

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE VETERINARIA

**DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE *LEISHMANIA INFANTUM* EN PERROS
ASINTOMÁTICOS POSITIVOS A LA TÉCNICA DE INMUNOCROMATOGRAFÍA DE LA
CIUDAD DE SALTO**

“por”

ARAUJO SORAVILLA, Juan Andrés

MARTÍNEZ SALINES, Fernando

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

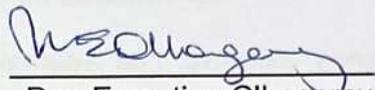
Orientación: Producción Animal

MODALIDAD: Ensayo experimental

**MONTEVIDEO
URUGUAY
2024**

Tesis de grado aprobada por:

Presidente de mesa:


Dra. Ernestina Olhagaray

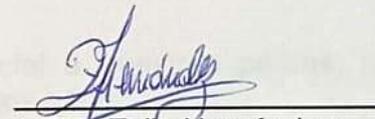
Segundo miembro (Tutor):


Dra. María Teresa Armúa

Tercer miembro:


Lic. Victoria de Brun

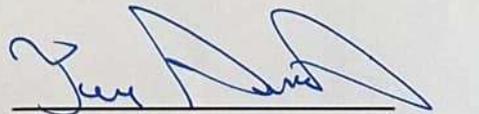
Cuarto miembro (Co-Tutor):

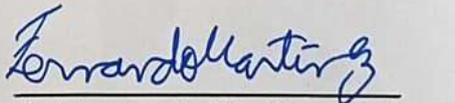

Dra. Zully Hernández

Fecha:

27 de setiembre de 2024

Autores:


Br. Juan Andrés Araújo Soravilla


Br. Fernando Martínez Salines

AGRADECIMIENTOS

Especialmente a la Dra. María Teresa Armúa Fernández, tutora de esta tesis por su compromiso, paciencia, apoyo y guía en la realización de este trabajo.

A nuestra co-tutora, Dra. Zully Hernández, por brindar sus amplios conocimientos, dedicación y experiencia clínica.

Al Laboratorio de la Unidad de Parasitología Veterinaria, FVet por permitir el uso de sus instalaciones.

Al Dr. Martin Scayola Xamo por brindarnos las muestras para realizar el trabajo.

A la Prof. Valérie Cayssials por su excelente predisposición para colaborar en el análisis estadístico.

Al personal de Biblioteca por su colaboración y orientación a distancia.

A Facultad de Veterinaria, que no sólo nos dio una formación profesional, sino que nos dió amigos y compañeros en Paysandú y Montevideo, quienes de cerca o de lejos siempre estuvieron presentes.

Un agradecimiento a nuestros familiares, en especial a nuestros padres, hermanos y hermana por el apoyo incondicional durante todos estos años.

ÍNDICE DE CONTENIDO	Página
Página de aprobación	02
Agradecimientos	03
Índice de contenido	04
Lista de figuras	06
Lista de tablas	06
1. Resumen	07
2. Summary	08
3. Introducción	09
4. Revisión bibliográfica	10
4.1. Generalidades	10
4.2. Importancia en salud pública	11
4.3. Distribución geográfica	11
4.4. Etiología	12
4.5. Ciclo biológico	13
4.6. Vector	15
4.6.1. Generalidades	15
4.6.2. Características morfológicas	15
4.6.3. Alimentación del vector	16
4.6.4. Comportamiento y actividad del vector	17
4.7. Tipos de leishmaniosis	17
4.8. Manifestaciones clínicas de Leishmaniosis visceral canina (LVC)	20
4.9. Control y prevención	22
4.10. Leishmaniosis en Uruguay	23
4.11. Diagnóstico	24
4.11.1. Pruebas serológicas	25
4.11.2. Detección del agente	26
4.11.3. PCR	27
5. Hipótesis	28
6. Objetivos	28

6.1.	Objetivo general	28
6.2.	Objetivos específicos	29
7.	Materiales y métodos	29
7.1.	Muestras	29
7.2.	Extracción de ADN y PCR a tiempo final	29
7.3.	Análisis estadístico	30
8.	Resultados	30
9.	Discusión	35
10.	Conclusión	37
11.	Referencias bibliográficas	37

LISTA DE FIGURAS	Página
Figura 1. Ciclo biológico de <i>L. infantum</i> en su reservorio urbano	14
Figura 2. Hembra de flebotomíneo ingiriendo sangre de un humano	16
Figura 3. Tipos de leishmaniosis de acuerdo a su distribución geográfica	18
Figura 4 a, b, c, d y e. Manifestaciones clínicas en perros	21
Figura 5 a. Epistaxis, b. Lesiones cutáneas multifocales	21
Figura 6. Amastigotes en frotis realizado después de una punción aspiración en clínica	26
Figura 7. Fotografía del gel de electroforesis mostrando las bandas de los tres tipos de tejidos de las muestras 51, 58 y 60	32
Figura 8. Fotografía del gel de electroforesis mostrando las bandas obtenidas de los tres tipos de tejidos de las muestras 74, 83 y 85	32
Figura 9. Fotografía del gel de electroforesis mostrando las bandas obtenidas de los tres tipos de tejidos de las muestras 87, 89 y 90	33
Figura 10. Fotografía del gel de electroforesis mostrando las bandas obtenidas de los tres tipos de tejidos de las muestras 94, 95 y 96	33
Figura 11. Fotografía del gel de electroforesis mostrando las bandas obtenidas de los tres tipos de tejidos de las muestras 97, 98, 99 y control negativo	34
Figura 12. Fotografía del gel de electroforesis mostrando las bandas obtenidas de los tres tipos de tejidos del animal 100 y segundo control negativo y el positivo	34

LISTA DE TABLAS	Página
Tabla 1. Concentración de ADN de las muestras de los distintos tejidos	31
Tabla 2. Total de muestras positivas y negativas a PCR de acuerdo con el tipo de muestra	35

1. RESUMEN

La leishmaniosis pertenece a un grupo de enfermedades zoonóticas cuyos agentes etiológicos pertenecen al género *Leishmania*, además, es considerada una de las enfermedades parasitarias de transmisión vectorial más importantes a nivel mundial. Estos protozoarios se transmiten por picadura de distintas especies de insectos flebotómicos. Las formas clínicas que se pueden presentar son: leishmaniosis cutánea, leishmaniosis mucocutánea, y leishmaniosis visceral (LV), siendo esta última la que causa más muertes a nivel mundial. En Sudamérica, *Lutzomyia longipalpis* es el vector de *Leishmania infantum*, agente causal de LV. En perros, las manifestaciones clínicas que se asignan a la LV se pueden agrupar en 5 tipos de cuadros clínicos, los cuales son sistémico, cutáneo, ocular, renal y otras manifestaciones variables. El control de esta enfermedad es muy complejo debido a que la transmisión es mantenida por un sistema en el cual participan el parásito, el flebótomo vector y reservorios animales. El objetivo de la siguiente tesis fue detectar ADN de *Leishmania infantum* en muestras de sangre, linfonódulo y médula ósea mediante diagnóstico molecular en animales asintomáticos que fueron diagnosticados previamente como positivos por la técnica de inmunocromatografía en la ciudad de Salto y de esta manera seleccionar cuál o cuáles de esos tejidos es la mejor opción para el diagnóstico molecular. Para esto, fueron utilizados 20 perros, de los cuales se pudo extraer ADN de los tres tipos de muestras en 16 animales. El tejido con mayor dificultad para la extracción de ADN fue médula ósea debido a la formación de microcuagulos y taponamiento de la columna. Se detectó ADN de *L. infantum* en los distintos tejidos mediante una PCR convencional. Con el fin de evaluar si la proporción de positivos (sensibilidad) varió a lo largo de los 3 tipos de muestras, se utilizó un test de homogeneidad Chi-cuadrado, arrojando como resultado que hay diferencias significativas a lo largo del tipo de muestra analizada muestras de tejidos de perros asintomáticos. Con respecto a la diferencia entre tipo de muestra, linfonódulos resultó ser el tejido más fiable para la detección de ADN de *L. infantum* en perros asintomáticos ya que presentó una sensibilidad de un 100%, en contrapartida a lo observado en médula ósea y sangre que obtuvieron una sensibilidad de 75% y 19%, respectivamente.

