en una vacuola parasitófora (fagosoma) e intenta eliminarlos mediante una serie de metabolitos derivados del oxígeno, como el óxido nítrico y las hidrolasas lisosomales, vertidos en el espacio intravacuolar.

Pero *Leishmania* es capaz de evadir estas defensas inespecíficas, multiplicándose en el interior del macrófago, dónde se transforma en formas amastigotes (12-24 h) (Sharma y Singh, 2008) que se multiplican por fisión binaria. Estos amastigotes aumentan en número hasta que la célula finalmente estalla y posteriormente infectan a otras células fagocíticas. En la naturaleza este estado es crónico y puede continuar durante meses o años sin la aparición de síntomas o signos clínicos visibles, dependiendo del sistema inmune del hospedador y susceptibilidad a la enfermedad. De acuerdo a la especie de *Leishmania*, la infección puede quedar limitada a la piel, o extenderse por vía linfática local y acceder a las mucosas o diseminarse a órganos con elevado contenido en macrófagos como son el bazo, hígado y médula ósea (Ministério da Saúde, 2014).

En el ciclo doméstico-urbano los vectores ingresan al domicilio propagando la infección al núcleo familiar, en este contexto el reservorio por excelencia es el perro.

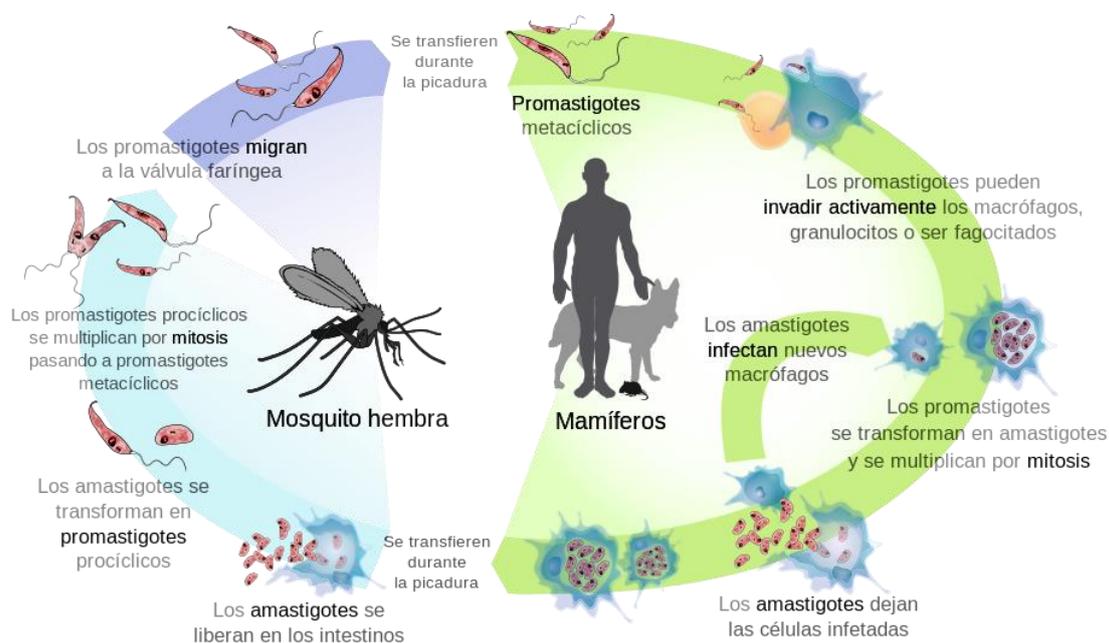


Figura 3 Ciclo de vida de *Leishmania* spp. Fuente: [www.redcanina.es](http://www.redcanina.es)

#### 4.2.2.1 Otras vías de transmisión no vectorial

Aunque el flebótomo es el único artrópodo adaptado para la transmisión biológica de *Leishmania*, en ocasiones existe sin la intervención del vector. Sin embargo, se cree que la transmisión no vectorial desempeña un papel marginal en la evolución natural de la leishmaniasis (Baneth et al., 2008).

Los mecanismos de transmisión probados incluyen la infección por transfusiones de sangre o derivados de donantes infectados, la transmisión vertical y transmisión venérea (Baneth y Solano-Gallego, 2012). La transfusión de sangre de animales infectados es una vía de transmisión a considerar (Owens et al., 2001) y es crítica en áreas donde los donantes de sangre podrían ser portadores de la infección (de Freitas et al., 2006; Owens et al., 2001; Tabar et al., 2008). En América del Norte, los casos de transmisión de *Leishmania* a perros anémicos no infectados se produjeron por transfusión de unidades de glóbulos rojos de individuos de la raza Foxhound, que posteriormente resultaron ser seropositivos (Giger et al., 2002; Owens et al., 2001).

Aunque inicialmente se pensó que la transmisión vertical en perros (transplacentaria o transmamaria) era imposible (Andrade et al., 2002), varios trabajos han refutado esta idea (Boggiatto et al., 2011; da Silva et al., 2009). Se ha demostrado la transmisión vertical, congénita o *in útero* de *L.infantum* en cachorros nacidos de una hembra de raza Beagle infectada experimentalmente y se ha supuesto que la transmisión había sido transplacentaria (Rosypal et al., 2005). Además, se han descrito varios casos de transmisión congénita de madres a crías en condiciones naturales en Europa (Mancianti y Sozzi, 1995; Masucci et al., 2003) y América (Boggiatto et al., 2011; da Silva et al., 2009).

Por otra parte, se han detectado amastigotes viables de *L.infantum* en semen y orina de perros infectados experimentalmente (Riera y Valladares, 1996). Se ha demostrado una frecuencia relativamente alta de transmisión venérea o sexual de *Leishmania* a perras sanas apareadas con machos infectados (Silva et al., 2009). Al igual que para la transmisión vertical, la relevancia epidemiológica de este hallazgo aún debe ser definida. Además de estas formas de transmisión mencionadas, se ha sugerido que el contacto directo de perro a perro (a través de mordeduras o heridas) puede ser responsable de la transmisión (Schantz et al., 2005). Sin embargo, no ha sido confirmado con pruebas experimentales.

### 4.2.3 VECTOR

El ciclo natural de infección por *Leishmania* involucra un hospedador vertebrado y un vector (Solano-Gallego, 2013). Los flebótomos son los vectores transmisores en más de 80 países y la principal forma de transmisión del parásito es a través de la picadura de hembras hematófagas (Desjeux, 1996).

Son insectos del orden Díptera, familia Psychodidae, sub familia Phlebotominae, pertenecientes al género *Lutzomyia* en América y al género *Phlebotomus* en el resto del mundo (Bowman et al., 2004).

Existe una estrecha relación entre la especie de vector y la especie de *Leishmania* transmitida que está relacionada con la capacidad de los promastigotes para unirse específicamente a los ligandos en el intestino del flebótomo y evitar su liberación en las heces del vector (Volf et al., 2008).

*Lutzomyia longipalpis* es el principal vector del parásito en las Américas, bien adaptado a entornos urbanos y peri-urbanos (Lainson et al., 2005) con una distribución que va desde el sur de los Estados Unidos hasta el norte de Uruguay, siendo esta última la localización más al sur del vector en el continente (Salomón et al., 2011). Los cambios ambientales relacionados con la actividad humana y el cambio climático han favorecido la expansión del vector y en 2010 *Lutzomyia longipalpis* fue capturada por primera vez en las localidades de Bella Unión y Salto (Salomón et al., 2011, Satragno et al., 2015).

Existen criterios aceptados para incriminar a los vectores de *Leishmania* en su desempeño como transmisores de esta zoonosis; por ejemplo, que posean hábitos antropofílicos, que se alimenten de hospedadores reservorios, que se infecten en la naturaleza por la misma *Leishmania* que afecta al hombre y el hecho de permitir el crecimiento del parásito con capacidad de transmitirlo mediante la picadura (Organización Mundial de la Salud, 2010).

Otros insectos han sido cuestionados como posibles vectores de *Leishmania*, como las garrapatas de la especie *Rhipicephalus sanguineus* (Coutinho et al., 2005) y las pulgas del género *Ctenocephalides* (Coutinho y Linardi, 2007), no encontrándose hasta el momento evidencia de la transmisión natural del protozoo por éstos (Coutinho et al., 2005).

#### **4.2.3.1 Características morfológicas:**

Los flebótomos experimentan una metamorfosis completa a través de cuatro etapas de desarrollo: huevo, larva (cuatro estadios), pupa y adulto (*Maroli et al., 2013*). Solo las hembras son hematófagas y necesitan la sangre para la producción de huevos. Los machos, por otro lado, se alimentan del néctar de las plantas y no están involucrados en la transmisión de la enfermedad.

Miden unos 2-3 mm y se desarrollan en suelos húmedos ricos en materia orgánica de la que se alimentan, y en el estado adulto, aéreo, se alimentan de líquidos vegetales. Presentan patas muy largas y la cabeza se encuentra implantada en una posición algo inferior en el tórax, dándole un aspecto incurvado característico.

La cabeza tiene dos ojos compuestos y una probóscide transformada en aparato picador-chupador (*Gale Almagro, 2004; Soulsby, 1992*). El color de su cuerpo varía desde blanco, pasando por un ocre amarillento y hasta negro, estando cubiertos completamente por vellosidades (*Killick-Kendrick, 1999; Lucientes et al., 2005; Miró., 2001; Solano-Gallego, 2013*).

Poseen un par de alas lanceoladas, que cuando se encuentran en reposo son mantenidas en ángulo formando una “V” sobre el abdomen, peludas y de casi igual longitud que su cuerpo (*Killick-Kendrick, 1999; Lucientes et al., 2005*), como se muestra en la figura 4. 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 facilidad de infección (*García Almagro, 2004*).



Figura 4 **Vector de LVC. Se visualiza hembra adulta de *Lutzomyia longipalpis*.**

Fuente: Frank Collins

#### **4.2.3.2 Actividad**

Presentan actividad crepuscular y nocturna, con temperaturas que oscilan entre los 15 a 28°C asociadas con humedad relativa y ausencia de viento o lluvia. El vuelo de los flebotomíneos es muy corto (no excede los 300 metros), por lo que se restringen a moverse alrededor de sus criaderos (*Muñoz et al., 2016*). Su velocidad de vuelo es considerablemente inferior a la de los mosquitos y son fácilmente reconocibles por su comportamiento, al volar en pequeños saltos y aterrizar con sus alas semiabiertas (*Salomón, 2005*). Como la velocidad del viento aumenta con la altura, los flebotomíneos entonces tienden a volar cerca del suelo (*OMS, 2010*).

Habitán zonas peri-domiciliarias, pudiendo adaptarse también en ambientes modificados como ser el interior de las casas. Durante las horas de inactividad se refugian en hogares, bodegas, establos, huecos de las paredes, basureros y vegetación (*Killick-Kendrick et al., 1986; Solano-Gallego et al., 2009; Soulsby, 1992*). En los perros, los flebótomos se alimentan principalmente en áreas de poco pelo como la cabeza, puente nasal, pabellón auricular y áreas inguinales y perianales (*Solano-Gallego et al. 2009*).

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 cuales son depositados en lugares oscuros o poco iluminados, húmedos, arenosos, con temperatura constante y ricos en materia orgánica en descomposición que permita la alimentación de las larvas al eclosionar (*García Almagro, 2004*).

Para controlar y prevenir la continua dispersión de los vectores, es necesario considerar que las intervenciones con el solo uso de insecticidas han resultado de poca efectividad. Además, dado que es un vector que crece en áreas donde predomina la materia orgánica, es importante evitar su acumulación en el entorno del hogar (*Ministerio de Salud Pública, 2016a*).

#### 4.2.4 RESERVORIO

Se consideran reservorios de una enfermedad aquellos animales que aseguran tanto la existencia del agente etiológico como su posterior transmisión (WHO, 1984); estos actúan como donantes de parásitos a los vectores y de esta forma aseguran la persistencia de la zoonosis en un área geográfica determinada.

Una gran variedad de animales silvestres y domésticos han sido implicados como reservorios de las especies de *Leishmania* en América. Se conoce la existencia de un huésped reservorio primario en un determinado foco y por el contrario otros mamíferos de la misma zona pueden resultar también infectados, convirtiéndose en huéspedes secundarios o accidentales que, a pesar de ser infectados, no desempeñan ningún papel en el mantenimiento del ciclo (Solano-Gallego et al., 2013).

En las Américas - Nuevo Mundo -, los reservorios identificados incluyen a los marsupiales (*Didelphis spp*), al oso perezoso (*Choloepus spp* y *Bradypus spp*), al oso hormiguero menor (*Tamandua tetradactyla*), al zorro (*Cerdocyon thous*) y a los roedores (*Rattus spp*, *Proechimys spp*, *Nectomys spp*, *Oryzomys spp*, etc.) (OPS, 2019, p.20). Los perros (*Canis familiaris*) son el principal reservorio peri doméstico de la infección por *L. infantum* en América Latina debido a la gran cantidad de individuos en el nicho ecológico y su estrecha relación con el vector. Por tanto, parece ser la única especie de animal doméstico que mantiene el agente naturalmente formando parte del ciclo epidemiológico de transmisión humana (Alvar et al., 2004). En entornos urbanos, *L. longipalpis* parece tener preferencia alimenticia por los perros, mientras que ocurre lo contrario en los humanos, que son hospederos inadecuados por no proporcionar amastigotes en las zonas externas accesibles para la pequeña probóscide de los vectores (MSP, 2019 b). Los perros infectados pueden desarrollar la enfermedad o permanecer asintomáticos a pesar de tener altas cargas parasitarias en la piel, lo que aumenta su capacidad para infectar a los flebótomos que se alimentan de ellos (Alvar et al., 2001).

Se ha demostrado que los casos asintomáticos de infección natural son altamente infectivos para los flebótomos en condiciones experimentales (xenodiagnóstico).

Por tanto, no se debe subestimar el papel que pueden desempeñar en el ciclo, ya que más del 50% de la totalidad de los perros infectados son portadores asintomáticos (Solano-Gallego et al., 2009).

Aunque muchas especies de vida silvestre pueden infectarse con *L. infantum*, a diferencia de los perros y los humanos, las cargas de parásitos son relativamente bajas (Tomassone et al., 2018). La razón de esto no está clara, pero puede deberse a la selección natural de individuos capaces de generar una respuesta inmune que controle la infección.

#### 4.2.5 PATOGENIA

Para cualquier parásito, el éxito de supervivencia depende en gran medida de su propia capacidad para evadir la respuesta inmunitaria del huésped a través de diferentes estrategias de actuación. El papel de la respuesta inmune durante la infección por *L. infantum* en el perro es clave (Tizard, 2013), así como en la aparición de las diferentes manifestaciones clínicas.

En este sentido, el sistema inmune y la base genética son probablemente los factores más importantes que determinan la presentación clínica de la enfermedad, aunque también puede influir la edad, el sexo, el estado nutricional, las infecciones previas o enfermedades concomitantes del perro, así como la virulencia de la cepa de *Leishmania* y la carga parasitaria (Solano-Gallego et al., 2009).

*Leishmania spp.* tiene tres características patogénicas generales. En primer lugar, la célula diana del parásito es el macrófago, cuya actividad antibacteriana se inhibe y se convierte en el sitio de replicación del mismo. En segundo lugar, el establecimiento de la infección y la evolución de la enfermedad dependen de la respuesta inmunitaria del huésped. En tercer lugar, una vez establecida la infección, suele persistir en los tejidos quedando localizada en aquellos en los que existen grandes cantidades de células monocíticas-macrófagos (Paltrinieri et al., 2010).

El vector inocula los promastigotes a través de la dermis del perro y debido a sustancias tensoactivas en la saliva de los flebótomos, los macrófagos son atraídos al sitio de inoculación, donde capturan promastigotes y producen la endocitosis de los mismos. Dentro de los fagolisosomas de los macrófagos, estos pierden su flagelo y se convierten en amastigotes (Miró et al., 2001), que al multiplicarse provocan la ruptura del macrófago y una vez liberados ingresan en otras células diseminándose a partir del sitio inicial y transitando por todo el cuerpo, localizándose principalmente en órganos hemolinfáticos como los nódulos linfáticos, bazo y médula ósea.

Continúan la multiplicación en estos lugares y de ahí se propagan a otros sitios como la piel, riñones, hígado, tubo digestivo, ojos, articulaciones, etc. (*Baneth y Solano-Gallego, 2011; Miró et al., 2001*).

La inoculación del promastigote en el perro origina dos tipos de respuestas inmunitarias, una primera respuesta inespecífica de tipo innato y otra más específica que intenta eliminar de forma selectiva al agente invasor. La respuesta inespecífica de tipo innato actúa como primera línea de defensa activando funciones inflamatorias y antimicrobianas para contener al patógeno. A su vez, esta respuesta induce la aparición de la respuesta específica mediada por linfocitos T Helper CD4+, capaz de eliminar de forma selectiva al parásito y establecer una memoria inmunológica. Esta última respuesta es la que va a diferenciar entre perros resistentes y sensibles a la enfermedad, dependiendo de si el animal desarrolla una inmunidad de tipo celular o de tipo humoral respectivamente.

Un animal resistente a la enfermedad es aquel que desarrolla principalmente una inmunidad celular, por estimulación de los linfocitos Th1 que liberan citoquinas como IL2, IL12 y gamma interferón que facilitan la fagocitosis y destrucción del parásito por la actividad específica de células citotóxicas que destruyen con óxido nítrico las células infectadas por amastigotes. Un animal sensible es aquel que desarrolla principalmente inmunidad humoral mediada por linfocitos Th2 que producen citoquinas como IL4, IL10 y IL5 que estimulan la proliferación de linfocitos B y la producción de inmunoglobulinas IgG, IgA, IgE e IgM. Las inmunoglobulinas de tipo IgG son las más importantes y el resto actúan como anticuerpos contribuyendo al carácter inmunitario de la enfermedad (*Bernal Gambín, 2017*). La patogenia de la leishmaniasis clínica típica se debe principalmente a la respuesta humoral del hospedador

Por lo tanto, la inmunidad que protege de la enfermedad en los perros es mediada por células Th1 y es ampliamente aceptado que los macrófagos juegan un papel central en el control de la infección (*Pinelli et al., 1995*).

Los perros de pelo corto tienen más probabilidades de ser picados por flebótomos que aquellos de pelo largo (*França-Silva et al., 2003*); y los machos son más propensos a desarrollar la enfermedad en comparación con las hembras (*Miranda et al., 2008*), lo cual puede ser atribuido a su mayor comportamiento itinerante combinado con el hecho de que son utilizados como perros guardianes con más frecuencia que las hembras, lo que significa un mayor riesgo de infección.

Sin embargo, los datos obtenidos de diferentes estudios sugieren que los niveles de exposición entre el género y los grupos de edad pueden variar según la región (Mencke, 2011). Que los perros sean resistentes o susceptibles depende de la capacidad del sistema inmunitario del animal para hacer frente a *L.infantum*.

La situación de resistencia o susceptibilidad no es estática, cualquier situación de estrés, un tratamiento farmacológico o una enfermedad inmunosupresora concomitante repercutirá en el sistema inmunitario, lo que hace que un perro que era capaz de controlar la infección desarrolle la enfermedad clínica (Solano-Gallego et al., 2009).

#### **4.2.6 MANIFESTACIONES CLÍNICAS**

La presentación clínica de la LVC es muy amplia y variable, debido principalmente a los diversos tipos de respuesta inmunitaria que existen en el perro y a la multiplicidad de los mecanismos patogénicos (Miró et al., 2001; Solano-gallego, 2013). La clasificación según los signos clínicos presentes en los animales se puede dividir en: asintomáticos (ausencia de signos clínicos compatibles con LVC), oligosintomáticos (hasta tres signos clínicos) y polisintomáticos (con más de tres signos clínicos compatibles) (Ministério da Saúde, 2014).

La enfermedad puede cursar de forma crónica y multisistémica con manifestación subclínica o como una enfermedad grave que puede conducir a la muerte del animal (Solano-Gallego et al., 2009).

##### **4.2.6.1 Manifestaciones sistémicas**

Si bien no existen signos específicos de la enfermedad, son comunes diversas manifestaciones clínicas como adenopatías localizadas o generalizadas en el 70-80% de los perros (Ferrer y Roura, 2010).

Los animales enfermos presentan pérdida de peso, asociada con la pérdida del apetito, que en casos extremos puede conducir a la caquexia, como se visualiza en la figura 5 (C y E) (Ciaramella et al., 1997), atrofia muscular, palidez de las mucosas debido a la anemia, hepatoesplenomegalia (Alexandre-Pires et al., 2006), epistaxis asociada a procesos inflamatorios de la mucosa nasal, hematuria por vasculitis inmunomediadas debidas al depósito de inmunocomplejos y fiebre en muy raras ocasiones (Baneth y Solano-Gallego., 2012).

La diarrea con o sin melena es común en los trastornos digestivos, a causa de una colitis ulcerosa posterior a la proliferación de los parásitos en la mucosa intestinal (*Adamama-Moraitou et al., 2007; Ferrer et al., 1991*), así como vómitos posiblemente relacionados con anomalías hepáticas (*Ikeda-García et al., 2007*).

Se han descrito casos de encefalitis y procesos inflamatorios en el sistema nervioso que pueden o no estar relacionados con la presencia de otros agentes infecciosos como *Toxoplasma gondii* o *Neospora caninum* (*Sakamoto et al., 2013*).

La enfermedad renal es muy común, encontrándose insuficiencia renal crónica (IRC) en el 50% de los perros con leishmaniasis (*Cortadellas et al., 2006*) y en ocasiones es la única manifestación clínica presente. Los depósitos de inmunocomplejos a nivel glomerular conducen a la glomerulonefritis, que inicialmente puede ser reversible, pero a medida que la enfermedad progresa se desarrolla una enfermedad renal grave con azotemia, pérdida de proteínas en la orina y anemia (*Koutinas et al., 1999; Zatelli et al., 2003*).

#### **4.2.6.2 Signos oculares**

La prevalencia descrita de lesiones oculares y perioculares oscila entre el 16% y el 80,5% (esta variación en la prevalencia puede deberse a un examen oftalmológico incompleto) y puede ser la única manifestación clínica en el 15% de los casos (*Baneth et al., 2008; Koutinas y Koutinas, 2014; Peña et al., 2000*).

La manifestación ocular más común es la uveítis anterior, caracterizada por edema, miosis, formación de fibrina en la cámara anterior y múltiples nódulos en el cuerpo del iris (*García-Alonso et al., 1996; Peña et al., 2000*). La uveítis posterior a menudo se acompaña de uveítis anterior, pero la tasa de diagnóstico es baja.

Otras manifestaciones oculares asociadas incluyen blefaritis, conjuntivitis, blefaroconjuntivitis, queratitis, queratoconjuntivitis seca, glaucoma, uveítis posterior, panuveítis y panoftalmitis (*Ciaramella et al., 1997; Giles et al., 1975; McConnell et al., 1970; Molleda et al., 1993; Peña et al., 2000*).

Se recomienda incluir un examen oftalmológico dentro del protocolo diagnóstico en todos aquellos perros que presuntamente puedan estar afectados de leishmaniasis, debido a que la enfermedad puede afectar todas las estructuras oculares.

### **4.2.6.3 Manifestaciones clínicas cutáneas**

Durante el curso de la enfermedad, las lesiones cutáneas son la presentación clínica más común y se describen en el 81-89 % de los perros afectados, con diversos cambios desde el punto de vista clínico e histopatológico (*Baneth y Solano-Gallego, 2012; Solano-Gallego et al., 2009*). Las manifestaciones cutáneas típicas incluyen dermatitis descamativa, dermatitis ulcerativa que involucra prominencias óseas, dermatitis papular y onicogriposis.

#### 4.2.6.3.1 Dermatitis descamativa:

Descrita hasta en un 90,9% de los perros afectados (*Koutinas et al., 1992*), representa el problema cutáneo más común en la leishmaniasis canina (*Ferrer et al., 1988; Koutinas et al., 1992; Papadogiannakis et al., 2005*).

Las escamas típicas son bastante grandes, secas, de color blanco nacarado y relativamente adheridas a la superficie de la piel. En primer lugar, involucran la piel facial, comúnmente en un patrón simétrico que incluye el área periocular, pabellón auricular y la parte dorsal de la nariz, como se observa en la figura 5 (B), pudiendo afectar solamente la cabeza. Sin embargo, las escamas tienden a afectar progresivamente las cuatro extremidades y el tronco. La descamación no suele ir acompañada de prurito y precede a la alopecia que tiende a ser parcial más que completa. Si las escamas son adherentes y no se acompañan de alopecia, pueden ser más palpables que visibles, especialmente en las extremidades distales y quitarlas puede revelar la piel erosionada debajo de ellas (*Solano-Gallego, 2013*).

#### 4.2.6.3.2 Dermatitis ulcerativa que afecta las prominencias óseas

Las lesiones ulcerativo-costrosas son el segundo tipo más común de lesiones cutáneas que se observan durante el proceso de la enfermedad, conocidas como úlceras persistentes y bien delimitadas, que varían de 1 a 4 cm de diámetro, ubicadas en correspondencia con las prominencias óseas, especialmente en las articulaciones del carpo y tarso, como se muestra en la figura 5 (D) (*Ferrer et al., 1988; Koutinas et al., 1992*).

#### 4.2.6.3.3 Dermatitis papular

Se caracteriza clínicamente por la presencia de pápulas persistentes en número variable, de color rosa a amarillento, distribuidas en zonas sin pelo de perros de pelo

corto (cara interna de los pabellones auriculares, labios, párpados, alrededor del plano nasal y abdomen) (Bottero et al., 2006; Noli et al., 2006; Ordeix et al., 2005).

En base al cuadro clínico, patológico e inmunológico, se cree que estas pápulas se presentan en el sitio de inoculación y multiplicación del parásito, por lo que el número de lesiones puede estar relacionado con el número de picaduras por parte de los flebótomos o la carga parasitaria de los mismos (Ordeix et al., 2005).

#### 4.2.6.3.4 Onicogrifosis

Problema dermatológico caracterizado por un crecimiento excesivo de las uñas típico de la leishmaniasis canina (Koutinas et al., 2010; Mahmood, 2007). Se detecta en aproximadamente un 24-90% de los casos como un signo clínico tardío y suele asociarse a otros signos cutáneos de la enfermedad. Clínicamente, se caracteriza por hipertrofia y curvatura anormal de las uñas, como se muestra en la figura 5 (A) (Koutinas et al., 2010).



Figura 5 **Manifestaciones clínicas de LVC sintomática.** . **A)** Onicogrifosis, **B)** Dermatitis descamativa en plano nasal, **C)** Linfadenomegalia en ganglio poplíteo, **D)** Lesión ulcerativa en prominencia ósea y **E)** Pérdida de peso y atrofia muscular. Fotos: Dinora Satragno

#### **4.2.6.4 Alteraciones clínico patológicas:**

Es importante destacar que la LVC no presenta cambios clinicopatológicos patognomónicos de la enfermedad, debido a esto, debe realizarse siempre un diagnóstico diferencial.

En el perfil clínico-patológico, los resultados de la analítica sanguínea pueden orientar a un diagnóstico, además de aportar un seguimiento de los perros enfermos. Las alteraciones más frecuentemente encontradas son la hiperproteïnemia con hipergamaglobulinemia e hipoalbuminemia con pérdida de la relación albúmina /globulina (*Ramayo et al., 2011*). También se pueden encontrar trombocitopenia y anemia, caracterizada esta última por ser normocítica, normocrómica y no regenerativa, que a menudo se desarrolla como resultado de la disminución de la eritropoyesis debido a la inflamación crónica de la médula ósea (*Paltrinieri et al., 2010*). A medida que avanza la enfermedad, se observan cambios en los perfiles bioquímicos (renal y hepático), debido al depósito de inmunocomplejos en el hígado y glomérulo renal, determinando un aumento de enzimas hepáticas, urea y creatinina. La causa más frecuente de alteraciones en el urianálisis en perros con leishmaniasis clínica es la presencia de proteinuria (*Baneth y Solano-Gallego, 2012; Petanides et al., 2008*).

Como método diagnóstico complementario, la ecografía aporta datos sobre cambios morfológicos y estructurales en órganos intraabdominales, siendo frecuente la presencia de hepatoesplenomegalia (*Camoletto, Lockett, Ludeño, Mussart, Gianceselli; 2020*).

Por lo visto anteriormente, debe considerarse para el diagnóstico, que tanto las manifestaciones viscerales como cutáneas de LVC pueden encontrarse simultáneamente en perros, a diferencia de lo que sucede en los humanos.

Además, los perros domésticos pueden infectarse con una variedad de protozoos, de los cuales, muchos de estos pueden tener potencial zoonótico y ser letales para los animales y los humanos. La infección con uno de ellos parece aumentar la susceptibilidad de infección por otro, posiblemente debido a la inmunosupresión del perro infectado (*Cringoli et al., 2002*). Debido a la creciente relación entre humano-perro y el papel que este último juega como miembro de la familia, el estudio de estos patógenos y la detección de coinfecciones son de gran relevancia epidemiológica (*Coelho et al., 2013*).

Por lo tanto, teniendo en cuenta el concepto de “Una sola Salud “(OIE 2021), comprender su prevalencia puede ayudar a desarrollar estrategias adecuadas de manejo de enfermedades que beneficien la salud humana y animal.

La presencia de reacciones cruzadas con otros agentes infecciosos como *Babesia canis*, *Ehrlichia canis*, *Neospora caninum*, *Hepatozoon canis*, *Toxoplasma gondii* y *Trypanosoma cruzi* también han sido descritas (Mancianti y col., 1996; Mettler y col., 2005; Lemos y col., 2008).

*Toxoplasma gondii*, parásito intracelular perteneciente al orden *Coccidia* y Phylum Apicomplexa; causa una enfermedad endémica a nivel mundial que infecta a muchas especies de sangre caliente, incluido el ser humano, siendo el felino huésped definitivo y el perro huésped intermediario en la cadena biológica del parásito (Leal y Coelho, 2014; Rey, 2013). Los factores inmunosupresores disminuyen la inmunidad del huésped provocando la ruptura de quistes tisulares preexistentes, reactivando infecciones latentes (Costa da Silva et al., 2015).

Aunque la tasa de prevalencia en Uruguay no está registrada, entre 1997 y 2003, la provincia de Buenos Aires y Capital Federal reportó una seroprevalencia felina del 44% y canina del 28%. La prevalencia reportada en perros osciló entre 21,3% y 85% en Brasil (Falco de Brito et al., 2002), con una prevalencia de 84% en felinos en 2006 (Ricardo Durlach et al. y Pablo Martino, 2009).

En perros, la infección puede ser asintomática o producir manifestaciones clínicas variables según el órgano afectado con signos inespecíficos, respiratorios, oculares, alteraciones neuromusculares y/o articulares (Tabar y Vilafranca, 2009).

Los perros, aunque no son huésped final, también están involucrados en la transmisión y mantenimiento del agente, actuando como centinelas para evaluar la contaminación ambiental, ya que cuando la especie es altamente seropositiva, el ambiente en el que vive seguramente estará contaminado por la forma infectante (oocitos) o los perros pueden estar siendo alimentados con carne cruda o mal cocida conteniendo quistes. Por lo tanto, la seropositividad para *T.gondii* en la población canina es indicativa de un riesgo de exposición para los seres humanos y otros animales susceptibles (Herman et al., 1985; Paiva et., 2014). Las dos principales fuentes de infección en humanos son los ooquistes emitidos con las heces del gato y la ingestión de carne insuficientemente sometida al calor (Freyre, Falcón y Oliveira-Madeira, 1988).

Por otro lado, la neosporosis es una enfermedad parasitaria emergente en América del Sur, causada por el protozoario *Neospora caninum*, perteneciente al Phylum Apicomplexa y ampliamente distribuida en el mundo.

La prevalencia de la enfermedad varía según la región, con datos de 37.8% en Argentina (*Basso et al., 2001*), 8.3% en Brasil (*Cañón-Franco et al., 2003*), y 20% en Uruguay (*Barber et al., 1997b*). En Uruguay, la mayor parte de la investigación sobre la enfermedad se ha centrado en el ganado bovino, debido a las importantes pérdidas millonarias en el rubro a causa del aborto como consecuencia de la misma, por lo que, dada la importancia de la producción ganadera, es imperativo considerar a los perros, sus principales hospederos definitivos que actúan como fuente de diseminación de la enfermedad (*Satragno, Pavón-Rocha, Rábago-Castro, de la Cruz-Hernández, 2020*).

El perro, huésped intermediario y definitivo, puede transmitir el parásito a los bovinos de forma horizontal mediante la ingestión de alimentos o agua contaminada con los ooquistes del protozoo excretados por las heces de perros en la fase aguda de la infección (*McAllister et al., 2000*). En el perro, si bien los signos clínicos descriptos originalmente fueron neurológicos también se notificaron cuadros de origen respiratorio, digestivo, dermatológico y cardíaco (*Piaggio, Delucchi, Bañales, y Easton, 2007*).

Dada la naturaleza oportunista de los parásitos, la aparición de coinfecciones puede contribuir a la presentación clínica de algunos protozoos debido a la supresión del sistema inmunológico del animal a favor de la activación de otro patógeno, provocando manifestaciones clínicas inespecíficas (*Girardi et al., 2014*).

#### 4.2.7 DIAGNÓSTICO

Actualmente, el diagnóstico de LVC sigue siendo un problema para los servicios veterinarios privados y de salud pública debido a la gran variedad de signos y síntomas clínicos, que a su vez pueden deberse a otras patologías y la falta de pruebas diagnósticas 100% sensibles y específicas (OMS, 2019 a).

El diagnóstico clínico también es difícil debido a la gran proporción de perros asintomáticos existentes (Manancianti et al., 1988).

Por todo ello, es necesario un abordaje integral para aumentar el índice de sospecha de la enfermedad (Solano-Gallego y Baneth, 2008).

Es importante un registro de datos del animal sospechoso, que incluya una anamnesis completa de información epidemiológica relevante, incluido el hábitat, si vive o ha viajado a un área endémica conocida y por lo tanto ha estado expuesto a los vectores flebótomos, si recibió tratamientos preventivos contra los flebótomos o si se administraron tratamientos que pueden interferir con la eficiencia del sistema inmunológico (Paltrinieri et al., 2010).

Además de la complejidad diagnóstica debido al polimorfismo en la presentación clínica, en entornos socioeconómicos más bajos pueden estar involucrados otros factores que aumentan la dificultad del diagnóstico clínico, especialmente enfermedades de la piel y desnutrición, enmascarando la presentación clínica de LVC (Ministério da Saúde, 2003). Los animales con síntomas compatibles con la enfermedad y que vivan o permanezcan en áreas consideradas de riesgo de transmisión deben considerarse 'sospechosos' (Miró et al., 2001).

Existen muchas técnicas diagnósticas donde se incluye la serología, citología/histología, cultivo, técnicas moleculares y otras técnicas inmunológicas (Solano-Gallego et al., 2009), aunque el diagnóstico final requiere que el parásito se encuentre en los tejidos de los perros sospechosos de infección (Solano-Gallego et al., 2009). La sensibilidad de cualquier método de diagnóstico parece variar durante el curso de la enfermedad, así como entre individuos, ya que la seroconversión en los perros infectados naturalmente ocurre de 1 a 22 meses post infección.