2. SUMMARY

Leishmaniasis belongs to a group of zoonotic diseases whose etiological agents belong to the genus *Leishmania*. It is also considered one of the most important vector-borne parasitic diseases worldwide. These protozoa are transmitted through the bites of various species of sandflies. The clinical forms that can present are cutaneous leishmaniasis, mucocutaneous leishmaniasis, and visceral leishmaniasis (VL), with the latter causing the most deaths globally. In South America, *Lutzomyia longipalpis* is the vector of *Leishmania infantum*, the causative agent of VL. In dogs, clinical manifestations VL can be grouped into 5 types of clinical presentations: systemic, cutaneous, ocular, renal, and other variable manifestations. Controlling this disease is very complex because transmission involves a system that includes the parasite, the vector sandfly, and animal reservoirs. The objective of the following thesis was to detect *Leishmania infantum* DNA in blood, lymph node, and bone marrow samples through molecular diagnosis in asymptomatic animals that had been previously diagnosed as positive by immunochromatography in the city of Salto, to determine which of these tissues is the best option for molecular diagnosis. For this, 20 dogs were used, from which DNA was extracted from all three types of samples in 16 animals. The tissue with the most difficulty in DNA extraction was bone marrow due to the formation of microclots and clogging of the column. DNA of *L. infantum* was detected in the different tissues using conventional PCR. To assess whether the proportion of positives (sensitivity) varied across the 3 types of samples, a Chi-square homogeneity test was used, revealing significant differences across the analyzed tissue samples from asymptomatic dogs. Regarding the difference between types of samples, lymph nodes proved to be the most reliable tissue for detecting *L. infantum* DNA in asymptomatic dogs, with a sensitivity of 100%, compared to bone marrow and blood, which had sensitivities of 75% and 19%, respectively.

3. INTRODUCCIÓN

Se denomina leishmaniosis a un grupo de enfermedades zoonóticas cuyos agentes etiológicos pertenecen al género *Leishmania*. Es considerada una de las enfermedades parasitarias de transmisión vectorial más importantes a nivel mundial (Scayola Xamo, 2018), siendo esta muy antigua ya que existen registros de lesiones compatibles con leishmaniosis en escritos de más de 4000 años de antigüedad tanto en el viejo continente como en las Américas (Akhoundi et al., 2016). Tiene una amplia distribución, afectando a humanos y animales en Asia, Europa, África y las Américas. Las formas clínicas que se pueden presentar son: leishmaniosis cutánea (LC), leishmaniosis mucocutánea (LMC), y leishmaniosis visceral (LV), siendo esta última la que causa más muertes mundialmente (Armúa Fernández y Venzal, 2019).

La clasificación taxonómica de este género divide a las especies en distintos complejos: *Leishmania donovani*, *Leishmania major*, *Leishmania tropica*, *Leishmania mexicana*, *Leishmania braziliensis*, *Leishmania guyanensi*. El ciclo natural de la infección por *Leishmania* spp. implica un hospedador vertebrado y un vector (Scayola Xamo, 2018). Existe un gran abanico de hospederos y reservorios para las diferentes especies de *Leishmania*, pero su distribución geográfica se determina por la presencia de flebotomíneos. Los complejos de *L. braziliensis* y *L. mexicana* se encuentran exclusivamente en el continente americano mientras que *L. major* y *L. tropica* son del viejo mundo (Armúa Fernández y Venzal, 2019). Se debe tener en cuenta que existen además de *Lutzomyia* otros géneros de flebotomos que pueden picar al ser humano, pero únicamente los vectores competentes transmisores de la enfermedad son los de las especies y subespecies *Phlebotomus* en el Viejo Mundo, y de *Lutzomyia* en el Nuevo Mundo (Organización Mundial de la Salud, 2010; Scayola Xamo, 2018). Cabe destacar que, si bien es una enfermedad vectorial, en los perros, existen otras dos formas de infección que son la venérea y la transplacentaria (Armúa y Venzal, 2019).

En América Latina, la leishmaniosis está presente en por lo menos 12 países. Sin embargo, Brasil es el país donde ocurren el 90 % de los casos, especialmente en la Región Nordeste (Ministério da Saúde, 2014). La distribución de esta enfermedad se relaciona a la presencia de sus vectores, flebotomíneos del género *Lutzomyia* (Gállego y Riera, 2000). Asimismo, la gran reproducción canina sumado al abandono de estos en conjunto con ciertas adaptaciones del vector, han contribuido a que haya una incidencia y una gran dispersión geográfica en América Latina de la enfermedad de forma muy preocupante (Ministerio de Salud de la Nación, 2010). En Uruguay, *Lu. longipalpis* fue detectada por primera vez en el departamento de Artigas y Salto en el año 2010, años más tarde (2015) se describieron los primeros casos de leishmaniosis visceral canina (LVC) por *Leishmania infantum* en Salto y en 2018 se diagnosticó el primer caso en humanos (Borba, Castro, Mojoli, y Rodríguez, 2020).

La LVC presenta manifestaciones clínicas muy variadas debido a las respuestas inmunitarias de cada animal y a los diversos mecanismos patógenos. Además, la infección por *L. infantum* genera en los perros una enfermedad crónica, que puede ser capaz de cursar de forma subclínica, ser auto limitante leve o incluso agravarse pudiendo llevar a la muerte del animal (Ministerio da Saúde, 2014; Scayola Xamo, 2018). Las manifestaciones clínicas que se asignan a la LVC se pueden agrupar en 5 tipos de cuadros clínicos, los cuales son sistémico, cutáneo, ocular, renal y otras manifestaciones variables (Scayola, Supparo, Cedano y Hernández, 2019).

El control de esta enfermedad es muy complejo debido a que la transmisión es mantenida por un sistema en el cual participan, el parásito, el flebótomo vector y reservorios animales, siendo casi imposible controlar la enfermedad con una única forma de intervención. Para el control las estrategias y tratamientos deben dirigirse a minimizar la propagación y tomar medidas ante los casos, las cuales son aplicadas sobre el vector, reservorio animal, entre otros (Organización Mundial de la Salud, 2010).

En cuanto al diagnóstico, existen distintos tipos, como los análisis histopatológicos, así como cultivos de protozoarios en medios específicos, la detección de ADN por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), como también la evidencia de anticuerpos anti-*Leishmania* en suero (Gállego y Riera, 2000). Cabe destacar que la técnica utilizada en mayor medida en estudios de vigilancia epidemiológica para *L. infantum* es la inmunocromatografía que utiliza un antígeno recombinante (rk39), y se caracteriza por obtener una alta sensibilidad en perros sintomáticos, descendiendo al momento de detectar asintomáticos (Armúa y Venzal 2019; Gállego y Riera, 2000; Scayola Xamo, 2018).

Hoy en día, la PCR, se utiliza ampliamente para poder detectar agentes patógenos, la cual puede ser empleada a partir de distintos tipos de muestras, tanto humanas como animales, existiendo distintos tipos de PCR. Es uno de los métodos que presenta mayor sensibilidad (92-98%) y especificidad (100%) en la detección de *Leishmania* en perros (Inieta González, 2007).

4. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

4.1. GENERALIDADES

La leishmaniosis comprende un grupo de enfermedades zoonóticas ocasionadas por protozoarios bifásicos del género *Leishmania*. Estos protozoarios son transmitidos por picadura de distintas especies de insectos flebotomíneos. Dentro de las enfermedades parasitarias transmitidas por vectores es una de las más importantes a nivel mundial para los seres humanos (Scayola Xamo, 2018). Esta tiene diferentes formas de presentación, las cuales son: LC, LMC, y LV, siendo la visceral la más grave debido a su gran poder letal (Armúa Fernández y Venzal, 2019).

A finales del siglo XIX Cunningham, Borovsky, Leishman, Donovan, Wright, Lindenberg y Vianna, lograron identificar el parásito causante de la leishmaniosis. En 1903, Leishman y Donovan, ambos médicos, casi simultáneamente, pero trabajando siempre en forma individual e independiente uno del otro, pudieron en ese año describir la presencia del parásito en el bazo de algunos niños que habitaban el territorio de la India. En el año siguiente, Cathoire y Laveran hallaron *Leishmania* sp. en niños con anemia esplénica infantil. Ronald Ross dio el nombre genérico de *Leishmania*. Posteriormente, en 1908, Nicolle le dio el nombre de *Leishmania infantum* en Túnez e identificó al perro como su reservorio. Años más tarde, específicamente en 1912, Carini, en Brasil, pudo realizar la identificación de *Leishmania* spp. en lesiones mucosas de pacientes con leishmaniosis. A principios de 1940, Swaminath, Shortt y Anderson, en India, y Adler y Ber, en Palestina, demostraron la transmisión

de *L. donovani* y "*L. tropica*" por flebotómicos (Organización Mundial de la Salud, 2010).

La leishmaniosis es considerada una enfermedad emergente y reemergente de alta gravedad ya que afecta un número elevado de humanos en Asia, Europa, África y las Américas desde los tiempos ancestrales. Si bien los humanos son hospedadores accidentales de *Leishmania* spp., la gran exposición frente a los vectores infectados hace que año a año más personas se vean afectadas (Scayola Xamo, 2018).