Las pruebas parasitológicas y la PCR son más sensibles al inicio de la infección, antes de la seroconversión o la aparición de signos clínicos. A medida que la enfermedad avanza, las diferencias entre los individuos y su capacidad para controlarla conducen a un aumento de la seroconversión y la parasitemia y

entonces, los perros se evalúan mejor mediante exámenes serológicos y parasitológicos. Al momento de la elección de una u otra técnica diagnóstica, se debe tener en cuenta que las mismas van a diferir en sensibilidad y especificidad, van a presentar reacciones cruzadas con otros agentes infecciosos y tienen diferente rendimiento según la carga parasitaria y sintomatología clínica (Solano-Gallego et al., 2010).

Las pruebas serológicas se han convertido en la elección para el diagnóstico de la LVC (MSP, 2016a). Estas incluyen la Inmunofluorescencia indirecta (IFI), el método inmunoenzimático (ELISA), el test de aglutinación directa (DAT), el Western blot (WB) y la inmunocromatografía (Gállego, 2004). Cuando se utilizan técnicas serológicas para el diagnóstico, también se deben considerar posibles falsos positivos por reactividad cruzada con otros agentes patógenos (Solano-Gallego et al., 2009). Se debe tener en cuenta que los valores de todas las herramientas de inmunodiagnóstico pueden variar según la intensidad de transmisión, el entorno geográfico y el estándar de referencia (gold standard) utilizado (OMS, 2019 b).

La técnica utilizada en Uruguay es la prueba cualitativa rápida de inmunocromatografía que emplea el antígeno recombinante rK39 InBios específico del complejo *L. donovani* (que incluye a *L. infantum*) y de esta manera detecta los anticuerpos en el suero canino contra el antígeno de *Leishmania* (MSP, 2016a). Esta es una prueba sencilla de realizar, con valores de sensibilidad y especificidad superiores al 95% (Grill y Zurmendi, 2017). Se recomienda su uso en zonas donde la proporción de perros sintomáticos es mayor que la de perros asintomáticos, ya que la sensibilidad en este último grupo es demasiado baja. Al igual que todas las pruebas serológicas, esta prueba inmunocromatográfica no debe utilizarse como único criterio para el diagnóstico de leishmaniasis, ya que sólo indica la presencia de anticuerpos anti *Leishmania* (MSP, 2016).

También se pueden utilizar exámenes complementarios y sugestivos de diagnóstico como pueden ser el hemograma, perfil bioquímico (hepático y renal) y el análisis de orina (Miró et al., 2001; Núñez Ochoa, 2007).

El diagnóstico parasitológico es el método definitivo basado en la demostración del parásito obtenido a partir de material biológico de punción hepática, esplénica, linfonodos, médula ósea o escarificación de la piel. Estos procedimientos son invasivos por lo que significa un riesgo para los animales (Ministério da Saúde, 2014).

La especificidad del método parasitológico es de aproximadamente 100% y la sensibilidad depende del grado de parasitemia, tipo de material biológico colectado y el tiempo de lectura de la lámina, estando entorno del 80% para perros sintomáticos y menor todavía para perros asintomáticos (*Ministério da Saúde 2003*).

Para el diagnóstico de *Toxoplasma gondii* y *Neospora caninum* se utilizan métodos directos, que permiten detectar la presencia del parásito o de su ADN, e indirectos que implican la detección de anticuerpos anti- *N.caninum* y anti-*T.gondii* tanto en hospedadores definitivos como en intermediarios mediante distintas técnicas serológicas. En caninos, el diagnóstico se realiza principalmente por métodos serológicos, aunque en el caso de la neosporosis es posible realizar la identificación de ooquistes en materia fecal por técnicas de concentración (*Basso et al., 2001b*).

Las pruebas indirectas más utilizadas son la técnica de Inmunofluorescencia indirecta (IFI), aglutinación indirecta (HAI) y enzima inmunoensayo (ELISA). Estas pruebas presentan distinta sensibilidad y especificidad según las características del antígeno utilizado (*Venturini et al., 2014*). Para el diagnóstico serológico de *Neospora caninum*, el test que se encuentra en Uruguay en el laboratorio veterinario oficial (DILAVE) es el de Inmunofluorescencia indirecta (IFI) (*Piaggio, Delucchi, Bañales, y Easton, 2007*). Esta es la técnica más utilizada en la actualidad, que utiliza taquizoitos enteros fijados a un portaobjetos como antígeno que se enfrenta al suero problema. Para revelar la unión se utiliza un conjugado unido a una sustancia fluorescente o fluorocromo, que al ser excitada por la luz ultravioleta emite un haz de luz de mayor longitud de onda, que se visualiza con un microscopio de fluorescencia.

Otra de las pruebas empleadas es la prueba de Aglutinación indirecta (HAI) utilizada para el diagnóstico de toxoplasmosis. En esta prueba, las fracciones antigénicas son adsorbidas a partículas utilizadas como soporte (glóbulos rojos, partículas de látex). Si bien esta técnica puede utilizarse para estudios de prevalencia serológica, no es capaz de detectar etapas tempranas de la infección (*Gos, 2016*).

#### 4.2.8 TRATAMIENTO

Uruguay se rige actualmente por las recomendaciones de *OPS/OMS*, que incluyen el no tratamiento de animales positivos y la eutanasia humanitaria de la mascota con el fin de eliminar la oferta parasitaria a los vectores, medida que se lleva a cabo solo si existe el consentimiento de sus dueños (*Basmadján, 2021*). El tratamiento en perros infectados no es una medida recomendada ya que no reduce la importancia del perro como reservorio del parásito y continúa siendo fuente de infección para los vectores (*Ministério da Saúde, 2014*).

En los países europeos de la cuenca mediterránea, el tratamiento de perros infectados se practica ampliamente con el propósito de prolongar la vida del animal mediante la reducción de la carga parasitaria y de los síntomas clínicos (*Solano-Gallego et al., 2009*). Aunque esta medida reduce los síntomas en animales enfermos, no lleva a la cura completa y no previene la ocurrencia de recaídas (*Travi et al, 2018*). De hecho, en el continente europeo, donde se ha utilizado intensamente el tratamiento en perros, se observa un aumento en la prevalencia de LV humana y canina en los últimos años (*Sánchez et al., 2009*).

Si bien existen varios protocolos de tratamiento para la leishmaniasis canina (Tabla 1), como la asociación de antimonio de meglumina y el Alopurinol, así como la Miltefosina, su duración y dosificación dependen del estado clínico del perro y estos fármacos solo promueven una mejoría o cura clínica, permaneciendo los perros parasitados y con frecuentes recaídas.

Por otro lado, los fármacos utilizados en forma primaria para la leishmaniasis humana no deberían ser utilizados para tratar la leishmaniasis canina debido a su baja eficacia parasiticida en perros y al riesgo de resistencia del parásito a estos tratamientos farmacológicos (*OMS, 2010*).

<b>Drogas</b>	<b>Dosis</b>	<b>Principales efectos secundarios</b>
Antimoniato de meglumina	100 mg/kg S.C., SID o dividido en dos dosis durante 4-6 semanas.	Posible nefrotoxicidad Dolor e inflamación en el punto de inyección
Miltefosina	2 mg/kg V.O., una vez al día durante 28 días	Vómitos/ Diarreas
Alopurinol	10 mg/kg V.O., dos veces al día durante al menos 6-12 meses	Xantinuria
Domperidona	0,5 mg/kg V.O., una vez al día durante 1 mes	Galactorrea

Tabla 1 **Protocolos actuales de tratamiento para LVC**. V.O.: vía oral; S.C.: vía subcutánea.

Fuente: <https://www.leishvet.org/>

#### 4.2.9 CONTROL Y PREVENCIÓN

El control de esta enfermedad se basa en la vigilancia activa, sobre todo canina y en la educación de la comunidad. Las estrategias incluyen el control de población de los flebotómicos, la interrupción de la circulación de parásitos a los reservorios, el diagnóstico temprano de la enfermedad, la promoción de la tenencia responsable de mascotas y un adecuado manejo ambiental (*Ministerio de Salud Pública, 2016a*).

La complejidad de la enfermedad y su importancia en medicina humana y veterinaria hacen que su control efectivo requiera un abordaje multidisciplinario (*Palatnik de Sousa y Day, 2011*).

Las medidas de prevención deben ir encaminadas a evitar la propagación de *L.infantum* en las diferentes etapas de su ciclo. Una de las medidas que puede frenar la propagación de la enfermedad es el control de la población de flebotomos basado en la gestión ambiental. Se recomienda a la población mantener limpio el peridomicilio humano, teniendo en cuenta que las larvas del insecto se desarrollan en el exterior de las viviendas, donde hay acumulación de materia orgánica disponible para el desarrollo larvario como ser materias fecales, restos de comida, basura o acúmulos de residuos vegetales que conserven altos niveles de humedad (*Basmadján, Supparo y Hernández, 2021*). El uso indiscriminado de insecticidas en el ambiente no está recomendado, por ser de muy corta duración y dispersión espacial, producir contaminación ambiental, favorecer la resistencia y tener efectividad limitada, ya que solo elimina flebotomos adultos.

En las personas, se aconsejan medidas de protección individual, como usar ropa que cubra la mayor parte del cuerpo, uso de repelentes y la no exposición en los horarios de mayor actividad del vector en lugares donde puede ser habitualmente encontrado (*Ministério da Saúde, 2014*). También se recomienda colocar mosquiteros en puertas y ventanas para evitar la entrada de flebotomos a la vivienda.

En animales, la medida preventiva más aceptada es el uso de insecticidas que contengan deltametrina (un piretroide sintético), en collares (Scalibor®) o en productos spot-on. Los piretroides son tóxicos e irritantes para los flebotomos, causando desorientación y muerte, impidiendo la alimentación y por lo tanto bloqueando la propagación de *L. infantum* (*Otranto y Dantas-Torres, 2013*).

El efecto repelente es variable y puede oscilar entre 1 y 8 meses, dependiendo de la forma de aplicación o formulación de cada producto (*David et al., 2001; Reithinger et al., 2004*). Se recomienda monitorear perros sanos durante las horas de mayor actividad de los flebótomos (desde el crepúsculo hasta el amanecer).

También es importante la tenencia responsable de mascotas, evitando el traslado de perros de zonas endémicas a otras zonas o el ingreso de nuevos perros a zonas de transmisión, así como denunciar la presencia de animales sin dueño (*Basmadján et al., 2021*). De acuerdo con el Manual de Pruebas de Diagnóstico y Vacunas en los Animales Terrestres de la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE), a partir del 1 de abril de 2017, los perros provenientes de países o zonas con leishmaniasis deben ser sometidos a una prueba de respuesta inmune negativa al ingresar al país (*MGAP, 2016*).

Existen vacunas comerciales contra la leishmaniasis canina, que no han sido aprobadas para su uso en Uruguay, actualmente existen dos en el mercado global, una en Europa y otra en Brasil, con diferentes grados de protección, interfiriendo con el diagnóstico serológico de las técnicas utilizadas en nuestro país por no ser posible la discriminación de anticuerpos vacunales de los generados por la infección natural (*MSP, 2019 a*). Actualmente no hay estudios que demuestren su eficacia, por lo que no ha sido validado como estrategia para el control de la enfermedad en humanos (*OMS, 2019 a*).

Debido a la complejidad de su ciclo biológico, es una enfermedad extremadamente difícil de controlar. Por ello, son necesarias las medidas preventivas como la colocación de collares repelentes, el seguimiento serológico de los perros y la implementación de sistemas para la detección precoz de casos humanos (*Armúa y Venzal, 2019*). Es importante saber que el uso de todas estas medidas de prevención no protegerá al perro al 100% de la infección, pero reducirá en gran medida el riesgo de transmisión del parásito (*MSP, 2019 a*).

Las alianzas y colaboraciones con diferentes sectores interesados y otros programas de lucha contra enfermedades transmitidas por vectores son esenciales en todos los niveles (*Borba et al 2019*).

La infección simultánea de múltiples patógenos en un mismo huésped, como la presencia de *Leishmania infantum*, *Toxoplasma gondii* y/o *Neospora caninum*, carece de estudios en nuestro país debido a la reciente introducción de *L.infantum*, con los primeros reportes positivos en caninos de la ciudad de Salto en el año 2015 y 2016 en la ciudad de Bella Unión. A nivel regional son pocos los reportes de coinfecciones con estos agentes, los cuales advierten que ante una disminución de la inmunidad del huésped se produce una activación de quistes tisulares preexistentes de *Toxoplasma gondii* y *Neospora caninum* reactivando infecciones latentes (Costa da Silva et al., 2015). Por lo expresado anteriormente nos planteamos analizar y describir la infección simultánea de dichos patógenos en caninos en Uruguay.

## **5. HIPÓTESIS**

La coinfección de *Leishmania infantum* con *Toxoplasma gondii* y/o *Neospora caninum* afecta el perfil clínico de los caninos con LVC en la ciudad de Bella Unión.

## **6. OBJETIVOS**

### **6.1 Objetivo general**

Mediante una evaluación clínica y posterior estudio serológico, contribuir al conocimiento en el diagnóstico y repercusiones clínicas de la coinfección de *Leishmania infantum* con *Toxoplasma gondii* y/o *Neospora caninum*, en caninos que viven en áreas de transmisión activa de LVC en la ciudad de Bella Unión.

### **6.2 Objetivos específicos**

1- Caracterizar clínicamente la presencia de *Leishmania infantum* y la coinfección con *Toxoplasma gondii* y/o *Neospora caninum*.

2- Determinación de la presencia de anticuerpos anti-*Toxoplasma gondii* y *Neospora caninum* a partir de animales con signos compatibles con LVC.

## 7. MATERIALES Y MÉTODOS

### 7.1 Descripción del área de estudio

El área de estudio se delimitó en la zona Norte de Uruguay, país situado en América del Sur que limita por el Norte y Noreste con la República Federativa del Brasil, por el Oeste con la República Argentina a través del río Uruguay, por el Sur con el Río de la Plata y por el Este con el Océano Atlántico (*Servicio Geográfico Militar, 2020*).

La población de Uruguay es de 3.485.152 habitantes, de los cuales el 40% vive en Montevideo y el 55% en áreas urbanas del resto del país. La población canina en nuestro país es de 1.750.000 según el último censo y se desconoce la población canina sin propietarios (*Cotryba, 2017*).

El estudio clínico y diagnóstico fue realizado en la ciudad de Bella Unión (Figura 6), ubicada en el extremo norte del país en el departamento de Artigas, con una población de 12.200 personas que se distribuyen en 3746 viviendas ocupadas (*MSP, 2021*).



Figura 6 Mapa de Uruguay. **Se muestra la ciudad de Bella Unión donde se realizó el muestreo de perros.**

Fuente: *Google Maps*

## 7.2 Estrategia de muestreo de animales y registro epidemiológico

Entre agosto y diciembre de 2019, se seleccionaron al azar 193 perros de propietarios de la ciudad de Bella Unión. Para ello se calculó a priori que serían necesarios 158 perros para obtener una estimación real con un margen de error del  $\pm 5\%$  y un intervalo de confianza (IC) del 95% para un tamaño poblacional desconocido y una prevalencia estimada del 11,7%.

Los mismos fueron muestreados dentro de la zona que el MSP llevó a cabo sus actividades de vigilancia activa y estudio de prevalencia. En la figura 7B se muestran las manzanas con perros positivos en rojo y aquellas que no presentan perros positivos se visualizan en amarillo. Se seleccionaron perros mayores de 6 meses de edad, independientemente del sexo, raza o estado clínico.

La manipulación de los animales de este proyecto se realizó con la aprobación de la Comisión Honoraria de experimentación animal (CHEA) No. 915-19. Para cada perro evaluado se elaboró una ficha clínica (Anexo I) que incluía un cuestionario estandarizado donde previo a la venopunción se especificó la fecha de la toma de muestra de sangre, datos del propietario (nombre, dirección y teléfono) y del animal (nombre, raza, sexo, edad, lugar dónde duerme la mascota durante la noche y sintomatología clínica).

Los perros fueron agrupados según Olivera *et al.* 2015 en los siguientes grupos de edad; **-grupo 1-**, menor o igual a 1 año, **-grupo 2-**, de 1 a 7 años y **-grupo 3-** mayores a 7 años.

Los animales se sometieron a un examen objetivo general y particular correspondiente a los órganos afectados, con una descripción detallada de los signos atribuibles a la LVC (Solano-Gallego *et al.*, 2011).

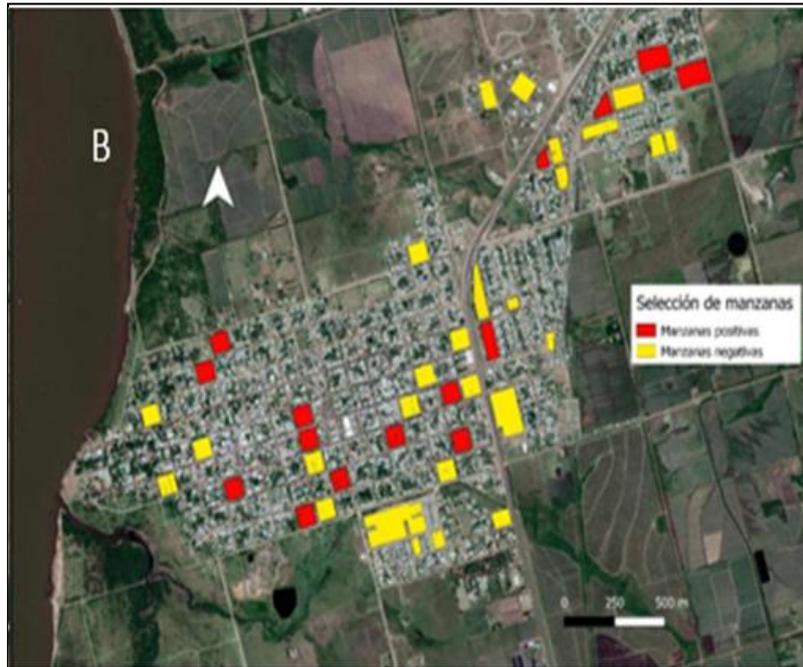


Figura 7 **Zona de muestreo en Bella Unión B**. Se observan las manzanas dentro de las cuales se desarrolló el muestreo. Los puntos rojos, muestran las manzanas de perros positivos a LVC, mientras que los puntos amarillos muestran perros negativos. Fuente: *Google Maps*

### 7.3 Evaluación clínica y colecta de muestras

Cada perro fue examinado clínicamente por un veterinario en busca de signos compatibles con LVC y se registraron en grupos de animales asintomáticos o sintomáticos, según la ausencia o presencia de signos clínicos compatibles como se muestran en la figura 8.

Posterior a la evaluación clínica, se recolectaron 5 ml de sangre periférica de la vena cefálica utilizando una mariposa estéril calibre 21G y una jeringa de 5 ml, previa asepsia con alcohol 70°. Las muestras de sangre recolectadas fueron colocadas en tubos secos con gel separador de suero, los cuales fueron acondicionados y llevados refrigerados al Laboratorio de Análisis Clínicos de FVET UdelaR.

El suero fue obtenido utilizando una centrifuga HuMax 3K. Laboratorio Human durante 15 minutos a 3000 rpm (revoluciones por minuto), siendo posteriormente colocado en tubos eppendorf y almacenados a -20°C hasta el momento de su procesamiento.





Figura 8 **Signos clínicos encontrados durante la exploración clínica:** Onicogriphosis, Lesiones ulcerativas, Queratoconjuntivitis, Lesiones ulcerativas en prominencias óseas, Vasculitis auricular y Epistaxis nasal. Fotos: Soledad Juan

## 8. DIAGNÓSTICO

### 8.1 Detección de anticuerpos anti-*Leishmania*.

#### **Test inmunocromatográfico rK39 (rK39-ICT®)**

Sobre las 193 muestras de suero fue realizado el test rK39 (Kalazar detect™ Rapid test, InBIOS International, Seattle, WA), como se muestra en la figura 9, siguiendo las recomendaciones del fabricante (Anexo II). Esta es la técnica utilizada en Uruguay y consiste en una prueba cualitativa rápida de inmunocromatografía que emplea el antígeno recombinante rK39 InBios específico del complejo *L. donovani* (que incluye a *L. infantum*) y de esta manera detecta los anticuerpos en el suero canino contra el antígeno de *Leishmania* (Ministerio de Salud Pública, 2016a).

Es una prueba sencilla de realizar, con valores de sensibilidad y especificidad superiores al 95% (Grill y Zurmendi, 2017).

De acuerdo a lo descrito por el fabricante, como se observa en la figura 10 se colocaron 20 µl de suero sin conservantes en un extremo definido de la tira y se agregaron 3 gotas de buffer al tubo, con la posterior lectura a los 10 minutos hasta la obtención del resultado. Si contiene anticuerpos anti *Leishmania*, éstos se unirán con el antígeno rK39 y se pondrá en evidencia la reacción positiva coloreando la línea de prueba. La línea de control siempre debe colorearse, haya o no anticuerpos anti *Leishmania*, asegurando la calidad de la prueba. La presencia de dos líneas es indicativa de un resultado positivo (10B), mientras que una línea arroja un resultado negativo (10A).



Figura 9 Kit Kalazar detect™ Rapid test

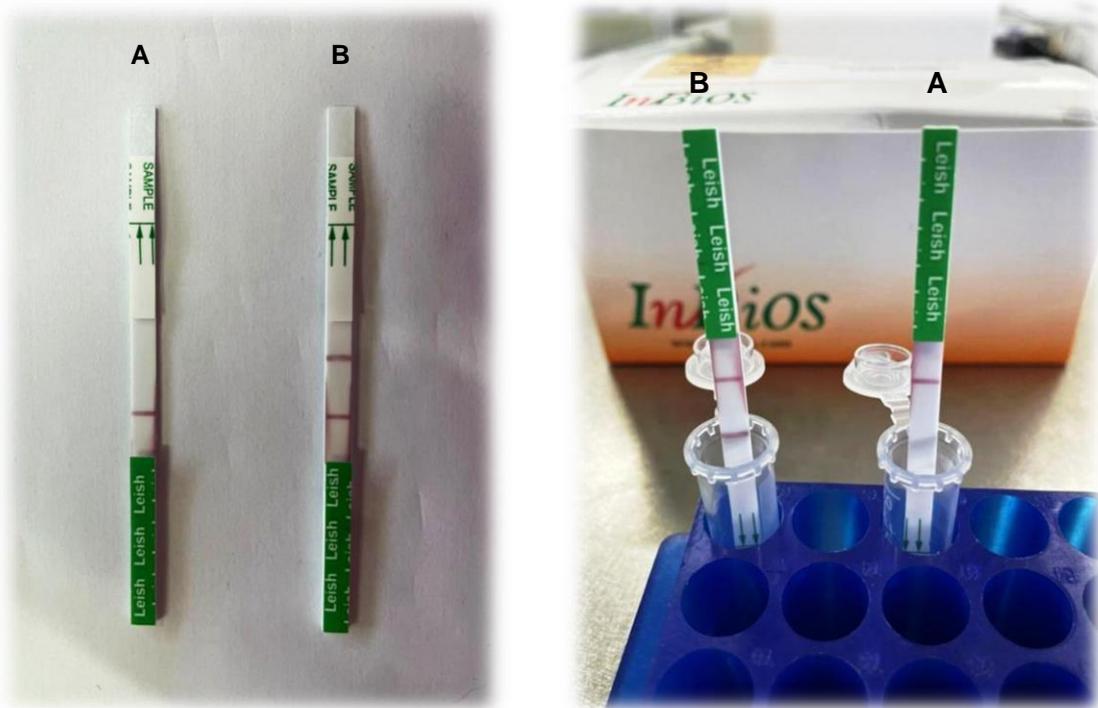


Figura 10 **Tiras inmunocromatográfica indicativas de A. Resultado negativo y B. Resultado positivo.** Fotos: Florencia Miranda

## 8.2 Detección de anticuerpos anti-*Toxoplasma gondii*

### HAI (Hemoaglutinación indirecta)

**Toxotest HAI** es una técnica basada en la propiedad que tienen los anticuerpos anti-*T.gondii* de producir aglutinación en presencia de glóbulos rojos sensibilizados con antígenos citoplasmáticos y de membrana del parásito. El empleo de ambos tipos de antígenos incrementa la sensibilidad del método permitiendo la detección precoz de la infección. Dentro de las técnicas inmunológicas, la HAI es considerada un método confiable para determinar anticuerpos específicos. Sin embargo, sus resultados, al igual que los de cualquier otro método serológico, constituyen únicamente datos auxiliares para el diagnóstico.

Para la realización de esta técnica se tomaron 25 µl de suero siguiendo las recomendaciones según protocolo del Laboratorio Wiener lab grup (Anexo III), como se observa en la figura 11 (A-B).

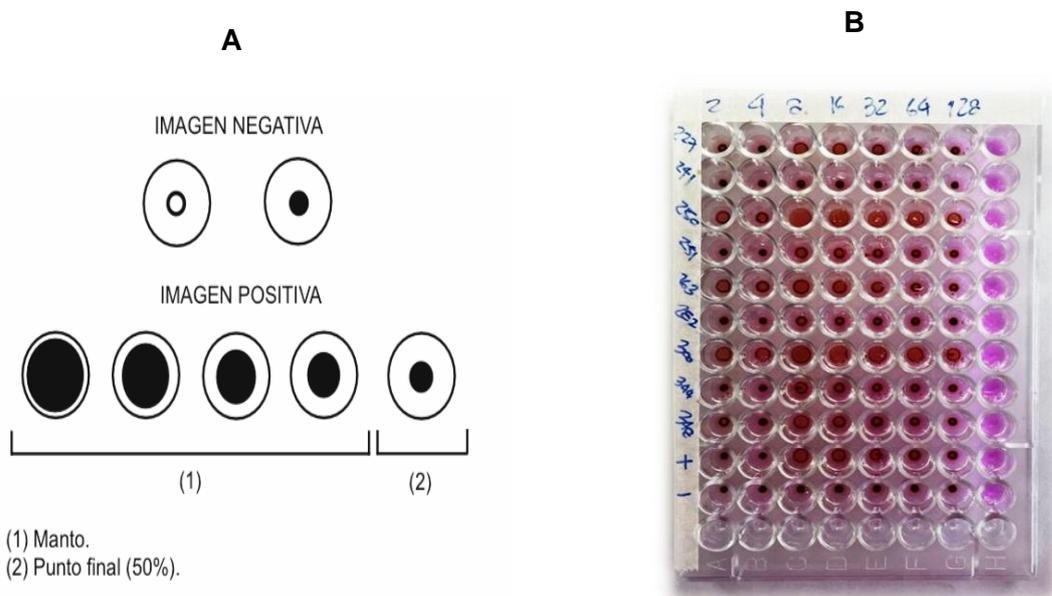


Figura 11 **A. Prueba de hemaglutinación indirecta (HAI) para la detección de anticuerpos contra *Toxoplasma gondii*.** Fuente: <https://www.wiener-lab.com.ar/es-UY/> **B. Placa de hemoaglutinación indirecta (HAI).** Fuente: Florencia Miranda

### 8.3 Detección de anticuerpos anti-*Neospora caninum*

#### ***Inmunofluorescencia indirecta (IFI)***

La detección de anticuerpos anti-*Neospora caninum* fue realizada mediante la técnica de Inmunofluorescencia indirecta (IFI) para la detección semicuantitativa de anticuerpos IgG.

A partir de una muestra de plasma o de suero positiva, se diluye adecuadamente en los posillos de antígeno para permitir una reacción antígeno-anticuerpo a 37 °C. Posteriormente, las proteínas séricas no acopladas e inespecíficas sobrantes se eliminan por lavado de los posillos. En el paso siguiente se adiciona el anticuerpo FITC marcado con fluoresceína y específico a la especie animal, que se acoplará a los complejos antígeno-anticuerpo ya formado (Anexo IV). La evaluación se lleva a cabo por medio de un microscopio de fluorescencia (sistema de filtro para FITC) a 400X, como se observa en las figuras 12 y 13.

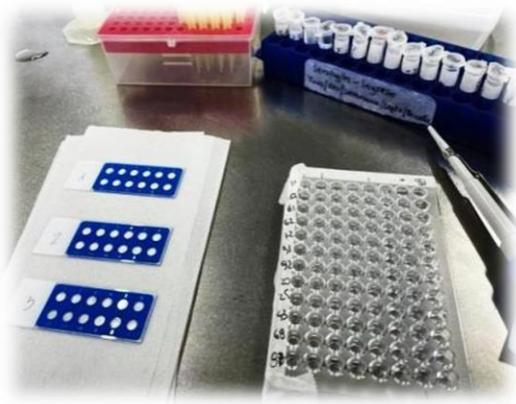


Figura 12 **Materiales de trabajo empleados Para la técnica de Inmunofluorescencia indirecta (IFI).**

Foto: Florencia Miranda

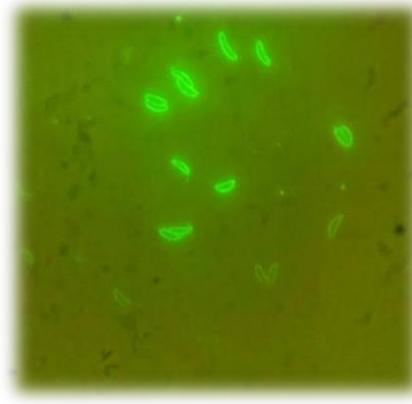


Figura 13 **Taquizoitos de *Neospora caninum***

Foto: Dinora Satragno.

## 9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

### 9.1 Población de estudio

Para el cálculo de perros necesarios para el muestreo no probabilístico, consecutivo o bola de nieve, se utilizó el programa estadístico WinEpi (<http://www.winepi.net/sp/index.htm>) desarrollado y mantenido por la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Zaragoza, España.

### 9.2 Comparativa de variables poblacionales

Para la comparación de variables poblacionales en función de la sintomatología y de la positividad a *Leishmania infantum*, *Toxoplasma gondii* y *Neospora caninum*, se utilizó el programa SAS OnDemand y se realizó un test estadístico de Chi cuadrado. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuándo el valor de p fue  $< 0.05$ . Para evaluar el riesgo, se realizaron estimaciones de riesgo Odds ratio (OR). Si el OR es  $> 1$  y el intervalo de confianza también, significa que es un factor de riesgo. Se utiliza un intervalo de confianza del 95%.

## 10. RESULTADOS

### 10.1 Caracterización de la subpoblación positiva estudiada

Los resultados obtenidos para las variables sexo, raza, categoría etaria, lugar donde pernoctan los animales y presencia o ausencia de signos clínicos en los individuos incluidos en el estudio se muestran en la tabla 2.

De la población total de estudio (n=193), el 40,41% (78/193) fueron positivos para *Leishmania* mediante la técnica inmunocromatográfica rK39. Dentro de este rango numérico, el 44,87% (35/78) eran machos y el 55,13% (43/78) hembras, sin diferencia de género estadísticamente significativa ( $p=0,99$ ).

En cuanto a la raza, los perros cruzados representaron el 67,95% (53/78) de la población positiva en comparación con el 32,05% (25/78) de razas puras y no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en esta variable ( $p=0,81$ ).

Con respecto a la edad de los animales afectados, hubo un registro de variación entre 6 meses y mayores de 7 años. La tasa de infección positiva de perros menores o iguales a 1 año de edad fue del 12,82% (10/78), alcanzando un pico máximo del 67,95% (53/78) en adultos jóvenes de 1 a 7 años y descendiendo gradualmente a medida que progresa la edad con un 19,23% (15/78) en perros mayores de 7 años, estas diferencias en la variable edad no fueron estadísticamente significativas ( $p=0,97$ ). La tasa de infección de los perros que dormían en el exterior del domicilio era del 74,36% (58/78), mientras que aquellos que dormían en el interior del domicilio de un 7,69% (6/78) y los que dormían en el interior como exterior representaron un 17,95% (14/78) de los positivos. En este sentido, hubo una diferencia estadísticamente significativa ( $p<0.0002$ ) en cuanto al lugar donde los animales pernoctaban y su asociación con la positividad. Además mediante el cálculo de la estimación de riesgo, se encontró un  $OR=14$  (3,6-53,8), resultado que indica que esta variable es un factor de riesgo.

De nuestra población positiva total, que representó el 40,41% (78/193), el 73,08% (57/78) tenían signos clínicos compatibles con la enfermedad y el 29,92% (21/78) eran asintomáticos, encontrándose en esta variable (ausencia/presencia de signos clínicos) una diferencia estadísticamente significativa ( $p <0.0003$ ) y una estimación de riesgo de  $OR=3,1$  (1,7-5,7).

Sexo	Raza	Categoría etaria	Lugar donde pernoctan	Signos clínicos
<b>Machos</b>	<b>Cruza</b>	<b>Menor o igual a 1 año</b>	<b>Exterior</b>	<b>C/Signos clínicos</b>
44,87% (35/78)	67,95% (53/78)	12,82% (10/78)	74,36% (58/78)	73,08% (57/78)
<b>Hembras</b>	<b>Raza definida</b>	<b>De 1 a 7 años</b>	<b>Interior</b>	<b>Asintomáticos</b>
55,13% (43/78)	32,05% (25/78)	67,95% (53/78)	7,69% (6/78)	26,92% (21/78)
		<b>Mayor a 7 años</b>	<b>Ambas</b>	
		19,23% (15/78)	17,95% (14/78)	

Tabla 2 Tabla de variables en estudio en la subpoblación positiva a LVC.

## 10.2 Descripción de las manifestaciones clínicas en los perros seropositivos

Del 40,41% (78/193) de la población positiva, el 73,08% (57/78) eran sintomáticos y el 26,92% (21/78) asintomáticos. Los perros se clasificaron como asintomáticos o sintomáticos en función de la ausencia o presencia de signos clínicos compatibles con LVC, siendo estos últimos divididos en subgrupos **oligosintomáticos** (hasta 3 signos clínicos) y **polisintomáticos** (más de 3 signos clínicos) (*Ministério da Saúde, 2014*) como muestra el gráfico 1.

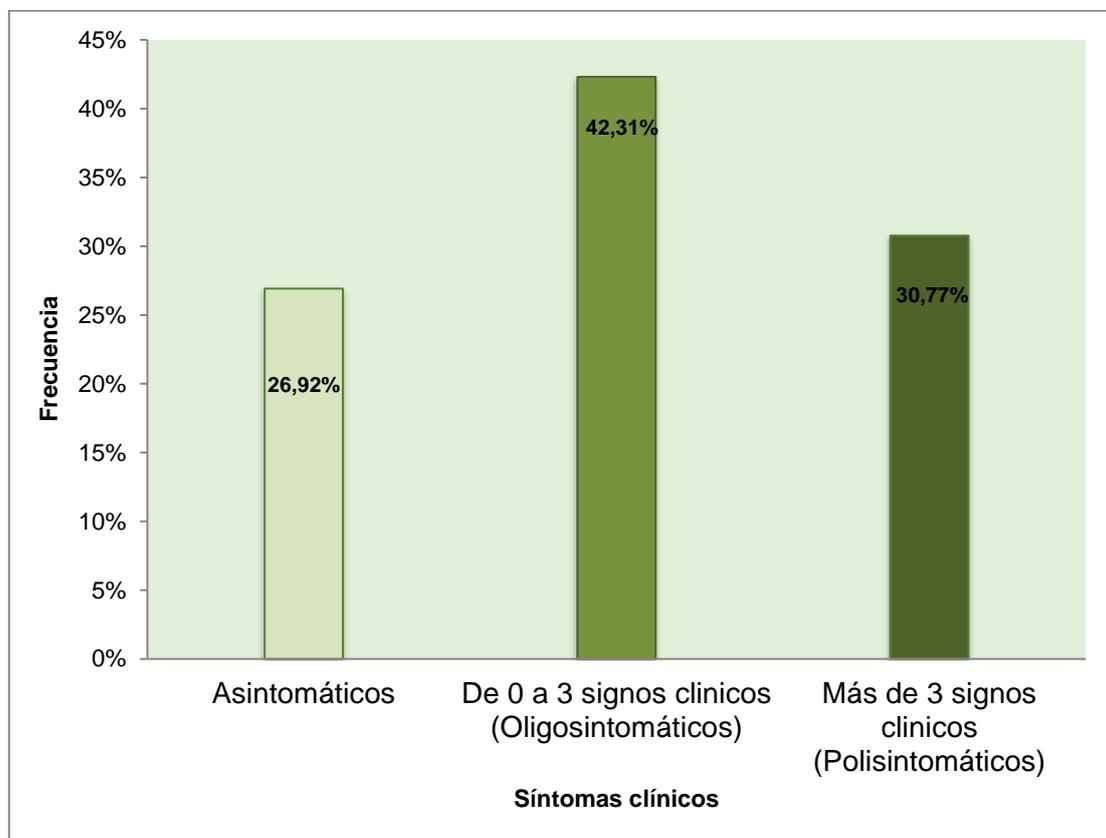


Gráfico 1 Positividad a LVC dividida en subgrupos de acuerdo a la sintomatología clínica.