4.2. IMPORTANCIA EN SALUD PÚBLICA

Las distintas especies de *Leishmania* generan diversas presentaciones de la enfermedad, las cuales tienen variación en su patogenicidad a nivel mundial. Es aceptado generalmente que el control en los distintos pacientes se lleva a cabo por respuestas inmunes tanto innatas como adaptativas. La interacción entre ambas partes es manifestada por el desenlace clínico-subclínico de la enfermedad y además por las distintas tasas de curación espontánea y de recurrencia (Organización Mundial de la Salud, 2010).

La gran migración de humanos al igual que de reservorios, en conjunto con la falta de medidas de control y la coinfección con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) son las causantes principales del aumento de la incidencia mundial. Las elevadas tasas reproductivas de la población canina y el aumento en el abandono de estos, además de la adaptación en el ámbito humano y la dispersión del vector contribuyeron a que en los últimos años la incidencia, letalidad, y, en mayor medida, la extensión geográfica de la infección en América Latina aumentará de manera preocupante, observándose un cambio en la epidemiología al constatarse una circulación de esta enfermedad en áreas urbanas y periurbanas (Ministerio de Salud de la Nación 2010). La coinfección con el VIH se describió por primera vez a mediados de 1980 en los países mediterráneos de Europa y desde entonces ha aparecido en un tercio de los países endémicos. El VIH y *Leishmania* spp. hacen sinergia mutuamente de forma perjudicial. Los pacientes infectados por el VIH tienen mayores probabilidades de sufrir leishmaniosis visceral grave, debido a que hay una merma en su respuesta al tratamiento antirretrovírico (Organización Mundial de la Salud, 2010).

Cabe destacar que, el contacto directo con hospedadores infectados o la manipulación de muestras biológicas y cultivos de parásitos obtenidos de dichos hospedadores son de bajo riesgo debido a que las infecciones se transmiten por flebotomos y a la ausencia de formas de resistencia en el medio ambiente (Organización Mundial de Sanidad Animal (OMSA), 2021).

4.3. DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA

La leishmaniosis, a la fecha, está presente en todos los continentes (excepto en Antártida) generando una importante problemática debido a su impacto, gran magnitud y una cantidad de brotes epidémicos que ocurren de forma creciente. Es endémica en 98 países, con más de 350 millones de personas en riesgo de transmisión. En estudios publicados en los últimos años, se ha informado que el número de regiones endémicas ha aumentado de forma considerable y esto llevó al

incremento de los casos en humanos y animales, con la gran importancia de que la infección canina asintomática es una de las mayores responsables en mantener la presencia del parásito en zonas endémicas (OMSA, 2021).

En la cuenca mediterránea del Viejo Mundo la LV es una zoonosis causada por *L. infantum*, la cual ocurre en zonas rurales, regiones montañosas y periurbanas. En el hogar es el punto de encuentro entre el hombre, el vector y la consiguiente transmisión. Bien es sabido que estas personas tienen perros y otros animales que atraen flebotómicos hacia allí, favoreciendo dicha transmisión al ser humano.

También se encuentran focos de transmisión zoonótica de *L. infantum* en Afganistán, Pakistán, la República Islámica de Irán y Asia Central.

Dicha enfermedad se ve favorecida a desarrollarse en pueblos agrícolas donde las casas suelen estar construidas con paredes de barro y suelos de tierra, donde el ganado vacuno o de otro tipo, se aloja cerca de las viviendas humanas (Ministério da Saúde, 2014).

En América Latina, la leishmaniosis ya 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). La distribución se relaciona a la presencia de los vectores (*Lutzomyia* spp.), su tendencia a ingerir sangre de los animales, así como del humano y por la capacidad de soportar el desarrollo en su interior de las especies de *Leishmania* (Gállego y Riera, 2000).

De acuerdo con la Organización Panamericana de la Salud (OPS) se registraron entre 2001 y 2014 en el continente americano 48.700 casos de LV. Nuestra región está afectada por la forma visceral americana producida por *L. infantum*. Luego de colonizar diversas poblaciones en Paraguay, Argentina y Brasil, alcanzó a nuestro país. En el año 2010, el vector *Lu. longipalpis* fue capturado por primera vez en los departamentos de Artigas y Salto, y en febrero de 2015 se describieron los primeros casos de LVC por *L. infantum* en perros en el departamento de Salto. Ante esta situación de riesgo de inminente aparición de casos humanos, la División de Epidemiología del Ministerio de Salud Pública (MSP) conformó un equipo multidisciplinario, con la participación de la Universidad de la República (UDELAR), para el desarrollo de guías de manejo de LV en el humano, en el reservorio (perro), así como en el manejo del vector, destacando los principales lineamientos de actuación en nuestro país (Borba et al., 2020).

4.4. ETIOLOGÍA

Esta enfermedad parasitaria es producida por un protozooario perteneciente a la familia Trypanosomatidae, del género *Leishmania* que comprende alrededor de 22 especies patógenas al hombre, las cuales se agrupan en los subgéneros *Leishmania* y *Viannia*. En el Nuevo Mundo han sido identificadas 15 especies de *Leishmania* con diferente tropismo: visceral, cutáneo y mucoso. El parásito es digenético, es decir, durante su ciclo de vida se encuentra en dos formas o estadios: una forma promastigote que mide entre 20 y 30 μm , es extracelular y alargada, y posee un flagelo que le permite la movilidad en el intestino de los insectos vectores; y otra forma la amastigote, la cual mide entre 2 y 5 μm , es redondeada e intracelular, carece de flagelo, y se multiplica en células del sistema mononuclear fagocítico, principalmente macrófagos de hospederos mamíferos. Ambas formas del parásito se dividen por fisión binaria y además poseen una única mitocondria modificada conocida como kinetoplasto. En las

Américas, la forma de promastigote es transmitida a los mamíferos susceptibles, entre ellos los humanos, a través de la picadura de insectos vectores del género *Lutzomyia* (Organización Panamericana de la Salud, 2019).

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

El complejo *L. donovani* se puede encontrar en todo el cuerpo, focalizándose en las células del sistema retículo-endotelial, donde se incluyen leucocitos polimorfonucleares y además presentando especial afinidad con las células endoteliales de los vasos sanguíneos y linfáticos del bazo, hígado, médula ósea, pulmón, riñón, nódulos linfáticos mesentéricos y la piel. Los restantes complejos se localizan en monocitos y otras células del sistema reticuloendotelial en lesiones cutáneas y en la piel, en nódulos linfáticos y mucosas (Scayola Xamo, 2018).

4.5. CICLO BIOLÓGICO

Leishmania spp. parasitan y se replican en las células del sistema fagocítico mononuclear de mamíferos y reptiles sauriomorfos. Su ciclo biológico incluye, además, la presencia de artrópodos vectores conocidos como flebotomíneos, en cuyo tubo digestivo el parásito se multiplica extracelularmente. De las más de 700 especies descritas de flebotomíneos, solamente unas 70 son vectores competentes o sospechosos de transmitir leishmaniosis. En el Nuevo Mundo, todas ellas pertenecen al género *Lutzomyia*, mientras que en el Viejo Mundo pertenecen al género *Phlebotomus* (Gállego y Riera, 2000). Las hembras de los flebotomíneos son hematófagas, y se infectan del parásito cuando estas se alimentan de sangre conteniendo macrófagos con amastigotes (Scayola Xamo, 2018). Cuando una hembra de flebotomíneo succiona sangre, los amastigotes pasan a su aparato digestivo donde se transformarán en promastigotes, que se multiplican por fisión binaria y pueden encontrarse libres o adheridos a la pared del intestino.

Estos promastigotes deben pasar por una serie de complejas transformaciones dentro del intestino de la hembra de flebotomíneo hasta alcanzar la capacidad infectante, conociéndose este proceso como metaciclogénesis (Scayola Xamo, 2018; Armúa y Venzal, 2019). Luego, se produce una migración de los promastigotes metacíclicos hacia la parte anterior del tubo digestivo (partes bucales) a partir de lo cual, el vector es capaz de infectar un nuevo hospedador vertebrado. Durante la alimentación puede regurgitar entre 10 y 100 promastigotes junto con la saliva, completando así el ciclo biológico (Scayola Xamo, 2018).