Entre las manifestaciones clínicas observadas con mayor frecuencia durante el examen físico, como se muestran en el gráfico 2, se documentaron una variedad de lesiones cutáneas, entre ellas, dermatitis descamativa, alopecia focal y generalizada, lesiones ulcerativas (en prominencias óseas), vasculitis auricular, hiperqueratosis nasal y onicogriphosis caracterizada por una hipertrofia y curvatura anormal de las uñas. En la mayoría de los casos con lesiones cutáneas el pelo estaba seco y quebradizo. Los hallazgos sistémicos incluyeron pérdida de peso, palidez de las mucosas, anorexia, agrandamiento de los nódulos linfáticos palpables (como los submandibulares, preescapulares, axilares o poplíteos) y aumento de la temperatura. El único signo clínico encontrado exclusivamente en perros positivos a *Leishmania* fue la Hepato/Esplenomegalia. En la categoría "otras" se incluyen otros hallazgos clínicos encontrados durante la exploración física, como la presencia de ectoparásitos y lesiones de origen traumático.

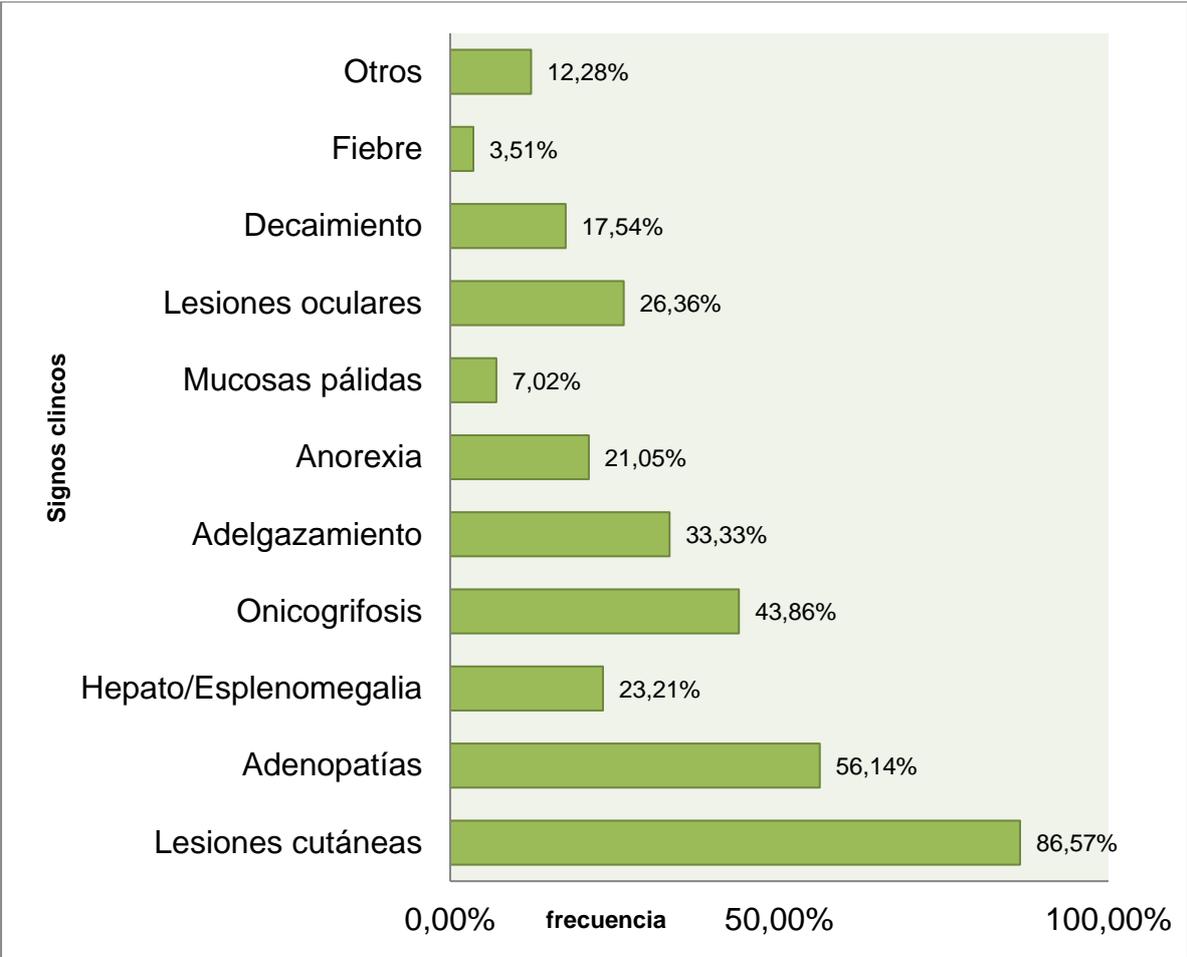


Gráfico 2 Frecuencia de los principales signos clínicos relacionados a la LVC en perros positivos sintomáticos.

### **10.3 Presencia de coinfección entre *Leishmania infantum*, *Toxoplasma gondii* y/o *Neospora caninum***

Los resultados obtenidos de los animales evaluados mediante las técnicas serológicas de Inmunofluorescencia indirecta (IFI) para la detección de anticuerpos anti-*Neospora caninum*, Hemoaglutinación indirecta (HAI) para detectar anticuerpos anti-*Toxoplasma gondii* e inmunocromatografía rK39 para el diagnóstico de *Leishmania infantum* se muestran en el gráfico 3.

Se observó que el 40,41% (78/193) fueron positivos para *Leishmania infantum*, el 58,03% (112/193) para *Toxoplasma gondii* y el 49,22% (95/193) positivos para *Neospora caninum*, siendo el resultado de estas proporciones estadísticamente significativo ( $p < 0,05$ ).

El gráfico 4 muestra las diferentes coinfecciones, donde puede observarse que, el índice de coinfección entre los tres agentes mencionados fue del 14,51% (28/78) y los animales que tenían coinfección tienen un mayor riesgo a ser positivos al rK39 que aquellos que no presentaron coinfecciones (OR=2,41) (1,57-5,0). La coinfección de *Leishmania* y *Toxoplasma* fue del 62,82% (49/78), mientras que la coinfección de *Leishmania* y *Neospora* fue del 57,69% (45/78). La población negativa a LVC fue del 59,59% (115/193), de los cuales el 56,52% (65/193) fueron positivos para *Toxoplasma* y el 43,48% (50/193) para *Neospora*. La coinfección entre ambos agentes fue del 28,69% (33/193). De esta población negativa a LVC, el 45,22% (52/115) presentaba signos clínicos compatibles con la enfermedad.

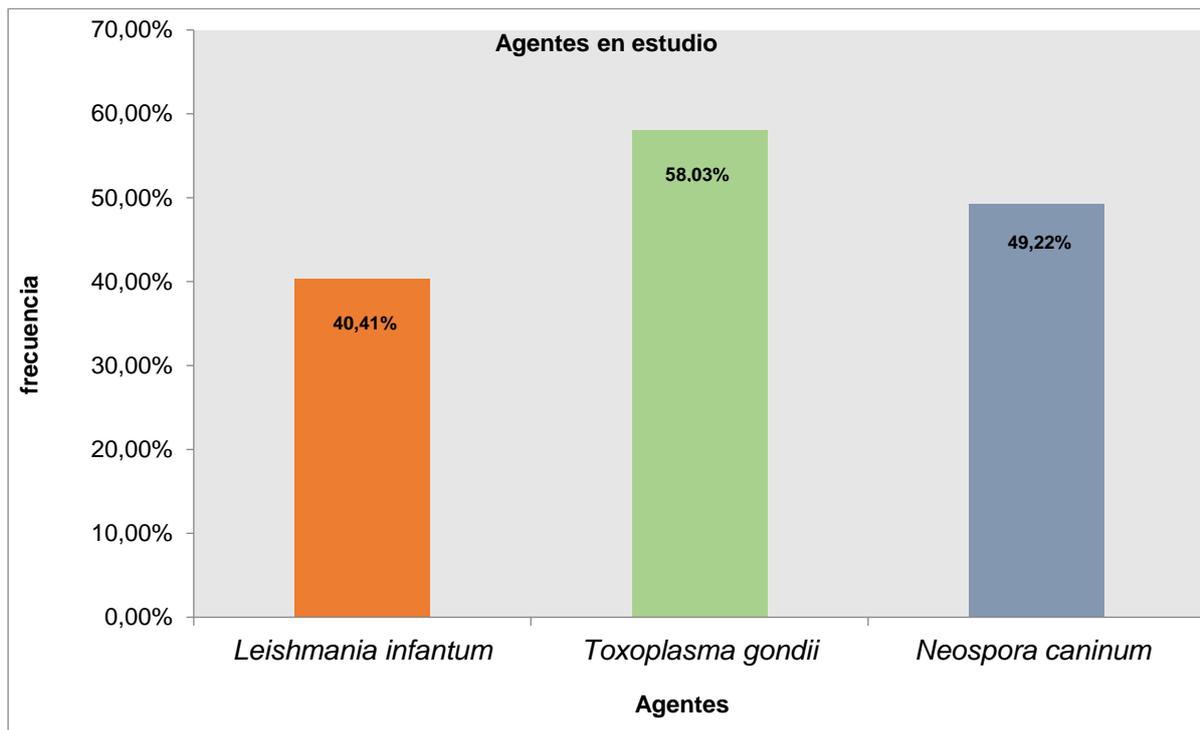


Gráfico 3 Frecuencia de animales positivos para cada agente patógeno involucrado en el proyecto.

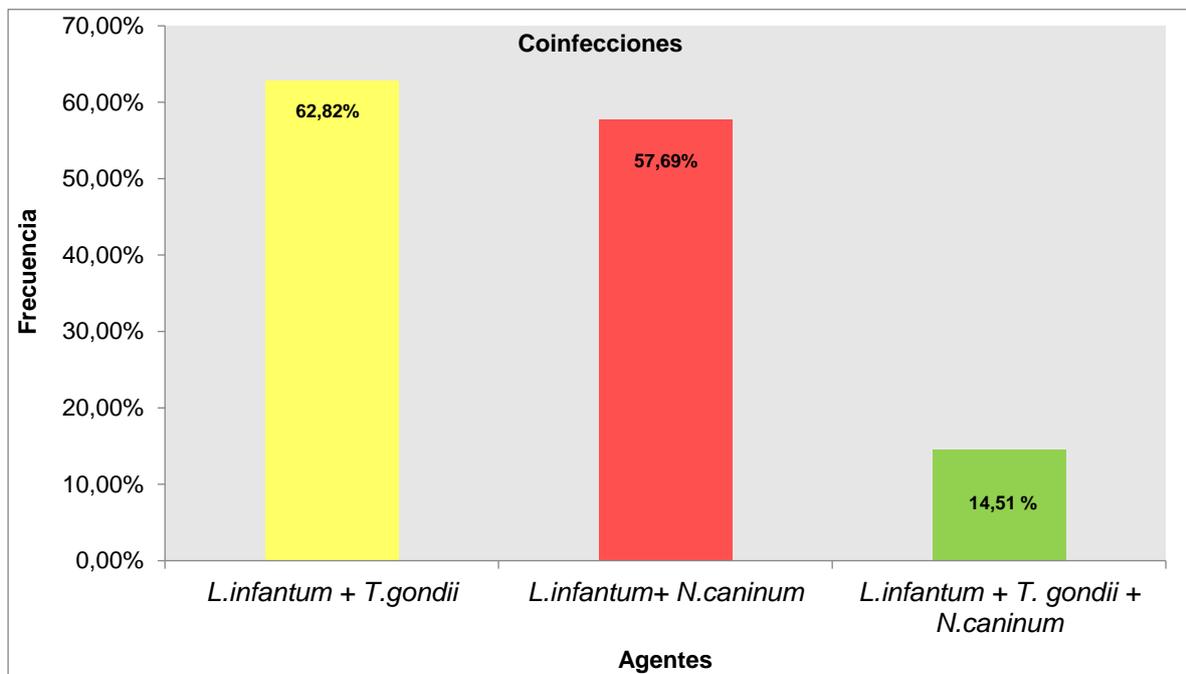


Gráfico 4 Presencia de coinfección entre *Leishmania infantum*, *Toxoplasma gondii* y *Neospora caninum*.

## 11. DISCUSIÓN

### Caracterización de la subpoblación positiva estudiada

Dentro de los principales hallazgos del presente trabajo de relevamiento de la situación clínica de la población canina de la ciudad de Bella Unión, encontramos que el 40,41% (78/193) de la población de estudio fue positiva para *L.infantum* mediante la técnica inmunocromatográfica rK39.

Las variables sexo, raza, categoría etaria, lugar donde pernoctaban los animales y presencia o ausencia de signos clínicos compatibles con LVC se estudiaron para evaluar si se asociaban significativamente con la susceptibilidad a la infección en una población de perros con diagnóstico inmunológico de infección por *L.infantum*.

En nuestro trabajo, no observamos influencia del sexo sobre la positividad a rK39. Estos hallazgos son consistentes con lo reportado por otros estudios epidemiológicos que no hallaron una asociación entre el género y la seropositividad (Rondón et al., 2008). En la ciudad de Barcelona, a partir de sueros de perros provenientes de diferentes localidades de Uganda (Kisoro, Kasese, Capchorwa, Buliisa, Masindi, Kibingo y Hoima), no encontraron una correlación estadísticamente significativa entre la seropositividad y el sexo de los perros muestreados, partiendo de un mayor número de machos (175/271) que de hembras (96/271) (Solano Gallego y Alcover Amengual, 2018). Sin embargo, otros investigadores han encontrado una mayor prevalencia de anticuerpos frente a *Leishmania* en los machos que en las hembras (Dantas-Torres et al., 2006). La hipótesis de que los machos sean más susceptibles a la infección no apunta a una posible razón biológica que explique este comportamiento (Fisa et al., 1999, Dantas-Torres, 2006; Quiroz et al., 2009), pudiendo estar relacionado con el papel de vigilancia domiciliar que tienen los machos y la permanencia en el peri domicilio cercano a áreas con abundante vegetación y por tanto, con mayor exposición durante las horas de mayor actividad del vector (Miranda, Roura, Picado, Ferrer y Ramis, 2008). Esto último concuerda con los hallazgos encontrados a través de un relevamiento clínico en el Norte de nuestro país, quienes obtuvieron una diferencia estadísticamente significativa entre machos y hembras positivas a LVC, observando una mayor proporción de positivos en los machos para la variable sexo (Satragno et al., 2021) y (Scayola, 2018).

Por su parte, otros autores en Grecia apoyan la hipótesis de que la LVC se distribuye por igual en ambos sexos, a pesar de obtener una positividad del 56,3% en machos frente al 43,7% de hembras (*Koutinas et al., 1999*). Las discrepancias encontradas entre los diferentes autores en distintas regiones nos hacen replantearnos que quizás la variable sexo no sea realmente un factor de riesgo, pudiendo infectarse tanto hembras como machos, estando estos últimos más expuestos si se le suma el rol de vigilancia en el hogar.

En relación a la raza y la positividad a *Leishmania*, en nuestra población total de estudio, 133/193 animales eran de raza pura y 60/193 animales eran cruza, si bien encontramos una mayor tasa de infección en perros cruza con un 67,95% (53/78) frente al 32,05% (25/78) en perros de raza pura, estas diferencias no fueron estadísticamente significativas. Si comparamos nuestros resultados con otro estudio también realizado en la zona norte del país (Salto), tampoco hallaron una asociación estadísticamente significativa entre el estatus racial o la presencia de determinada raza con mayor predisposición a desarrollar la enfermedad, aunque esto pudo deberse a un número reducido de ejemplares de raza analizado (*Scayola, 2018*). En un estudio realizado en Grecia e Italia, obtuvieron un mayor porcentaje de perros de raza pura infectados en comparación a cruza (*Koutinas et al., 1999; Perego et al., 2014*). En este último estudio, las tasas de infección más altas en animales puros pueden estar relacionadas con que más de un tercio de los animales analizados provenían de criaderos de razas y tiendas de mascotas. Otros autores han señalado que todas las razas son susceptibles a la infección por *Leishmania*, aunque algunas razas, como el Podenco Ibicenco y mestizos de zonas endémicas han desarrollado algún grado de resistencia (*Solano Gallego et al., 2000*).