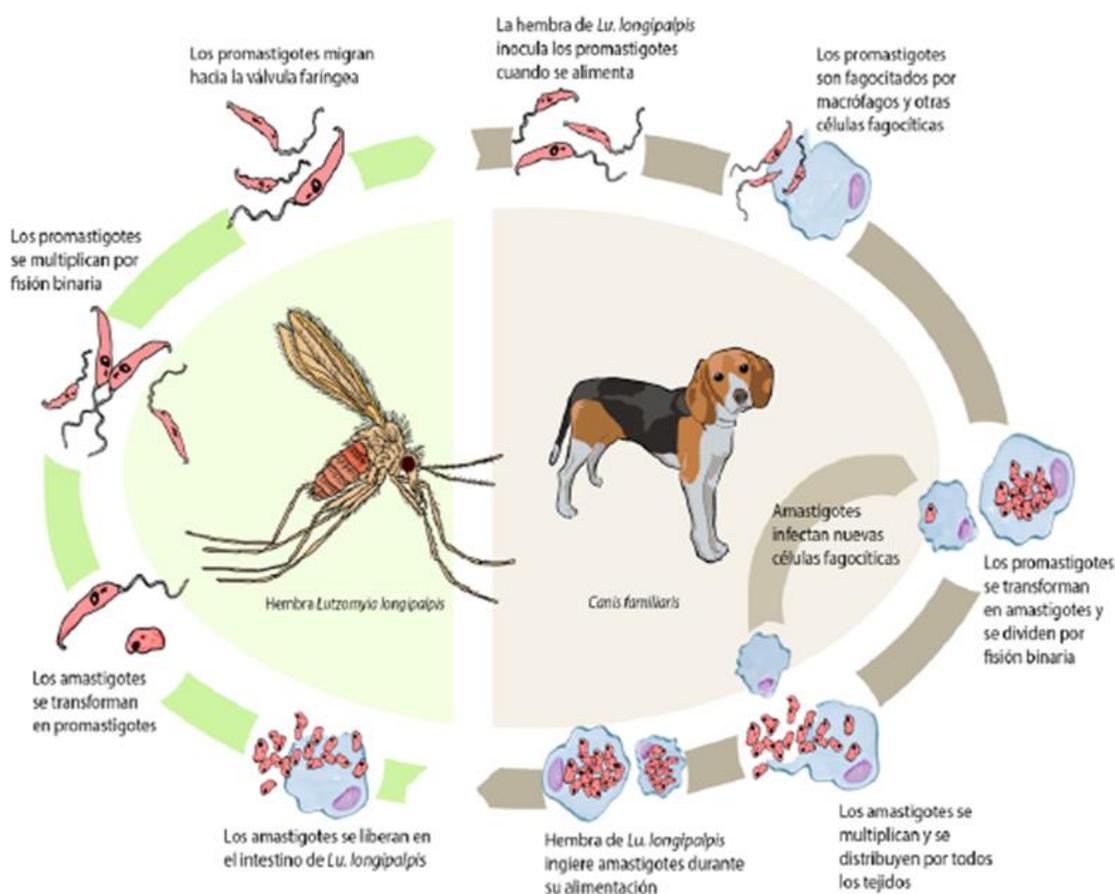


Figura 1. Ciclo biológico de *L. infantum* en su reservorio urbano (Armúa y Venzal, 2019)

Al momento de ser inoculados en el hospedador vertebrado estos son captados por los macrófagos de la dermis y pasan a su citoplasma, donde el parásito se transforma en la forma de amastigote y se divide activamente por sucesivas fisiones binarias. Dicha multiplicación y desarrollo en los macrófagos llega a su finalización cuando la célula, que contiene decenas de parásitos, se lisa. Los parásitos que se encuentran libres en el organismo invaden nuevos macrófagos de la zona, en los que se repite el proceso de multiplicación, o bien se diseminan directamente en la piel o son transportados por el torrente sanguíneo y linfático, junto a los macrófagos circulantes, para localizarse en tejidos ricos en células macrofágicas fijas (médula ósea, hígado y bazo principalmente) (Gállego y Riera, 2000).

Dentro de la hembra de flebotomíneo, *Leishmania* spp. necesita de cuatro a siete días para volverse infectante. Los flebotomíneos pueden infectarse mientras haya parásitos circulantes en la sangre o en la piel del reservorio, independientemente de si el mismo presenta o no signos clínicos de la enfermedad (Ministerio de Salud, 2010). El ciclo biológico de *L. infantum* se puede ver representado en la Figura 1. Cabe destacar que, si bien es una enfermedad vectorial, en los perros, existen otras dos formas de infección que son la venérea y la transplacentaria (Armúa y Venzal, 2019).

4.6. VECTOR

4.6.1. Generalidades

El ciclo natural de la infección por *Leishmania* spp. implica un hospedador vertebrado y un vector (Scayola Xamo, 2018). Los encargados de la transmisión de la enfermedad son los vectores flebotomíneos, de pequeño tamaño, menor a 4 mm, dípteros de la familia Psychodidae, subfamilia Phlebotominae. Al demandar una gran cantidad de energía para producir huevos, las hembras son hematófagas. Una característica importante es que tienen un aparato bucal altamente especializado, el cual está conformado por un fascículo con seis estiletes arriba del labro, mandíbulas con las que cortan la piel del hospedador y una lacinia generalmente armada con dientes que les da estabilidad a las piezas bucales durante la penetración dérmica. Su cuerpo está cubierto de finas setas, sus patas son largas y sus alas son pequeñas (Armúa y Venzal, 2019).

Se debe tener en cuenta que existen otros géneros de flebótomos que pican al ser humano, aunque únicamente las especies y subespecies de *Phlebotomus* en el Viejo Mundo, y de *Lutzomyia* en el Nuevo Mundo son los vectores competentes. Algunas especies de flebotomíneos transmiten exclusivamente una especie de *Leishmania*, mientras que otras son vectores de múltiples especies. A la fecha, no hay trabajos que evidencien que *Leishmania* spp. podría ser transmitida por la picadura de otros invertebrados hematófagos distintos de los flebótomos (pulgas y garrapatas, entre otros) (Organización Mundial de la Salud, 2010; Scayola Xamo, 2018).

4.6.2. Características morfológicas

Los flebotomíneos son insectos nematóceros de pequeño tamaño, el cual no sobrepasa los 4 mm de longitud, y se pueden ver características diferenciadas (Figura 2). Como se observa en la imagen, estos presentan patas muy largas con una cabeza que se encuentra implantada en una posición algo inferior en el tórax, lo que les proporciona un aspecto giboso. Tiene una gama alta de variabilidad de colores en su cuerpo que va desde blanco, pudiendo pasar por un ocre amarillento, hasta negro, estando cubiertos completamente por vellosidades (Scayola Xamo, 2018). Cuando se encuentran en reposo mantienen sus alas en ángulo formando una "V" sobre el abdomen, éstas son peludas y casi de igual longitud que su cuerpo (Organización Mundial de la Salud, 2010).



Figura 2. Hembra de *Lutzomyia longipalpis* (Santamaria, Cabrera, Avendaño, Pardo, 2016).

4.6.3. Alimentación del vector

Los flebotomíneos poseen un aparato bucal de tipo cortador-chupador. Si bien los machos no participan en la transmisión de la enfermedad debido a que su estructura bucal está poco desarrollada para perforar la piel, se pudo constatar sangre en el estómago de estos, posiblemente por su ingesta desde heridas en la piel (Scayola Xamo, 2018). Por otro lado, las hembras de la mayoría de las especies de flebotomíneos necesitan alimentarse de sangre previo a la oviposición. Sin embargo, en algunas especies se ha reportado el fenómeno de autogenia (desarrollo de los huevos sin necesidad de ingestión previa de sangre) en la primera puesta, pero luego la sangre será imprescindible para nuevas puestas a lo largo de su vida (Organización Mundial de la Salud, 2010).

Las áreas mayormente elegidas para alimentarse en el perro son: la piel con poco pelo, (cabeza, hocico, pabellón auricular, áreas inguinales y perianales), y a diferencia de los mosquitos, atacan en silencio (Killick-Kendrick, 1999; Scayola Xamo, 2018).

Al alimentarse se inocula saliva y proteofosfoglicanos en el hospedador, se cree que estos compuestos participan activamente en el establecimiento de *Leishmania* spp. en la piel de los vertebrados. Cabe destacar que la sangre no es la única fuente de alimentación en los flebotomíneos, ya que se han encontrado trazas de néctar de flores. Sin embargo, la ingesta de sangre resulta ser de gran importancia en salud pública y animal ya que podrían ser vectores de otros agentes patógenos (Scayola Xamo, 2018).

Como se mencionó en el ciclo biológico, el tiempo que transcurre entre la ingestión de sangre infectada con amastigotes hasta el momento en que la hembra pueda transmitir los promastigotes mediante la picadura puede ser de cuatro a siete días, variando éste según las diferentes especies de vectores, temperatura, entre otras causas (Organización Mundial de la Salud, 2010).