En cuanto a la categoría etaria, la diferencia de prevalencia no fue estadísticamente significativa. En la literatura se ha descrito una distribución bimodal en la edad de inicio de la enfermedad en perros, refiriéndose a una mayor frecuencia de aparición antes de los tres años y después de los ocho años de edad (*Gambín, 2012*) y (*Paltrinieri et al., 2010*). Sin embargo, no encontramos esta distribución en nuestros resultados, donde se obtuvo un único pico de incremento en la detección de la infección por *Leishmania* en los perros de 1 a 7 años y esto coincide con otros autores que también han reportado un único pico con mayor incidencia, pero en perros de 3 a 7 años de edad (*Ciaramella et al., 1997*).

Por otro lado, otros autores argumentan que todas las edades están sujetas al mismo riesgo de infección (*Franca-Silva, 2003*) y (*Andreotti, 2006*).

La mayoría de los perros analizados (74,36%) (58/78) permanecían en el exterior del domicilio en las horas de mayor actividad del vector, lo que concuerda con la situación en Uruguay, donde el 96% de los perros viven el mayor tiempo al aire libre (*Comisión de Tenencia Responsable y Bienestar Animal y Equipos consultores, 2017*). Los pacientes que duermen en el exterior presentan una mayor positividad a rk39 en comparación con los pacientes que duermen dentro del domicilio y esta variable presentó una diferencia estadísticamente significativa en comparación con aquellos que dormían en el interior del domicilio y resultó un factor de riesgo de infección. Nuestros resultados mostraron concordancia con otros autores que sugieren que los perros que habitan el interior de los domicilios están menos expuestos a la infección (*Abranches et al., 1991; Ciaramella et al., 1997*).

Numerosos estudios han demostrado la importancia de identificar portadores asintomáticos en zonas endémicas, ya que contribuyen con su carga parasitaria a la permanencia y dispersión de esta zoonosis (*Cabral et al., 1998; Sideris et al., 1999; Fisa et al., 1999; Franca-Silva et al., 2003; Alvar et al., 2004; Dantas-Torres et al., 2006; Rondón, 2008; Chargui 2009; Solano-Gallego, 2009*). Nuestros resultados mostraron que los perros seropositivos para *L.infantum* tuvieron un menor número de casos asintomáticos, representado por el 26,92% (21/78), mientras que el grupo sintomático fue significativamente mayor con 73,08% (57/78). Esta diferencia puede deberse a la falta de desarrollo de una memoria inmunológica debido a la reciente introducción de la enfermedad en la región. Si comparamos nuestros resultados con lo que sucede en otras partes del Cono Sur de América, vemos un 51,3% de positivos sintomáticos en Posadas, Argentina (*Cruz et al., 2013*) y un 70,6% en Niteroi, Río de Janeiro (*Oliveira et al., 2015*). En el estado de Rio Grande do Sul, han registrado un porcentaje mayor de asintomáticos en comparación a los sintomáticos en zonas de reciente introducción al igual que la nuestra (*de Carvalho et al., 2018*). En Europa, si bien la enfermedad está establecida desde hace mucho tiempo y presenta una alta prevalencia de perros infectados, tienen una mayor proporción de asintomáticos (*Solano Gallego et al., 2013*). Es posible que tanto Rio Grande do Sul como en algunas ciudades de Europa, la condición del estado de salud general de la población canina sea mejor que la del área de muestreo de nuestro país. Podríamos entonces suponer que en un futuro, donde la población esté más expuesta a la

enfermedad, la región norte de Uruguay reducirá el número de casos positivos sintomáticos a medida que la enfermedad se establezca. Aunque esto siempre dependerá de otros factores como las condiciones generales de la población y la tasa de recambio canino.

### **Descripción de las manifestaciones clínicas en los perros seropositivos**

Para caracterizar clínicamente a la población general y subpoblaciones positivas a LVC, se evaluó en todos los individuos la presencia de 15 signos clínicos diferentes, así como la inclusión de otra categoría denominada “otros” con sintomatología no relacionada directamente con *Leishmania* y de causa conocida, por ejemplo, cicatrices, ectoparásitos y otras lesiones de origen traumático. El 73,08% (57/78) de la población positiva presentaba sintomatología compatible con LVC y de esta población positiva, el 86,57% (48/57) registró lesiones de origen cutáneo, incluidas la alopecia, lesiones ulcerativas, descamativa, vasculitis auricular e hiperqueratosis nasal, seguidas del 56,14% (32/57) de linfadenopatía. Con menor impacto en el perfil clínico se encontró onicogriposis, adelgazamiento, anorexia con atrofia muscular, mucosas oculares pálidas, lesiones oculares, decaimiento y fiebre. Las lesiones cutáneas fueron el signo clínico más prevalente en la población positiva sintomática. Estos resultados se asemejan a los hallazgos en la literatura respecto a poblaciones caninas de Latinoamérica. Por ejemplo, las lesiones cutáneas se encontraron con una frecuencia del 96% en la provincia de Misiones (*Cruz et al., 2013*), mientras que en la provincia de San Pablo el adelgazamiento en un 78,2% (*Camplesi, 2018*). En otros relevamientos realizados en Río de Janeiro y Huilla las linfadenopatía apenas alcanzaron el 25% y el 12% respectivamente (*Fernandez et al., 2006*) y (*Oliveira et al., 2015*). La severidad de la enfermedad depende de varios factores, por un lado el tiempo de instalación de la enfermedad, que parece impactar en el perfil clínico poblacional. Por otro lado, más relevante para nosotros, los factores socioeconómicos en el área de estudio tienen un impacto negativo en el estado de salud de las poblaciones caninas, con un efecto acumulativo en la severidad de la enfermedad. No debemos olvidar que Artigas tiene de los ingresos medio mensuales per cápita más bajos del país (*Oficina de Planeamiento y Presupuesto, OPP, 2019*).

En suma, es importante destacar el impacto que tiene esta enfermedad cuando la población canina se ve afectada por otros factores como nutricionales, sanitarios, etc.

Cada ciudad tiene su propio perfil de síntomas, lo que complica aún más la situación, resaltando la importancia de una investigación clínica regular y profunda en nuestro país.

### **Presencia de coinfección entre *Leishmania infantum*, *Toxoplasma gondii* y/o *Neospora caninum***

Otro objetivo propuesto en nuestro trabajo consistió en determinar si existe coinfección en la subpoblación positiva a LVC. Nuestro estudio mostró que el 14,51% (28/78) de la población estaba coinfectada por *L.infantum*, *T.gondii* y *N.caninum*, resultado estadísticamente significativo y asociado a un factor de riesgo. Son pocos los trabajos que han investigado la existencia de estas coinfecciones, ninguno en nuestro país, posiblemente debido a la reciente introducción del agente *L. infantum* a nuestra región. En Rio Grande do Sul, Brasil, considerado libre de la enfermedad hasta el año 2008, se encontró que el 50,9% (27/53) de los animales estaban coinfectados y a pesar de que representó una alta proporción, la presencia de un agente no favoreció la infección por otro (Ratzlaff, 2016). Lo mismo se encontró en Bauru/Sao Pablo, donde los investigadores no encontraron asociación entre *L. infantum* y *N.caninum* y los perros tenían las mismas probabilidades de infectarse a uno o más agentes (Greca et al., 2010). Por el contrario, en el sur de Italia, en un área endémica para LVC, la seropositividad para *N.caninum* fue el principal factor de riesgo de seropositividad para *L.infantum* y viceversa. Según estos autores, la coinfección es muy común en perros y la infección con un protozoo aumenta la susceptibilidad a otro, posiblemente debido al estado inmunológico de los perros evaluados. Además, agregan, aquellos perros coinfectados mostraron títulos significativamente más altos a *L.infantum* (Cringoli et al., 2002). Entonces se puede concluir que, dada la naturaleza oportunista de los patógenos parasitarios asociados con la aparición de enfermedades y los efectos inmunosupresores, la aparición de coinfecciones puede contribuir a la presentación clínica de algunos protozoos (Girardi et al., 2014). A diferencia de nuestros resultados, en perros de Curitiba-Paraná, sur de Brasil, se realizó un estudio para evaluar la exposición de perros comunitarios a estos protozoos.

Aunque encontraron una coinfección entre *T.gondii* y *N. caninum*, los perros analizados resultaron seronegativos para *L. infantum*, lo que refleja la ausencia del patógeno en las zonas urbanas de Curitiba y por lo tanto, la falta de coinfección de los tres agentes (*Constantino et al., 2016*).

## 12. CONCLUSIONES

1. La variabilidad de la sintomatología clínica observada tanto en la población positiva como negativa, refleja la dificultad de diagnóstico de esta enfermedad.
2. En la población de estudio en la ciudad de Bella unión, ser sintomático y dormir en el exterior de la vivienda son factores de riesgo para ser positivo a rK39.
3. La población de estudio que presentó coinfecciones con *Toxoplasma gondii* y/o *Neospora caninum*, tiene mayor frecuencia de seropositividad al rk39 que aquellos que no presentaron coinfecciones.
4. La hepatomegalia y la esplenomegalia fueron los únicos signos clínicos encontrados **exclusivamente en perros positivos para LVC** y las lesiones cutáneas el signo más frecuentemente documentado.
5. Considerando los resultados, se puede concluir que estos parásitos están presentes en la ciudad de Bella Unión y que los perros han tenido contacto con los protozoos. Por lo tanto, es necesario difundir medidas de prevención de enfermedades para mantener el control de las mismas, tanto en términos de salud animal como humana.

### 13. BIBLIOGRAFIA

- Abranches, P., Silva-Pereira, M.C.D., Conceição-Silva, F.M., Santos-Gomes, G.M., y Janz, J.G. (1991). Canine leishmaniasis: pathological and ecological factors influencing transmission of infection. *The journal of Parasitology*, 77(4), 557-561. Recuperado de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1865262>
- Alfonso, A., Basmadján, Y., Burgueño, A., Calegari, L., Canneva, B., Castro, M.,... Willat, G., (2019). *Guía de diagnóstico, tratamiento y control de las Leishmaniasis visceral en Uruguay. Un enfoque desde "Una Salud "*. Montevideo: Ministerio de Salud Universidad de la República
- Alvar, J. (2001). *Las leishmaniasis: de la biología al control*. Madrid: Instituto de Salud Carlos III.
- Alvar, J., Canavate, C., Molina, R., Moreno, J. y Nieto, J. (2004). *Canine leishmaniasis. Advances in Parasitology*, 57(3), 1-88.
- Alvar, J., Yactayo, S., y Bern, C. (2006). *Leishmaniasis and poverty. Trends in Parasitology*, 22(12), 552-557.
- Andrade, B.B., Teixeira, C.R., Barral, A., y Barral-Netto, M. (2005). *Haematophagous arthropod saliva and host defense system: a tale of tear and blood. Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 77(4), 665-693. Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Haematophagous%20arthropod%20saliva%20and%20host%20defense%20system%3A%20a%20tale%20of%20tear%20and%20blood>
- Baneth, G., Koutinas, A., Solano-Gallego, L., Bourdeau, P., y Ferrer, L. (2008). *Canine Leishmaniosis – new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. Trends in Parasitology*, 24(7), 324-330. Recuperado de [http://www.cell.com/trends/parasitology/pdf/S1471-4922\(08\)00132-3.pdf](http://www.cell.com/trends/parasitology/pdf/S1471-4922(08)00132-3.pdf)

- Baneth, G., y Solano-Gallego, L. (2011). Leishmaniasis. En C.E. Greene, *Infectious diseases of the dog and cat* (4ª ed., pp.734-749). Georgia: Elsevier.
- Barber, J.S., Gasser, R.B., Ellis, J., Reichel, M.P., y Trees, A.J. (1997). *Prevalence of Antibodies to Neospora caninum in different canid populations. Journal of Parasitology*, 83, 1056-1058.
- Barbieri, C.L. (2006). *Immunology of canine leishmaniasis. Parasite immunology*, 28(7), 329-337.
- Basmadján, Y., Canneva, B., Verger, L., Lozano, A., Satragno, D., Supparo, E., ...Vitale, E., (2014). Persistence of Lutzomyia longipalpis, vector of visceral leishmaniasis, in the city of Salto, Uruguay. En *VIII International Symposium on Phlebotomine sandflies*. Puerto Iguazú, Argentina.
- Basmadján, Y., Lozano, A., Verger, L., Canneva, B., Satragno, D., Sequeira, C.,... Vitale, E. (2014, junio). Persistencia de la infestación de Lutzomyia longipalpis, vector de Leishmaniasis Visceral, en la ciudad de Bella Unión, Uruguay. En *III Congreso Panamericano, VIII Congreso Argentino de Zoonosis*. Universidad Nacional de La Plata.
- Bern, C., Maguire, J.H., y Alvar, J. (2008). *Complexities of assessing the disease burden attributable to leishmaniasis. PLoS Neglected Tropical Diseases*, 2(10), e313.
- Boggiatto, P.M., Gibson-Corley, K.N., Metz, K., Gallup, J.M., Hostetter, J.M., Mullin, K., y Petersen, C. (2011). Transplacental transmission of Leishmania infantum as a means for continued disease incidence in North America. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 5(4), e1019. Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3075227/>
- Bottero, E., Poggi, M., y Viglione, M. (2006). *Lesioni papulari indotte da Leishmania spp. in 8 cani giovani. Veterinaria*, (1), 33-36. Recuperado de [https://www.vetjournal.it/images/archive/pdf\\_riviste/3860.pdf](https://www.vetjournal.it/images/archive/pdf_riviste/3860.pdf)

- Bowman, D.D., Lynn, R.C., y Eberhard, M.L. (2004). Artrópodos. En *Parasitología para veterinarios* (8ª. ed., pp.1-85) Madrid: Elsevier.
- Brooker, S., y Utzinger, J. (2007). *Integrated disease mapping in a polyparasitic world. Geospat Health*, 1(2), 141-146.
- Camargo-Neves, V.L.F., Gomes, A de C., y Ferreira Antunes, J.L. (2001). Correlação da presença de espécies de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) com registros de casos da leishmaniose tegumentar americana no Estado de São Paulo, Brasil. *Cadernos de Saúde Pública*, 17(5) ,1263-1267.
- Camplesi. (2018). Vigilância em saúde. O papel do médico veterinário diante da leishmaniose visceral. *Ars veterinaria*, 34(1), 014-019.
- Cañón-Franco, W. A., Bergamaschi, D. P., Labruna, M. B., Camargo, L. M. A., Silva, J. C. R., Pinter, A., y Gennari, S. M. (2004). Occurrence of anti-Toxoplasma gondii antibodies in dogs in the urban area of Monte Negro, Rondônia, Brazil. *Veterinary Research Communications*, 28(2), 113-118.
- Chang, P.C. (1956). The ultrastructure of Leishmania donovani. *Journal of Parasitology*, 42(2), 126-36.
- Chappuis, F., Sundar, S., Hailu, A., Ghalib, H., Rijal, S., Peeling, RW., ... y Boelaert, M. (2007). Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? *Nature Reviews Microbiology*, 5, 873-882.
- Ciaramella, P., Oliva, G., De Luna, R., Gradoni, L., Ambrosio, R., Cortese, L., ... Persechino, A. (1997). A retrospective clinical study of canine leishmaniasis in 150 dogs naturally infected with L. infantum. *Veterinary Record*, 141,539-543. Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9413121>
- Comisión de Tenencia Responsable y Bienestar Animal, Equipos consultores. (2017). *Estudio cuantificación y caracterización de la población canina en*

Uruguay.

Recuperado

de

[http://www.mgap.gub.uy/sites/default/files/informe\\_cotryba\\_0.pdf](http://www.mgap.gub.uy/sites/default/files/informe_cotryba_0.pdf)

Constantino, C., Pellizzaro, M., Ferraz Evaristo de Paula, E., Samih Wischral Jayme Vieira, T., Pérola Drulla Brandão, A., Ferreira, F.,... Welker Biondo, A. (2016). Inquérito sorológico para *Leishmania* spp., *Toxoplasma gondii*, *Trypanosoma cruzi* e *Neospora caninum* em cães comunitários em Curitiba-Paraná, Brasil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 25(4), 504-510.

Cruz, I., Acosta, M.N., Gutierrez, J., Nieto, C., Canavate, J., Deschutter, y Bornay-Llinares, F.J. (2013). A canine leishmaniasis pilot survey in an emerging focus of visceral leishmaniasis: Posadas (Misiones, Argentina). *BMC Infectious Diseases*, 10(4), 342-385.

COTRYBA. (2017). *Estudio cuantificación y caracterización de la población canina de Uruguay*. Recuperado de <https://www.gub.uy/ministerio-ganaderia-agricultura-pesca/datos-y-estadisticas/estadisticas/estudio-sobre-poblacion-canina-uruguay>

da Silva, S.M., Ribeiro, V.M., Ribeiro, R.R., Tafurl, W.L., Melo, M.N., y Michalick, MS. (2009). First report of vertical transmission of *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum* in a naturally infected bitch from Brazil. *Veterinary Parasitology*, 166, 159-162. Recuperado de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19733439>

Dantas-Torres, F. (2009). Canine leishmaniosis in South America. *Parasites & Vectors*, 2(1), 1-8. Recuperado de <https://parasitesandvectors.biomedcentral.com/track/pdf/10.1186/1756-3305-2-S1-S1?site=parasitesandvectors.biomedcentral.com>

David, J.R., Stamm, L.M., Bezerra, H.S., Souza, R.N., Killick-Kendrick, R., y Lima, JW. (2001). Deltamethrin-impregnated dog collars have a potent anti-feeding and insecticidal effect on *Lutzomyia longipalpis* and *Lutzomtia migonei*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 91 (2), 839-847. Recuperado de: <http://www.scielo.br/pdf/mioc/v96n6/4164.pdf>

- de Freitas, E., Melo, M. N., da Costa-Val, A. P., y Michalick, M. S. M. (2006). Transmission of *Leishmania infantum* via blood transfusion in dogs: potential for infection and importance of clinical factors. *Veterinary Parasitology*, 137(1-2), 159-167. Recuperado de <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304401705006035>
- Desjeux, P. (2004). Leishmaniasis. Current Situation and New Perspectives. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 27(5), 305-318. Recuperado de [https://www.scirp.org/\(S\(351jmbntvnsjt1aadkposzje\)\)/reference/ReferencesPapers.aspx?ReferenceID=1861956](https://www.scirp.org/(S(351jmbntvnsjt1aadkposzje))/reference/ReferencesPapers.aspx?ReferenceID=1861956)
- Desmonts, G., y Remington, J.S. (1980). Direct agglutination test for diagnosis of *Toxoplasma* infection: method for increasing sensitivity and specificity. *Journal of Clinical Microbiology*, 11(6), 562-568. Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC273461/>
- Dubey, J.P., Schares, G., y Ortega-Mora, L.M. (2007). Epidemiology and control of neosporosis and *Neospora caninum*. *Clinical Microbiology Reviews*, 20(2), 323-367.
- Durlach, R. A., Kaufer, F., Carral, L., y Hirt, J. (2003). Toxoplasmic lymphadenitis, clinical and serologic profile. *Clinical Microbiology and Infection*, 9(7), 625-631.
- Fernandez, J., Bello, F., Lopez, M.C., Moncada, L.I., Vargas, J.J., Ayala, M.S., ... Lozano, C.A. (2006). Seroprevalence of canine visceral leishmaniasis in sector 8 of Neiva and in four municipalities of Huila, Colombia. *Biomedica*, 26, 121-30.
- Ferrer, L., Juanola, B., Ramos, J.A., y Ramis, A. (1991). Chronic colitis due to *Leishmania* infection in two dogs. *Veterinary Pathology*, 28, 342-343. Recuperado de <http://journals.sagepub.com/doi/pdf/10.1177/030098589102800414>

- Ferrer, L., Rabanal, R., Fondevila, D., Ramos, J.A., y Domingo, M. (1988). Skin lesions in canine leishmaniasis. *Journal of Small Animal Practice*, 29, 381-388. Recuperado de <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1748-5827.1988.tb02298.x>
- Ferrer, L., y Roura, X. (2010). Signos clínicos de la leishmaniasis canina. *Argos portal veterinaria*. Recuperado de [http://www.ruminal.com.ar/sites/default/files/leishmaniosis-hoy\\_Cap-3-4\\_0.pdf](http://www.ruminal.com.ar/sites/default/files/leishmaniosis-hoy_Cap-3-4_0.pdf) .
- Fisa, R., Riera, C., Gállego, M., Manubens, J., y Portús, M. (2001). Nested PCR for diagnosis of canine leishmaniosis in peripheral blood, lymph node and bone marrow aspirates. *Veterinary Parasitology*, 99, 105-111.
- França-Silva, J.C., da Costa, R.T., y Siqueira, A.M. (2003). Epidemiology of canine visceral leishmaniosis in the endemic area of Montes Claros Municipality, Minas Gerais State, Brazil. *Veterinary Pathology*, 111, 161-173. Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12531292>
- Gállego, M. (2004). *Zoonosis emergentes por patógenos parásitos: las leishmaniosis*. *Revue scientifique et technique*, 23(2) ,661-676. Recuperado de <https://www.oie.int/doc/ged/D1049.PDF>
- Gállego, M., y Riera, C. (2000). *Las leishmaniosis humanas: leishmaniosis autóctona por Leishmania infantum*. Recuperado de <https://www.seimc.org/contenidos/ccs/revisionestematicas/parasitologia/leishman.pdf>
- García Almagro, D. (2004). *Leishmaniasis cutánea: estudio en el área sanitaria de Toledo* (Tesis doctoral). Universidad complutense de Madrid. Recuperado de [www.ucm.es/BUCM/tesis/medlucm](http://www.ucm.es/BUCM/tesis/medlucm)

- González González, G., Rodríguez González, E., y Simón Merchán, A. (1976). Moñología de la leishmania trópica en su estado intracelular en la dermis humana. *Actas Dermo-Sifiliográficas*, 67, 527-34.
- Grill, F., y Zurmendi, M (2017). Leishmaniasis visceral en Uruguay. *Archivos de Pediatría del Uruguay*, 88(1), 32-38. Recuperado de <http://www.scielo.edu.uy/pdf/adp/v88n1/v88n1a07.pdf>
- Gury Dohmen, F.E. (1995). Toxoplasmosis en perros y gatos de Buenos Aires. *Revista de Medicina Veterinaria*, 76, 65-68.
- Herwaldt, B.L. (1999) Leishmaniasis. *Lancet*, 354(9185), 1191-9. doi: 10.1016/S0140-6736(98)10178-2
- Ikeda-Garcia, F. A., Lopes, R. S., Marques, F. J., de Lima, V. M. F., Morinishi, C. K., Bonello, F. L., ... Feitosa, M. M. (2007). Clinical and parasitological evaluation of dogs naturally infected by Leishmania (Leishmania) chagasi submitted to treatment with meglumine antimoniate. *Veterinary Parasitology*, 143(3-4), 254-259.
- Killick-Kendrick, R. (1999). The biology and control of phlebotomine sand flies. *Clinics in Dermatology*, 17, 279-289. Recuperado de <http://www.sciencedirect.com/sdfe/pdf/download/eid/1-s2.0S0738081X99000462/first-page-pdf>
- Killick-Kendrick, R., Wilkes, T.J., y Bailly, M. (1986). Preliminary field observations on the flight speed of a phlebotomine sandfly. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 80, 138-42.
- Koutinas, A.F., Polizopoulou, Z.S., Saridomichelakis, M.N., Argyriadis, D., Fytianou, A., y Plevraki, K.G. (1999). Clinical consideration on canine leishmaniasis in Greece: a retrospective study of 158 cases (1989–1996). *Journal of the American*

*Animal Hospital Association*, 35, 376-383. Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10493412>

Koutinas, A.F., Scott, D.W., Kantos, V., y Lekkas, S. (1992). Skin lesions in canine leishmaniasis (Kala-Azar): A clinical and histopathological study on 22 spontaneous cases in Greece. *Veterinary Dermatology*, 3, 121-130. Recuperado de: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.13653164.1992.tb00158.x/abstract>

Lainson, R., Ryan, L., y Shaw, J.J. (1987). Infective stages of *Leishmania* in the sandfly vector and some observations on the mechanism of transmission. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 82, 421-424.

Lainson, R., y Rangel, E.F. (2003). *Lutzomyia longipalpis e a ecoepidemiologia da leishmaniose visceral americana (LVA) no Brasil*. Rio de Janeiro: Fiocruz.

Lainson, R., y Rangel, E.F. (2005). *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil: a review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 100(8), 811-27.

Lucientes, J., Castillo, J.A., Gracia, J., y Peribáñez, M.A. (2005). *Flebotomíneos, de la biología al control*. Recuperado de <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n080805.html>

McAllister, M.M., Dubey, J.P., Lindsay, D.S., Jolley, W.R., Wills, R.A. y McGuire, AM. (1998). Rapid communication: Dogs are definitive hosts of *Neospora caninum*. *International Journal for Parasitology*, 28(9), 1473-1479.

Mancianti, F., Falcone, M. L., Giannelli, C., y Poli, A. (1995). Comparison between an enzyme-linked immunosorbent assay using a detergent-soluble *Leishmania infantum* antigen and indirect immunofluorescence for the diagnosis of canine leishmaniosis. *Veterinary Parasitology*, 59(1), 13-21.

- Mancianti, F., y Sozzi, S. (1995). Isolation of Leishmania from a newborn puppy. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 89(4), 402.
- Maroli, M., Feliciangeli, M.D., Bichaud, L., Charrel, R.N., y Gradoni, L. (2012). Phlebotomine sandflies and the spreading of leishmaniasis and other diseases of public health concern. *Medical and Veterinary Entomology*, 27(2), 123-47.
- Mendonça, C.C., Costa, B.M., Brandão, K.M., Maruo, V.M., Maiorka, P.C., Machado, G.F., ...Ramos, A.T. (2013). Description of visceral, lymphatic and central nervous system lesions in dogs infected with Leishmania spp. *Brazilian Journal of Veterinary Pathology*, 6(1), 89-94. Recuperado de [https://www.researchgate.net/publication/287292740\\_Description\\_of\\_visceral\\_lymphatic\\_and\\_central\\_nervous\\_system\\_lesions\\_in\\_dogs\\_infected\\_with\\_Leishmania\\_spp](https://www.researchgate.net/publication/287292740_Description_of_visceral_lymphatic_and_central_nervous_system_lesions_in_dogs_infected_with_Leishmania_spp)
- Mettler, M., Grimm, F., Capelli, G., Camp, H., y Deplazes, P. (2005). Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assays, an immunofluorescent-antibody test, and two rapid tests (immunochromatographic-dipstick and gel tests) for serological diagnosis of symptomatic and asymptomatic Leishmania infections in dogs. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(11), 5515-551.
- Ministerio da Saúde. (2003). *Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose visceral*. Brasília: MS.
- Ministério da Saúde. (2014). *Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral*. Recuperado de [http://bvsm.sau.gov.br/bvs/publicacoes/manual\\_vigilancia\\_controle\\_leishmaniose\\_visceral\\_1edicao.pdf](http://bvsm.sau.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_controle_leishmaniose_visceral_1edicao.pdf)
- Ministerio de Salud. (2010). *Enfermedades infecciosas: leishmaniasis visceral. Guía para el equipo de salud*. Recuperado de

[http://www.msal.gob.ar/images/stories/bes/graficos/0000000798cnt-2012-03-15\\_leishmaniasis-visceral-guia.pdf](http://www.msal.gob.ar/images/stories/bes/graficos/0000000798cnt-2012-03-15_leishmaniasis-visceral-guia.pdf)

Ministerio de Salud Pública. (2016). *Guía de diagnóstico, tratamiento y control de la leishmaniasis visceral en Uruguay*. Recuperado de [http://www.msp.gub.uy/sites/default/files/archivos\\_adjuntos/Guia%20Leishm%20Visceral%20MSP%20-%20ULTIMA%20-%20abril2016%20.pdf](http://www.msp.gub.uy/sites/default/files/archivos_adjuntos/Guia%20Leishm%20Visceral%20MSP%20-%20ULTIMA%20-%20abril2016%20.pdf)

Ministerio de Salud Pública. (2019). *Informe de las actividades realizadas durante el primer semestre de 2019 para la vigilancia y el control de la leishmaniasis visceral*. Montevideo: MSP.

Ministerio de Salud Pública. (2019 a). *Seroprevalencia de leishmaniasis canina en Bella Unión. Setiembre-octubre*. Descargado de <https://www.gub.uy/ministerio-salud-publica/comunicacion/publicaciones/seroprevalencia-leishmaniasis-canina-bella-union-setiembre-octubre-2019>

Ministerio de Salud Pública. (2019 b). *Notificación primer muerte por Leishmania infantum*. Recuperado de <https://www.gub.uy/ministerio-salud-publica/comunicacion/comunicados/confirmacion-de-segundo-caso-de-leishmaniasis-visceral>

Miranda, S., Roura, X., Picado, A., Ferrer, L., y Ramis, A. (2008). Characterization of sex, age, and breed for a population of canine leishmaniosis diseased dogs. *Research in Veterinary Science*, 85, 35-38. Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17942128>

Miró, G., Fraile, C., y Frisuelos, C. (2001). Zoonosis en pequeños animales. *Canis et felis*, 50, 85-108. Recuperado de <https://es.scribd.com/document/360099088/Zoonosis-en-pequenos-animales-Pdf>.

- Muñoz, C., Berriatua, E., y Ortiz, J. (2016). Estudio preliminar de los factores medioambientales que influyen en la abundancia de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) en el sureste español. En *II Jornadas Doctorales de la Universidad de Murcia*. VE-CO-05, Murcia, España. Recuperado de <http://congresos.um.es/jdoctorado/jdoctorado2016/paper/viewFile/50811/23021>
- Nicolato, RD., Trópia de Abreu, R., Roatt, BM., Aguiar-Soarez, RD., Reis, LE., Carvalho, MD., Carneiro, CM.,... Reis, AB. (2013). Clinical forms of canine visceral leishmaniasis in naturally *Leishmania infantum*-infected dogs and related myelogram and hemogram changes. *PLoS One*, 8(12). Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3871677/>
- Núñez Ochoa, L. (2007). Casos clínicos. En L. Núñez Ochoa y J. Bouda, *Patología clínica veterinaria* (2ª. ed. pp.209-321). México: UNAM.
- Oficina de Planeamiento y Presupuesto. (2019). *Observatorio Territorio Uruguay, Dirección de descentralización Pública*. Recuperado de <https://otu.opp.gub.uy/>
- Oliveira, A.C., Figueiredo, F.B., Silva, V.L., Santos, F.N., Souza, MB., Madeira M de, F., ... Perisse, A.R. (2015). Canine Visceral Leishmaniasis Case Investigation in the Jacare Region of Niteroi, Rio De Janeiro, Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 57(4), 325-32.
- Ordeix, L., Solano-Gallego, L., Fondevila, D., Ferrer, L., y Fondati, A. (2005). Papular dermatitis due to *Leishmania* spp. infection in dogs with parasite-specific celular immune responses. *Veterinary Dermatology*, 16(3),187-191. Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15960633>
- Organización Mundial de la Salud. (2019 a). *Leishmaniasis Fact sheet*. Recuperado de <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>

Organización Mundial de la Salud. (2019 b). *Manual de Procedimiento para Vigilancia y Control de las Leishmaniasis en las Américas*. Recuperado de [https://iris.paho.org/bitstream/handle/10665.2/50524/9789275320631\\_spa.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://iris.paho.org/bitstream/handle/10665.2/50524/9789275320631_spa.pdf?sequence=1&isAllowed=y)

Organización Mundial de la Salud. (2010). *Control de las leishmaniasis*. Recuperado de [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/82766/1/WHO\\_TRS\\_949\\_spa.pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/82766/1/WHO_TRS_949_spa.pdf)

Organización Mundial de la Salud. (2019). *Control de las leishmaniasis*. Recuperado de [https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/82766/WHO\\_TRS\\_949\\_spa.pdf;jsessionid=30E7F5E681476BC50DB8BF9D148B68B9?sequence=1](https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/82766/WHO_TRS_949_spa.pdf;jsessionid=30E7F5E681476BC50DB8BF9D148B68B9?sequence=1)

Organización Mundial de Sanidad Animal. (2018). *Manual de las Pruebas de Diagnóstico y de las Vacunas para los Animales Terrestres*. Recuperado de [https://www.woah.org/fileadmin/Home/esp/Health\\_standards/tahm/E\\_summary.htm](https://www.woah.org/fileadmin/Home/esp/Health_standards/tahm/E_summary.htm)

Organización Panamericana de la Salud (2013). *Leishmaniasis en las Américas. Recomendaciones para el tratamiento*. Recuperado de [http://www.paho.org/hq/index.php?option=com\\_docman&task=doc\\_view&gid=22226&Itemid=270&lang=en](http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&task=doc_view&gid=22226&Itemid=270&lang=en)

Owens, S.O., Oakley, D.A., Marryot, K., Hatchett, W., Walton, R., Nolan, T.J., ... Giger, U. (2001). Transmission of visceral leishmaniasis through blood transfusions from infected English foxhounds to anemic dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 219, 1076-1083.

Palatnik-de-Sousa, C. B., Barbosa, A. D. F., Oliveira, S. M., Nico, D., Bernardo, R. R., Santos, W. R., ... Borja-Cabrera, G. P. (2008). FML vaccine against

- canine visceral leishmaniasis: from second-generation to synthetic vaccine. *Expert Review of Vaccines*, 7(6), 833-851.
- Paltrinieri, S., Solano-Gallego, L., Fondati, A., Lubas, G., Gradoni, L., Castagnaro, M.,...Zini, E. (2010). Guidelines for diagnosis and clinical classification of leishmaniasis in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 236(11),1184-91.
- Peña, M.T., Roura, X., y Davidson, M.G. (2000). Ocular and periocular manifestations of leishmaniasis in dogs: 105 cases (1993–1998). *Veterinary Ophthalmology*, 3, 35-41. Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11397281>
- Perego, R., Preverbio, D., Bagnagatti De Giorgi, G., y Spada, E. (2014). Prevalence of dermatological presentations of canine leishmaniasis in a nonendemic area: a retrospective study of 100 dogs. *Veterinary Medicine International*, 2014, 374613. Recuperado de <https://www.hindawi.com/journals/vmi/2014/374613/cta/>
- Petanides, T.A., Koutinas, A.F., Mylonakis, M.E., Day, M.J., Saridomichelakis, M.N., Leontides, L.S., ... Lekkas, S. (2008). Factors associated with the occurrence of epistaxis in natural canine leishmaniasis (*Leishmania infantum*). *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 22(4), 866-872. Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18564224>
- Piaggio, J., Delucchi, L., y Bañales, P. (2007). *Actualización en neosporosis. Universidad de la República Facultad de Veterinaria Programa de Educación Continua*. Recuperado de [https://www.colibri.udelar.edu.uy/jspui/bitstream/20.500.12008/20256/1/FV\\_ET\\_PiaggioJ\\_2007\\_Act.Neosporosis.PDF](https://www.colibri.udelar.edu.uy/jspui/bitstream/20.500.12008/20256/1/FV_ET_PiaggioJ_2007_Act.Neosporosis.PDF)
- Pinelli, E., Gonzalo, R.M., Boog, C.J., Rutten, V.P., Gebhard, D., Del Real, G., y Ruitenber, E.J. (1995). *Leishmania infantum*-specific T cell lines derived from asymptomatic dogs that lyse infected macrophages in a major

histocompatibility complex-restricted manner. *European Journal of Immunology*, 25(6), 1594-1600. Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7614987>

Pozio, E., Gradoni, L., Bettini, S., y Gramiccia, M. (1981). Leishmaniasis in Tuscany (Italy): VI. Canine leishmaniasis in the focus of Monte Argentario (Grosseto). *Acta Tropica*. 38, 383-393. Recuperado de <https://www.e-periodica.ch/cntmng?pid=act-001:1981:38::541>

Quián, J., y Toma, E. (2017). *Prevención de leishmaniasis en Artigas*. Recuperado de <https://www.gub.uy/ministerio-salud-publica/comunicacion/noticias/prevencion-de-leishmaniasis-en-artigas>

Quiroz Romero, H. (1990). *Enfermedades causadas por flagelados* (4ª. ed., pp. 69-118). México: Limusa.