4.6.4. Comportamiento y actividad del vector

Los flebotomíneos pueden movilizarse en distancias muy cortas, no suelen desplazarse más de 300 metros, por lo que permanecen cerca de los lugares de cría (Muñoz, Berriatua, Ortiz, 2016). Sin embargo, hay trabajos que reportan un desplazamiento con distancias de hasta 3 km, por lo que se puede decir que el riesgo de diseminación de la enfermedad puede ser elevado (Lucientes, Castillo, Gracia, Peribáñez, 2005). Se ha observado que su velocidad de vuelo es de 1 m/s, siendo esta considerablemente inferior a la de los mosquitos, por lo cual, son incapaces de volar cuando la velocidad del viento supera a esta cifra, y esto se traduce como una limitante en la capacidad de dispersión. Debido a que la velocidad del viento aumenta a mayores alturas, se observó que los flebotomíneos suelen volar cercanos al suelo (Scayola Xamo, 2018).

Los flebotomíneos adultos tienen actividad habitualmente crepuscular y nocturna (Ministério da Saúde, 2014), aunque si se los molesta en sus escondites (lugares sombreados, húmedos y que se encuentran protegidos del viento y de predadores naturales) estos pueden llegar a picar durante el día (Scayola Xamo, 2018). A nivel intra y peri domiciliario *Lu. longipalpis* fue encontrada en lugares cercanos a fuentes de alimentos, por ejemplo, gallineros (Ministério da Saúde, 2014). La mayor actividad del vector se ha constatado en temperaturas entre 15 y 28 °C, y humedad del ambiente de 60 y hasta 100 %, esto confirma que su actividad está centrada en periodos nocturnos donde la temperatura desciende y la humedad ambiente se eleva, coincidiendo con el momento de la puesta del sol hasta el amanecer (Lucientes et al., 2005). Se ha visto que en la región Mediterránea y en Asia *Phlebotomus* spp. es mayormente activo durante los meses calurosos, siendo estos desde primavera hasta el otoño; mientras que en América Latina algunas especies de *Lutzomyia* pueden llegar a ser activas durante todo el año (Scayola Xamo, 2018).

4.7. TIPOS DE LEISHMANIOSIS

Como se mencionó anteriormente, la leishmaniosis puede ser causada por varias especies de *Leishmania*, de las cuales algunas son antropofílicas mientras que otras pueden ser zoonóticas. Se calcula que entre 900.000 y 1.700.000 personas se infectan por año, sin embargo, solo una pequeña proporción desarrollará síntomas y en torno de 20.000 a 30.000 fallecerán (Armúa y Venzal., 2019). Las presentaciones más típicas de la enfermedad según las manifestaciones clínicas son: LC que puede ser localizada o diseminada, LMC, y LV (Torres-Guerrero, Quintanilla-Cedillo, Ruiz-Esmenjaud y Arenas, 2017; Armúa y Venzal, 2019), pero las

por la especie de *Leishmania* que se encuentre presente (Figura 3) (González, et al., 2009; Bruschi y Gradoni, 2018).

Leishmania

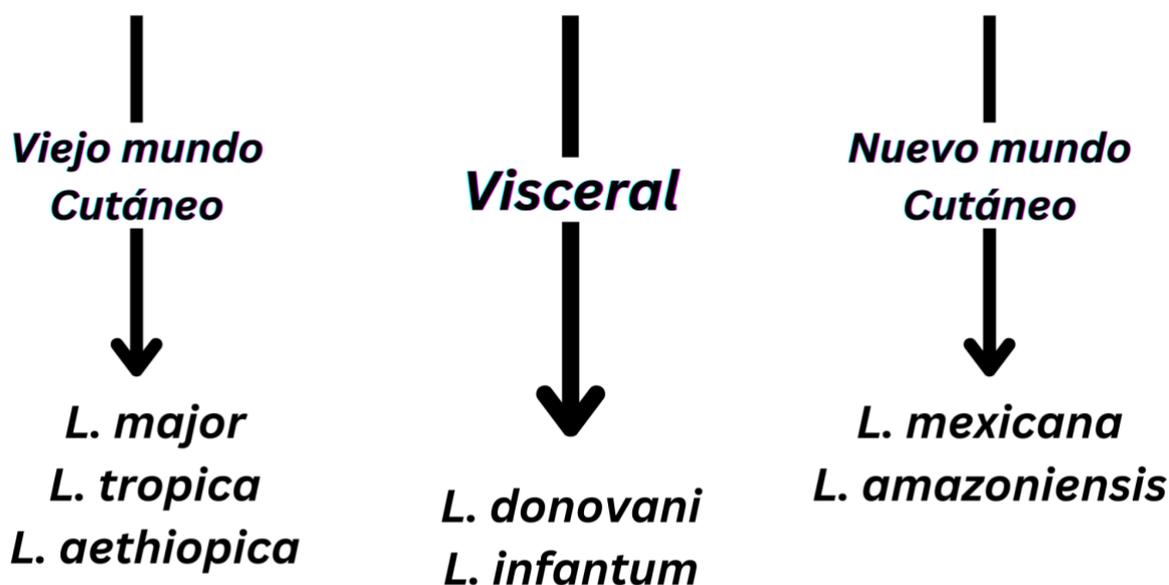


Figura 3. Tipos de leishmaniosis de acuerdo a su distribución geográfica.

La LC tiene diversas presentaciones las cuales incluyen pápulas, nódulos y lesiones cutáneas ulcerativas, que en numerosas ocasiones se puede ver acompañada de infecciones bacterianas secundarias. El avance de las lesiones puede ser lento y mantenerse por varios meses, incluso hasta años ya que está muy vinculada a la especie de *Leishmania* presente, la carga parasitaria y la inmunidad del paciente (Armúa y Venzal 2019). La Leishmaniosis cutánea localizada (LCL) es causada mayoritariamente por *L. tropica* y *L. mexicana*. Este tipo de presentación se va a observar en las zonas del cuerpo que están más expuestas a picaduras, como, por ejemplo: orejas, nariz, labio superior, mejillas, piernas, manos y antebrazos, y tobillos. Esta presentación se caracteriza por un aumento local de temperatura e hinchazón. En el proceso de las lesiones primero aparece una pápula eritematosa asintomática en el lugar de la picadura del vector, de alrededor de unos 10 mm de diámetro. Al cabo de 48 horas la pápula se transforma en vesícula y luego en pústula, la cual al romperse ya sea por un traumatismo por rascado o de forma espontánea, va a dar como resultado una úlcera redondeada con bordes nodulares o gruesos. El proceso luego de haber llegado a la úlcera puede ser muy prolongado, desde 3 a 5 meses, incluso puede durar hasta 20 años. Las lesiones de LCL pueden tardar en curarse espontáneamente hasta 4 años, en la que la curación progresa desde el borde de la lesión hacia el centro (Torres-Guerrero et al., 2017).

Por otro lado, la leishmaniosis cutánea diseminada (LCD) es causada por el complejo *L. mexicana* (*L. amazonensis*, *L. braziliensis* y *L. pifanoi*). Esta forma se caracteriza por ser producida por una falla tanto en la respuesta inmune celular como humoral a

los antígenos del parásito (Gállego y Riera, 2000), permitiendo esto la difusión a través de las vías tisulares, linfáticas y sanguíneas, generando lesiones en la mayor parte de la piel, a excepción del cuero cabelludo y en ciertas circunstancias pudiendo afectar mucosas (Torres-Guerrero et al., 2017). Dichas lesiones se caracterizan por comenzar como nódulos eritematosos duros y placas infiltrativas lisas o verrugosas de color marrón rojizo que pueden ulcerarse y tienen la particularidad de afectar primero en la región de la cara para posteriormente repercutir de forma progresiva a las extremidades, nalgas y mucosas. Las personas afectadas pueden presentar linfedema, linfadenopatía, mal estado general y fiebre. Esta forma clínica es muy difícil de ser tratada ya que no tiene una resolución espontánea y se ha visto un periodo largo de evolución de hasta 20 años (Torres-Guerrero et al., 2017).

Las especies que causan mayoritariamente la LMC pertenecen al complejo *L. braziliensis*, el cual incluye *L. braziliensis*, *L. guyanensis* y *L. panamensis* (Torres-Guerrero et al., 2017). Este tipo de leishmaniosis tiene una presentación de forma crónica y los casos que se han reportado son mayormente en poblaciones de Centro y Sudamérica o en viajeros de otras partes del mundo que hayan visitado zonas endémicas (Armúa y Venzal 2019). Se ha visto que los parásitos que provocan la LCD cuando generan metástasis, muchas veces a partir de lesiones cutáneas primitivas, hacia las mucosas, terminan provocando la LMC (Gállego y Riera, 2000). La presentación de LMC comienza generalmente por una lesión cutánea activa, aunque hay estudios que demuestran que puede haber una presentación tardía debido a una afectación de la mucosa con una duración mayor a 10 años de una LC tratada parcial o directamente sin tratar (Bruschi y Gradoni, 2018).

Las lesiones son provocadas por una invasión y destrucción de la mucosa nasal, oral, faríngea y laríngea, aunque en ciertas ocasiones se pueden extender a la piel de la nariz y labios (Torres-Guerrero et al., 2017; Armúa y Venzal, 2019). La invasión se da de forma lenta y a veces no genera alteración inicial, esto lo que hace es permitir que la lesión de la mucosa pase desapercibida; aunque también en ciertas circunstancias puede provocar solamente un prurito local leve e hinchazón (Torres-Guerrero et al., 2017). Los síntomas clínicos que se producen a nivel de la mucosa oral van desde simples molestias, dolor leve u odinofagia hasta el extremo de poder causar caquexia en los casos que la lesión afecte la totalidad de la faringe, laringe (lo cual puede generar en el paciente ronquera) y el esófago provocando disfagia (Torres-Guerrero et al., 2017; Bruschi y Gradoni, 2018). Cuando a nivel de cavidad nasal la infección es extensa, puede ocurrir la atrofia de los cornetes nasales y la destrucción del tabique cartilaginoso, generando, en casos extremos, la muerte de la persona (Torres-Guerrero et al., 2017).

La LV es generada por una falla en la respuesta inmune de tipo celular y se ha observado que la población de mayor riesgo son los niños, personas en estado de malnutrición y que presenten algún tipo de inmunosupresión (Gállego y Riera, 2000; Torres-Guerrero et al., 2017). Dicha enfermedad es causada por *L. infantum* y *L. donovani* en el viejo mundo y únicamente por *L. infantum* en el nuevo mundo (Bruschi y Gradoni, 2018).

El periodo de incubación de esta presentación es muy variable, ya que puede tener una duración entre 10 días y 24 meses, con un promedio de 2 a 6 meses. La mayoría de las infecciones de LV son asintomáticas, ya que las personas logran desarrollar una respuesta inmune efectiva y debido a esto generalmente no presentan

manifestaciones clínicas; por el contrario, si dicha respuesta es insuficiente, esta infección se vuelve sintomática, siendo las personas más comprometidas las que se mencionaron anteriormente (niños principalmente los menores de 10 años, personas en estado de desnutrición, inmunodeprimidas) (Ministerio de Salud Pública, 2016a). Además, se ha visto que en personas que presentan VIH junto a una infección de LV, se incrementa notoriamente la sintomatología (Gállego y Riera, 2000; Ministerio de Salud Pública, 2016a; Torres-Guerrero et al., 2017)

Los signos clínicos más comunes que se pueden observar en la presentación sintomática de LV son fiebre (constante o irregular), esplenomegalia, pérdida de peso, pérdida de apetito, hepatomegalia (presente o no), malestar, y palidez mucocutánea debido a la anemia presente (Bruschi y Gradoni, 2018; Organización Panamericana de la Salud, 2019). Es una enfermedad en la que si no se trata a tiempo puede tener una elevada mortalidad. Además, se dice que los pacientes que están inmunodeprimidos tienen una presentación más grave e índices de letalidad aumentados (Armúa y Venzal, 2019).

4.8. MANIFESTACIONES CLÍNICAS DE LVC

Las manifestaciones clínicas son muy variadas en la LVC debido a las respuestas inmunitarias de cada animal y a los diversos mecanismos patogénicos. La infección por *L. infantum* genera una enfermedad crónica en los perros, la cual puede llevar a una forma subclínica (asintomática), a una autolimitante leve o a una presentación moderada que al agravarse puede incluso generar la muerte del animal. Por esto, no es correcto utilizar como sinónimos infección y enfermedad clínica, debido a que hay una alta proporción de la población canina que está cursando una infección subclínica (Ministerio da Saúde, 2014; Scayola Xamo, 2018).

Los dos mecanismos patogénicos principales por los cuales se presentan los signos clínicos son, la inflamación granulomatosa no supurativa en lugares donde se produce la replicación del parásito; y, por otro lado, el depósito de inmunocomplejos circulantes (IC) que ocasionan daños en los distintos órganos blanco. Los hallazgos clínicos debidos al primer mecanismo se encuentran en piel, hígado, intestinos, mucosas, entre otros. No obstante, el segundo mecanismo produce lesiones renales, oculares y vasculares principalmente (Scayola Xamo, 2018; Armúa y Venzal, 2019; Borba, et al., 2020).

Como se mencionó anteriormente, la presentación de dicha enfermedad en los caninos puede ser de forma asintomática como también sintomática. En la primera, durante un periodo variado son capaces de controlar o evitar la aparición de lesiones, sin embargo, un cambio en el estado de salud de ese animal puede desencadenar la aparición de signos clínicos. En los perros sintomáticos, las manifestaciones clínicas aparecen rápidamente luego de la infección, y se cree que los animales con enfermedad grave no logran desarrollar una respuesta inmune eficaz (Baneth, Koutinas, Solano-Gallego, Bourdeau y Ferrer, 2008).

En un reporte de casos presentado por Scayola, Supparo, Cedano y Hernández, (2019) mencionan que las manifestaciones clínicas que se atribuyen a la LVC se agrupan en cinco tipos de cuadros clínicos (sistémico, cutáneo, ocular, renal y otras

manifestaciones variables). El cuadro con signos sistémicos incluye adelgazamiento, disminución del sensorio, mucosas pálidas, petequias, disminución del apetito, pirexia y agrandamiento de los linfonódulos palpables. El cuadro cutáneo es constituido por signos de dermatitis descamativa, alopecias, prurito, onicogrifosis, hiperqueratosis nasal y/o podal, úlceras y nódulos. Con respecto al cuadro ocular se evidenció la presencia de blefaritis y conjuntivitis. En el cuadro renal se presentó poliuria/polidipsia. Por último, también se constataron otros cuadros clínicos con manifestaciones inespecíficas como diarrea, vómitos, claudicación, y estornudos. Los signos clínicos más relevantes se pueden visualizar en la Figura (4 y 5)



Figura 4. Manifestaciones clínicas en perros. A, Adelgazamiento, B, Conjuntivitis, C, Onicogrifosis, D y E, Aumento de linfonódulos submandibular y poplíteos. (Scayola, Supparo, Cedano, y Hernández, 2019).



Figura 5. A, epistaxis, B, lesiones cutáneas multifocales. (Baneth, Koutinas, Solano-Gallego, Bourdeau y Ferrer, 2008).

4.9. CONTROL Y PREVENCIÓN

La transmisión de la leishmaniosis al ser mantenida por un sistema biológico muy complejo, en el cual participan el parásito, el flebótomo vector y un reservorio animal, es casi imposible que se logre controlar la enfermedad con una única forma de intervención. Es por esto que para dicho control se debería adoptar un conjunto de estrategias y tratamientos con la intención de minimizar la propagación y el número de casos, basados en medidas aplicadas sobre el vector, reservorio animal, entre otros (Organización Mundial de la Salud, 2010).

Al ser la LV de epidemiología multifactorial, en lo posible se deben tomar medidas para minimizar el gran impacto tanto en la población humana como en la canina, dirigir las acciones principales a los reservorios y sus vectores. Bien es sabido que el control sobre los flebotómíneos es muy complejo debido a su ecología; como por ejemplo los lugares en donde las hembras depositan sus huevos son muy diversos y difíciles de ubicar, tornándose muy complicado la aplicación de productos químicos sobre las formas inmaduras. Por otro lado, se ha comprobado que el uso de insecticidas en paredes y techos de los hogares, así como en lugares de cobijo de animales, ha reducido ampliamente la población de flebotómíneos (Armúa y Venzal 2019). La medida mencionada anteriormente tiene aspectos positivos y negativos, siendo la primera la reducción de la población de los flebotómíneos, y los efectos negativos se deben a que es una medida a corto plazo y las sucesivas aplicaciones tienen grandes limitantes en el costo, pueden ser peligrosas para la salud humana y así como la afectación de especies de artrópodos que no son patógenos (Dantas-Torres et al., 2012). Los perros son considerados los reservorios en las zonas urbanas como suburbanas y, por ende, son los pilares fundamentales a los cuales se debe destinar estrategias de prevención y control (Otranto y Dantas-Torres, 2013).