Ratzlaff, F. R. (2016). *Detecção de anticorpos anti-Leishmania infantum, Neospora caninum e Toxoplasma gondii em cães necropsiados no hospital veterinário da UFSM* (Tesis de maestría). Universidad Federal de Santa María.

Ratzlaff, F. R., Engelmann, A. M., Luz, F. S., Bräunig, P., Andrade, C. M., Figuera, R. A., ... Sangioni, L. A. (2018). Coinfecções por *Leishmania infantum*, *Neospora caninum* e *Toxoplasma gondii* em cães necropsiados da região central do Rio Grande do Sul, Brasil. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 70, 109-116.

Reis, A.B., Giunchett, R.C., Carrillo, E., Martins-Filho, O.A., y J. Moreno. (2010). Immunity to *Leishmania* and the rational search for vaccines against canine leishmaniasis. *Trends Parasitol*, 26(7), 341-9.

Reithinger, R., Coleman, P.G., Alexander, B., Vieira, E.P., Assis, G., y Davies, C.R. (2004). Are insecticide-impregnated dog collars a feasible alternative to dog culling as a strategy for controlling canine visceral leishmaniasis in Brazil? *International Journal for Parasitology*, 34(1), 55-62. Recuperado de

<https://pdfs.semanticscholar.org/fc8a/422cee941eaeaabf846b2e2991804c6e0d77.pdf>

- Repiso, M.V., Gil, A., Bañales, P., Anatro, N., Fernández, L., Guarino, H., Herrera, B., ...Silva, M. (2005). Prevalencia de las principales enfermedades infecciosas que afectan el comportamiento reproductivo en la ganadería de carne y caracterización de los establecimientos de cría del Uruguay. Montevideo: INIA. Recuperado de <http://www.ainfo.inia.uy/digital/bitstream/item/2812/1/15630041107073506.pdf>
- Rondon, F.C.M., Bevilaqua, C.M.L., Franke, C.R., Barros, R.S., Oliveira, F.R., Alcantara, A.C., y Diniz A.T. (2008). Cross-sectional serological study of canine Leishmania infection in Fortaleza, Ceará state, Brazil. *Veterinary Parasitology*, 155, 24-31. Recuperado de [https://www.academia.edu/23718611/Crosssectional\\_serological\\_study\\_of\\_canine\\_Leishmania\\_infection\\_in\\_Fortaleza\\_Cear%C3%A1\\_state\\_Brazil?auto=download](https://www.academia.edu/23718611/Crosssectional_serological_study_of_canine_Leishmania_infection_in_Fortaleza_Cear%C3%A1_state_Brazil?auto=download)
- Rosypal, A.C., Zajac, A.M., Frank, G., y Lindsay, O.S. (2005). Transplacental transmission of a North American isolate of *Leishmania infantum* in an experimentally infected beagle. *Journal of Parasitology*, 91, 970-972.
- Ruiz, N., Casas, E., Suarez, F., Díaz, D., y Fernandez, V. (2012). Frecuencia de anticuerpos contra *Neospora caninum* y *Toxoplasma gondii* en canes con signos clínicos de afección neuromuscular. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 23(4), 441-447. Recuperado de <http://www.scielo.org.pe/pdf/rivep/v23n4/a06v23n4.pdf>
- Sakamoto, K. P., De Melo, G. D., y Machado, G. F. (2013). T and B lymphocytes in the brains of dogs with concomitant seropositivity to three pathogenic protozoans: *Leishmania chagasi*, *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum*. *BMC Research Notes*, 6(1), 1-9. Recuperado de <http://www.biomedcentral.com/1756-0500/6/226>

- Salomón, O., Basmajdian, Y., Fernandez, MS. y Santini, MS. (2011). Lutzomyia Longipalpis in Uruguay: the first report and the potential of visceral leishmaniasis transmission. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 106(3), 381-382. Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21655832>
- Salomon, O.D., y Casas, N. (2014). Leishmaniasis Visceral Urbana, una antropozoonosis de dispersión activa. En *Temas de zoonosis VI*. Caba: Asoc. Arg. Zoonosis.
- Satragno, D., Faral-Tello, P., Canneva, B., Verger, L., Lozano, A., Vitale, E.,...Basmadján, Y. (2017). Autochthonous Outbreak and Expansion of Canine Visceral Leishmaniasis, Uruguay. *Emerging Infectious Diseases*, 23(3). Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5382754/>
- Satragno, D., Lozano, A., Verger, L., Canneva, B., Sequeira, C., Martino, P., ... Soto, C. (2015). *Primer brote de leishmaniasis de transmisión autóctona, localidad: Arenitas Blancas, Salto*. (Proyecto CSIC: “Distribución y estacionalidad del vector Lutzomyia longipalpis”). Salto: UDELAR. Recuperado de <http://www.suvepa.org.uy/images/pdf/leishmaniasisSALTO2015.pdf>
- Scayola, M. (2019). Leishmaniosis visceral: presentación en perros de la ciudad de Salto- Uruguay. *Veterinaria (Montevideo)*, 55(211), 37-46.
- Servicio Geográfico Militar. Situación geográfica. Recuperado de <http://www.sgm.gub.uy/situacion-geografica/>
- Silva, F.L., Oliveira, R.G., Silva, T.M., Xavier, M.N., Nascimento, E.F., y Santos, R.L. (2009). *Venereal transmission of canine visceral leishmaniasis*. *Veterinary Parasitology*, 160, 55-59. Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19046812>

- Solano-Gallego, L. (2013). *Leishmaniosis. Una revisión actualizada*. Zaragoza: Servet.
- Solano Gallego, L., Fondati, A., Otranto, D., Dantas-Torres, F., Miró, G. Ordeix, L.,... Peña Giménez, M. (2013). *Leishmaniosis. Una revisión actualizada*. Zaraboza: Servet.
- Solano-Gallego, L., Lull, J., Ramos, G., Riera, C., Arboix, M., Alberola, J., y Ferrer, L. (2000). The Ibiza hound presents a predominantly cellular immune response against natural *Leishmania* infection. *Veterinary Parasitology*, 90(1-2), 37-45.
- Solano-Gallego, L., Morell, P., Arboix, M., Alberola, J., y Ferrer, L. (2001). Prevalence of *Leishmania infantum* infection in dogs living in an area of canine leishmaniasis endemicity using PCR on several tissues and serology. *Journal of Clinical Microbiology*, 39, 560- 563. Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC87775/>
- Solano-Gallego, L., Koutinas, A., Miró, G., Cardoso, L., Pennisi, MG., Ferrer, L.,... Baneth, G. (2009). *Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniosis*. *Veterinary Parasitology*, 165, 1-18. Recuperado de [http://s3.amazonaws.com/academia.edu.documents/44993118/Directions\\_for\\_the\\_diagnosis\\_clinical\\_st20160422-30663](http://s3.amazonaws.com/academia.edu.documents/44993118/Directions_for_the_diagnosis_clinical_st20160422-30663)
- Solano-Gallego, L., Miró, G., Koutinas, A., Cardoso, L., Pennisi, M., Ferrer, L., ... Baneth, G. (2011). LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniosis. *Parasites & Vectors*, 4, 86. Recuperado de <https://parasitesandvectors.biomedcentral.com/track/pdf/10.1186/1756-3305-4-86>
- Soulsby, E.J.L. (1992). *Parasitología y enfermedades parasitarias en los animales domésticos* (7ª. ed., pp. 823). México: Interamericana.

- Souza da Paz, G., Da Silva Colhado, B., Martínez Anton, M., De Souza Rocha, C., Barbosa da Silva, D., Guimarães de Moraes, C.,...Langoni, H. (2018). Infecção por *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum*, *Leishmania major* E *Trypanosoma cruzi* em cães do estado do Pará. *Ciência Animal Brasileira*, 20(1), 1–10. Recuperado de <https://www.revistas.ufg.br/vet/article/view/33566/32801>
- Tabar, M.D., Roura, X., Francino, O., Altet, L., y Ruiz de Gopegui, R. (2008). *Detection of Leishmania infantum by real-time PCR in a canine blood bank. Journal of Small Animal Practice*, 49(7), 325-8.
- Tabar Rodríguez, J., Tabar Rodríguez, M., y Vilafranca, M. (2009). *Mielopatía toracolumbar por toxoplasma gondii en un perro coinfectado con Leishmania*. Policlínico Veterinario Raspeig Histovet. Recuperado de <https://ddd.uab.cat/pub/clivetpeqani/11307064v29n4/11307064v29n4p269.pdf>
- Tizard, I.R. (2009). *Introducción a la Inmunología veterinaria* (8ª. ed., pp. 574). Barcelona: Elseviers Saunders.
- Tomassone, L., Berriatua, E., De Sousa, R., Duscher, G.G., Mihalca, A.D., Silaghi, C., ...Zintl, A. (2018). Neglected vector-borne zoonoses in Europe: into the wild. *Veterinary Parasitology*, 251, 17-26.
- Universidad de Zaragoza. (2021). *Working IN Epidemiology*. Recuperado de <http://www.winepi.net/sp/index.htm>
- Venturini, MC. y Venturini, L. (2004). *La Toxoplasmosis en Medicina Veterinaria* (4ªed., pp. 305-311). Buenos Aires: Ideográfica.
- World Health Organization. (2011). *Hemoglobin concentrations for the diagnosis of anemia and assessment of severity*. Recuperado de <http://www.who.int/vmnis/indicators/haemoglobin.pdf>

World Health Organization. (s.f). *Leishmaniasis visceral Epidemics*. Recuperado de <http://www.who.int/leishmaniasis/lepidemic>

## 14. ANEXOS

### 14.1. Anexo I. Ficha clínica epidemiológica



Salto ---- / Bella Unión-----

Fecha

#### PROPIETARIO

Nombre: \_\_\_\_\_ Teléfono: \_\_\_\_\_

Dirección: \_\_\_\_\_ Localidad: \_\_\_\_\_

#### ANIMAL

Nombre: \_\_\_\_\_ Edad: \_\_\_\_\_ Chip, no \_\_\_\_\_

Raza \_\_\_\_\_ Sexo \_\_\_\_\_ Peso \_\_\_\_\_

Nº de perros en el domicilio

Viajes en el último año

Hábitat en la vivienda

Lugar dónde nació

SEROLOGÍA Rk39

POSITIVA

NEGATIVA

ALOPECIAS		SINTOMAS OCULARES		
DESCAMACION EPITELIAL		APATÍA		
TRUFA SECA		ENTERITIS		
ULCERACIONES		FIEBRE		
ONICOGRIFOSIS		MUCOSAS ALTERADAS		
LINFOADENOPATIAS		ADELGAZAMIENTO		
HEPATOMEGALIA				

Otros: \_\_\_\_\_

Muestras: Sangre

MO

Suero

Otras

## 14.2. Anexo II. Test inmunocromatográfico rápido con antígeno recombinante rK39 (rK39-ICT) (Kalazar Detect™ Rapid test, InBios International, Seattle, WA)

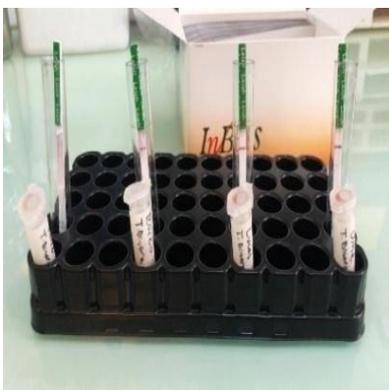
### Procedimiento:

- 1 Permitir que los sueros alcancen temperatura ambiente antes de realizar la prueba
- 2 Sacar la tira reactiva del envase
- 3 Colocar 20µl de suero en la zona indicada en la tira (debajo de las flechas)
- 4 Introducir la tira en un tubo eppendorf y adicionar 2 a 3 gotas de la solución tampón suministrado con el kit.
- 5 Leer el resultado en 10 minutos

### Interpretación de los resultados:



**Resultados positivos:** Deben aparecer dos líneas; de control(C) y la línea de test (T) e indican que la muestra analizada presenta anticuerpos que reconocen el antígeno recombinante de rK39 de *Leishmania*. Debe considerarse positivo una línea tenue.



**Resultado negativo:** Cuando solo aparece la línea de control (C). No hay anticuerpos contra el antígeno recombinante rK39 en la muestra analizada.

Resultado invalidado: Cuando no aparece la línea de control(C), pero aparece la línea de test (T). Es recomendable realizar el test nuevamente.

### **14.3 Anexo III TOXOTEST. Prueba de hemaglutinación indirecta (HAI) para la detección de anticuerpos contra el Toxoplasma gondii**

#### **Instrucciones para su uso:**

**Antígeno HAI:** preparar con 5,2 ml de Reconstituyente HAI.

Esperar una hora antes de usar agitando enérgicamente cada 20 minutos para permitir una correcta rehidratación del reactivo. Cada vez que se emplea homogeneizar mediante agitación.

**GR no sensibilizados:** homogeneizar mediante agitación antes de usar, evitando la formación de espuma.

**Diluyente de Sueros HAI:** agregar 0,2 ml de Solución Proteica cada 10ml de Buffer HAI, mezclar, rotular y fechar.

**2-Mercaptoetanol:** una vez abierta la ampolla, trasvasar el contenido al frasco vacío provisto, el que se deberá tapar inmediatamente después de usar.

**2-Mercaptoetanol al 1%:** con el 2-ME provisto, preparar una dilución 1/100 con solución fisiológica en cantidad suficiente de acuerdo al número de pocillos que se utilicen.

Ejemplo: para 96 pocillos: 25 ul de 2-ME en 2,5 ml de solución fisiológica.

**Controles Positivo y Negativo:** listos para usar.

**Procedimiento:** Seleccionar una policubeta con pocillos sin usar de fondo en U. Pasar un trapo húmedo por la base de la policubeta antes de usar, colocarla en forma apaisada sobre el trapo y realizar el ensayo manteniéndola en esta posición.

- 1) Con microgotero de 25 ul, colocar una gota de Diluyente de Sueros HAI en todos los pocillos a usar de la policubeta.
- 2) Tomar una alícuota de cada suero o controles a ensayar con microdilutores de 25 ul (uno para cada muestra) y colocar en los pocillos de la columna 1. Se utilizarán tantas hileras horizontales como sueros o controles deban procesarse.
- 3) Realizar diluciones a partir de la columna 1 (dilución 1/2), pasando los microdilutores a la columna 2 (dilución 1/4) y así sucesivamente hasta la columna 6 (dilución 1/64). Si se procesaran más de 8 sueros, se utilizarán las columnas 7 a 12, realizando las diluciones de la manera antes descripta.
- 4) Colocar en las columnas 1 y 2 (diluciones 1/2 y 1/4) una gota (25 ul) de GR no sensibilizados, para control de heterofilia. Hacer lo mismo en las columnas 7 y 8 en caso de ser empleadas.
- 5) En el resto de los pocillos, agregar una gota (25 ul) de Antígeno HAI.
- 6) Agitar la policubeta golpeando con los dedos en las paredes laterales, durante 30 segundos por lo menos.
- 7) Dejar en reposo, al resguardo de vibraciones, durante 90 minutos.
- 8) A partir de los 90 minutos, leer. Se puede aumentar la nitidez de la imagen, leyendo sobre un espejo, iluminando la placa desde arriba e interponiendo un papel blanco y traslúcido entre la policubeta y la fuente de luz.

**Interpretación de los resultados:** Títulos  $\geq 16$  significan mayor probabilidad de infección toxoplásmica. A fin de determinar una primoinfección reciente deben procesarse 2 muestras tomadas con un intervalo de 2-3 semanas. Un aumento de título mayor de 2 diluciones entre la 1ra y 2da muestra indican infección recientemente adquirida.

#### 14.4 Anexo IV MegaFLUO® NEOSPORA caninum. Testkit para la detección indirecta semicuantitativa mediante Inmunofluorescencia de anticuerpos IgG específicos contra Neospora caninum en plasma o suero del perro



#### Diluciones de los sueros

Sueros problemas: realizar diluciones correspondientes en PBS.

- Antes de iniciar la prueba dejar secar los portaobjetos a utilizar
- Usar una placa de 96 pocillos para realizar las diluciones
- Colocar cantidades constantes de PBS (solución de trabajo), 100 ul en todos los pocillos excepto en el primero.
- Colocar 8 ul de suero en 192 ul de PBS en el primer pocillo (1:25)
- Hacer las diluciones pasando 100 ul desde el primero pocillo en adelante (1/50), 1/100, 1/200, etc.)
- Colocar las diluciones en el portaobjeto
- Colocar sueros controles positivos y negativos

## **Procedimiento**

- Incubar el antígeno con el suero problema a 37.C durante 30 minutos en cámara húmeda
- Realizar un lavado de 10 minutos con buffer de carbonatos (de solución de trabajo), pH 9, en agitador
- Incubar con el conjugado correspondiente, 30 minutos a 37.C, en cámara húmeda
- Lavar con buffer de carbonatos durante 10 minutos y con agitación
- Montar con glicerina al 50% en buffer de carbonatos
- Observar con microscopio de fluorescencia
- Lectura: se relaciona la observación de fluorescencia (color verde manzana por isotiocianato de fluorescencia) y con la morfología que debe corresponderse con lo investigado (morfología bacteriana, parasitaria, cuerpos de inclusión, etc.)

## **Interpretación de resultados**

Se considera positiva la última dilución del suero en que se observa fluorescencia completa en todo el borde del parásito.