Dentro de las medidas preventivas que hoy en día se están utilizando para evitar la picadura del *Lu. longipalpis*: 1) Mantener a los perros en el interior de las casas, entre una hora antes del atardecer y una hora luego del amanecer, ya que el vector presenta su mayor actividad en ese periodo. 2) La instalación de mallas mosquiteras está siendo una de las medidas bastante utilizadas para mantener a los insectos alejados tanto de perros como humanos. 3) El uso de insecticidas tópicos en perros con actividad demostrada frente a *Lu. longipalpis*, se pueden aplicar mediante collares, pipetas (*spot-on*), también aerosoles, entre otros (Martínez Carrera, 2012). Los collares impregnados con Deltametrina al 4 % (único principio activo habilitado por el MSP hasta la fecha), actúan liberando gradualmente el insecticida, y obtiene la distribución en el tejido adiposo subcutáneo del animal dentro de 7 a 14 días post colocación. Está documentado que su acción puede durar hasta 6 meses en condiciones óptimas. Los piretroides, como la Deltametrina, tienen una acción tóxica e irritativa sobre los flebotómíneos causando desorientación y muerte, previniendo la alimentación, y, por ende, bloqueando la transmisión de *L. infantum* (Otranto y Dantas-Torres, 2013; Duarte da Fonseca Junior, Lopes Mazzinghy, França, Silva Pinow, y de Sousa Almeida, 2021). Las presentaciones en *spot-on* y aerosol ofrecen un nivel alto de protección, aunque con una duración inferior. Al igual que los collares, *spot-on* y aerosol necesitan algunos días para poder esparcir el insecticida por toda la capa córnea. En contraste, las presentaciones en polvo logran un efecto inmediato, pero

con una duración del efecto insecticida notoriamente menor (Solano-Gallego, et al., 2009).

El rol del veterinario es primordial ya que es la principal fuente de información para los tutores de los perros acerca del correcto uso de los productos, cómo aplicarlos y la frecuencia de aplicación, así como también es crucial para la prevención de la enfermedad (Martínez Carrera, 2012).

Como otra forma de control en algunos países se ha utilizado la eliminación del reservorio, sacrificando a los perros sintomáticos y seropositivos. Esto, por un lado, es inaceptable por parte de los tutores, y además, dicho procedimiento no demostró ser eficaz ya que tal vez otros actores como cánidos salvajes, poblaciones de perros vagabundos u otros animales podrían servir como reservorios de *L. infantum* (Martínez Carrera, 2012; Armúa y Venzal, 2019).

En algunos países, como por ejemplo España y Brasil, se ha implementado como medida terapéutica el uso de fármacos, el cual suele ser paliativo y no curativo debido a que los animales solamente reducen la sintomatología sin generar una curación completa y además pueden presentar recidivas. Cabe destacar que dichos animales mejorarán su calidad de vida durante un tiempo limitado, pero a su vez van a continuar siendo fuente de infección para otros perros e incluso humanos (Solano-Gallego, et al., 2009; Armúa y Venzal, 2019).

4.10. LEISHMANIOSIS EN URUGUAY

En el año 2010, en el Uruguay, fueron hallados dos flebotomíneos machos de *Lu. longipalpis*, los cuales fueron capturados con trampas de luz tipo CDC, uno en el zoológico de Salto y el otro en una casa en Bella Unión, Artigas (Salomón, Basmajdian, Fernández, y Santini, 2011).

Luego de este hecho ocurrido, el 4 de febrero de 2015, se reportó un perro positivo a *Leishmania* sp. en Arenitas Blancas, un barrio residencial con abundante vegetación y alejado unos 3 km al sur de la ciudad de Salto, frente a la costa del Río Uruguay. Días posteriores se trasladó al lugar un grupo integrado por docentes de Facultad de Medicina y Facultad de Veterinaria de la Universidad de la República, los cuales encontraron presente al vector *Lu. longipalpis*, así como también 11 perros infectados con *Leishmania* sp (Satragno et al., 2017). Estos hechos llevaron a un cambio epidemiológico inédito en nuestro país al confirmarse, por primera vez, casos autóctonos de LVC. A raíz de esta situación, se realizó un estudio sobre el abordaje de la emergencia y dispersión de la leishmaniosis en Uruguay y en este contexto, en la ciudad de Salto, mediante un muestreo estratificado se evaluó la población canina utilizando la técnica de inmunocromatografía y el antígeno recombinante rk39 Kalazar Detect Canine Rapid Test (InBios, EE. UU.). El estudio se realizó durante el periodo noviembre-diciembre de 2015 y en total se analizaron 300 perros, de los cuales, se detectaron 3 animales positivos al test de inmunocromatografía (Hernández, 2017; Scayola Xamo, 2018).

Las distintas reglamentaciones sobre LV, en nuestro territorio, han sufrido cambios con el pasar de los años.

A consecuencia de la presencia de reiterados focos de leishmaniosis canina en la ciudad de Salto, se extiende el denominado “estado de emergencia sanitaria” a todo el Departamento de Salto (Ordenanza Ministerial N° 042 del 15 de enero de 2016 y tuvo vigencia por 180 días). Dicha ordenanza exhorta a la población a seguir las recomendaciones de la Organización Panamericana de la Salud y la Organización Mundial de la Salud para la prevención y control de la leishmaniosis, promoviendo el adecuado manejo ambiental y la tenencia responsable de las mascotas, así como también realizar la eutanasia de perros infectados, de acuerdo con el protocolo elaborado por la Facultad de Veterinaria. A su vez, la Comisión Nacional Honoraria de Zoonosis es la encargada de la ejecución de los actos relacionados a esta enfermedad (Ministerio de Salud Pública, 2016a; Scayola Xamo, 2018).

Concluido este periodo, se resolvió prorrogar el plazo de vigencia de la Ordenanza Ministerial N° 42 del 15 de enero de 2016, por un plazo de 180 días, mediante la Ordenanza Ministerial N° 498. También se confeccionó un plan de acción que se encuentra vigente para la prevención y control de la LV, el que contempla diferentes escenarios (Ministerio de Salud Pública, 2016b; Scayola Xamo, 2018). En el año 2021 fue dado de alta la Ordenanza Ministerial N° 1.404 comunicando a todos los propietarios de caninos infectados positivos a la prueba rk39 y que decidan no hacer la eutanasia del animal, teniendo o no síntomas compatibles con leishmaniosis canina, la posibilidad de unirse al programa de seguimiento.

Dicho programa de seguimiento se basa en: colocar y recambiar el collar repelente con Deltametrina al 4 % según el periodo de eficacia, consultar mensualmente al veterinario designado como responsable del control, quien hará la revisión y emitirá un certificado con el resultado de la misma, restringir los movimientos del perro fuera de la vivienda, realizar la castración inmediata del perro sin importar su sexo, la que deberá ser registrada por el veterinario responsable del seguimiento, colocar un microchip y registrar en la base de datos

RENAC, informar de inmediato a la Comisión Nacional de Zoonosis si el perro infectado muere o deja de estar bajo control de su propietario o tenedor por extravío, mantener la limpieza de las áreas cercanas al domicilio (peridomiciliarias) no permitiendo la acumulación de residuos o materia orgánica. Frente a cualquier incumplimiento de la normativa ante dispuesta se retirará del programa de seguimiento al canino y se deberá dar cuenta a la justicia penal de la infracción cometida (Ministerio de Salud Pública, 2021).

4.11. DIAGNÓSTICO

Existen diferentes tipos de diagnóstico que se basan en análisis histopatológicos que buscan demostrar microscópicamente la presencia del parásito, así como también cultivos de este protozooario en medios específicos, la detección de su ADN por PCR o la evidencia de anticuerpos anti-*Leishmania* en suero (Gállego y Riera, 2000).

El diagnóstico clínico-epidemiológico es de gran utilidad, pero no es determinante debido a la variedad y cantidad de signos que se pueden presentar. Igualmente, es necesario para orientar, siempre y cuando se cuente con una anamnesis completa de datos epidemiológicos. Por lo tanto, debe considerarse sospechoso un perro que posea sintomatología compatible con la enfermedad y que se encuentre o haya estado en una zona endémica o considerada de riesgo de transmisión (Scayola Xamo, 2018).

Para un diagnóstico definitivo se va a requerir un abordaje que identifique anomalías clínico-patológicas y un diagnóstico específico (Gállego y Riera, 2000).

En cuanto a la identificación de anomalías clínico-patológicas los hallazgos considerados más comunes, aunque inespecíficos, son los encontrados en suero como hiperproteïnemia, hiperglobulinemia e hipoalbuminemia marcada. En una gran mayoría de casos podría desarrollarse proteinuria y problemas renales progresivos, para luego causar una falla renal a causa de la glomerulonefritis generada por el depósito de inmunocomplejos. Con frecuencia ha sido detectado anemia no regenerativa, de leve a moderada, que puede llegar a ser hemolítica e inmunomediada (Miraballes Ferrer, 2013). En un estudio realizado recientemente por Scayola, M., Cedano, J., Supparo, E., y Hernández, Z. (2024) también se menciona que la hiperproteïnemia e hiperglobulinemia está asociado al incremento de anticuerpos anti-*L.infantum*, en estadios crónicos principalmente y también con la producción de IC circulantes. Por otro lado, la hipoalbuminemia se genera por la extravasación de albúmina al incrementar la permeabilidad inducida por mediadores químicos y por falla renal llevando a una proteinuria.

4.11.1. Pruebas serológicas:

Este tipo de pruebas se basa en la detección de anticuerpos específicos debido a la respuesta inmunitaria humoral que es generada por el animal frente a *L. infantum*. Sin embargo, debemos tener en cuenta que la presencia de anticuerpos no implica que el animal manifieste signos clínicos, y por el contrario, no todos los animales infectados presentan anticuerpos (Iniasta González, 2007).

Existe una gran variedad de técnicas serológicas, como ser, la aglutinación directa (DAT), la inmunofluorescencia indirecta (IFI), inmunocromatografía, la enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), el Dot-ELISA y el western blot. La sensibilidad y la especificidad de cada una de ellas no son dependientes únicamente de las características inherentes a la propia técnica, sino que, en gran medida, dependen del antígeno que sea utilizado (Iniasta González, 2007).

Una de las técnicas diagnósticas más modernas es la inmunocromatografía, la cual presenta grandes ventajas como son la rapidez y la simplicidad para aplicarla. Hoy en día, cada vez se usa más esta técnica en diversos ámbitos como el campo clínico, ya que no se necesita un instrumental específico, así como tampoco costosos reactivos. El fundamento de esta técnica se basa en la migración de la muestra a través de una membrana de nitrocelulosa y la consiguiente unión antígeno anticuerpo (Quinsa, 2023). La técnica inmunocromatográfica más utilizada en estudios de vigilancia epidemiológica para *L. infantum* es la que emplea el antígeno recombinante rk39, el cual está constituido por una cadena de 39 aminoácidos repetidos de una proteína relacionada a la kinesina que es altamente conservada entre las especies de *Leishmania* causantes de LV. Se caracteriza por permitir obtener una alta sensibilidad en perros sintomáticos, pero esta desciende al momento de detectar asintomáticos. En Uruguay, el MSP utiliza como técnica de tamizaje el test Kalazar Detect Canine Rapid (InBios, EEUU) específico del complejo *L. donovani*, que incluye a *L. infantum* y de esta manera permite detectar anticuerpos en el suero canino contra el antígeno de *Leishmania* (Scayola Xamo, 2018; Armúa y Venzal 2019; Gállego y Riera, 2000).

4.11.2. Detección del agente:

El examen citológico permite resaltar la presencia de amastigotes en macrófagos o líquido extracelular luego de realizar una tinción adecuada como May Grunwald-Giemsa (Figura 6). Los amastigotes son pequeños cuerpos intracelulares redondeados u ovalados, de 1,5 a 3 × 2,5 a 6,5 μm de tamaño, que se encuentran en las vacuolas dentro del citoplasma de los macrófagos. No hay flagelo libre. El microorganismo tiene un núcleo relativamente grande y un kinetoplasto que consta de un cuerpo en forma de barra y un cuerpo basal en forma de punto (OMSA, 2021). Las muestras que se utilizan para realizar dicha técnica suelen ser aspirado de médula ósea condrocostal, aspirado de nódulos linfáticos, fracción leucocitaria obtenida de sangre periférica, productos de punción esplénica, biopsia hepática, biopsia del tracto gastrointestinal y líquido pleural (Iniesta González, 2007). En caso de que resulte negativo el estudio citológico, el material que se utilizó se puede conservar y enviar al laboratorio para realizar su análisis mediante PCR (OMSA, 2021).

En el examen histológico es posible poner de manifiesto al parásito mediante cortes de lesiones teñidas con hematoxilina-eosina. En caso de hallar al parásito es factible en asociación visualizar alteraciones compatibles con LVC, representadas por inflamación granulomatosa y/o vasculitis que afectan a diferentes órganos, dermatopatías isquémicas, dermatitis linfoplasmocítica de la unión dermoepitelial, o hiperplasia linfoide del bazo y ganglios linfáticos. Dicho examen se aconseja cuando, a pesar de un estudio citológico negativo, persiste una fuerte sospecha de LVC, especialmente en presencia de dermatitis y en formas cutáneas caracterizadas por lesiones focales. En caso de detectarse alteraciones histológicas como las descritas anteriormente en cortes teñidos con hematoxilina-eosina, pero sin parásitos detectables, se aconseja a proceder con la tinción inmunohistoquímica para antígenos de *Leishmania*. Si este método también da un resultado negativo, puede emplearse una biopsia para análisis genéticos (PCR, secuenciación, amplificación isotérmica mediada por bucle) (OMSA, 2021).

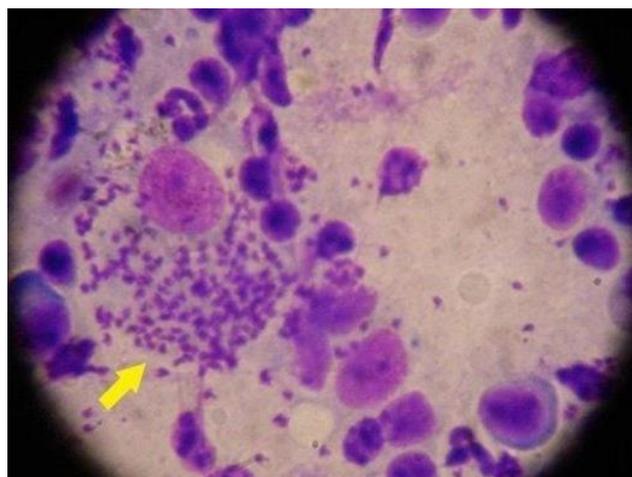


Figura 6. Amastigotes en frotis realizado después de una punción aspiración en clínica señalados con la flecha amarilla (Organización Mundial de la Salud, 2010).

El aislamiento en cultivo es la prueba más específica debido a que el desarrollo de promastigotes vitales en este medio se atribuye solamente al género *Leishmania*. Las muestras que se utilizan para dicha investigación deben ser tomadas de aspirado de ganglio linfático, aspirado de médula ósea, raspados de piel y biopsias de piel (OMSA, 2021). Se trata de una técnica que requiere largos tiempos de ejecución y cierta infraestructura que no todos los laboratorios poseen, por lo que no se utiliza rutinariamente para el diagnóstico más que en laboratorios especializados, pero sí para la caracterización de aislamientos (Iniesta González, 2007). Aún no existe un medio de cultivo universal en el cual sean capaz de crecer todas las *Leishmania*, siendo casi imposible predecir cuál medio es el más apropiado para el crecimiento de una cepa en particular (Iniesta González, 2007; OMSA, 2021). Los medios de cultivo que más se utilizan son los de agar sangre con preferencia el medio Novy, McNeil y Nicolle (NNN) o, en su defecto, el medio sólido de infusión de cerebro y corazón (BHI) o el medio de Tobie modificado por Evans (EMTM). Dichos cultivos se deben mantener entre 24-26 °C, se examinan al microscopio en busca de promastigotes una o dos veces por semana (según el medio escogido) y se subcultivan cada 2 semanas durante tres meses, tiempo tras el cual se descartan como negativos en caso de no visualizar promastigotes (Iniesta González, 2007; OMSA, 2021).

4.11.3. PCR:

En la actualidad, un método que se está utilizando ampliamente para poder detectar agentes patógenos es la PCR la cual tiene la versatilidad de poder ser empleada con diferentes tipos de muestras tanto en humanos como animales. La técnica de PCR se usa para diagnosticar enfermedades infecciosas, observar cambios genéticos que pueden causar una enfermedad, además, encontrar células cancerígenas que podrían pasar desapercibidas en otros tipos de pruebas y estar generando cierta enfermedad en el individuo portador (Asuar, 2007). Asimismo, es una técnica que ha resultado ser muy sensible para la detección de diversos parásitos (Oliveira-Sequeira, Oliveira, Araujo, Amarante, 2005; Soares et al., 2015).

Existen diferentes tipos de PCR que tienen variadas finalidades. El más utilizado es la PCR convencional o a tiempo final la cual se basa en la amplificación de un fragmento de ADN a partir de dos primers. Para la visualización de los productos de PCR (amplicones) se debe realizar una corrida electroforética en un gel de agarosa que separa los fragmentos de acuerdo con su tamaño (peso molecular). Asimismo, se han desarrollado otros métodos para incrementar la sensibilidad y mejorar el diagnóstico como la PCR anidada (PCR-nested), en la que se realizan dos rondas de amplificación consecutivas, la segunda de las cuales utiliza como molde los amplicones producidos en la primera, incorpora primers específicos que amplifican un fragmento de menor tamaño que el generado en la primera ronda. Por último, la PCR a tiempo real (qPCR) permite la cuantificación relativa o absoluta del ADN presente al principio de la reacción (Iniesta González, 2007; Miraballes Ferrer, 2013), siendo esta la principal ventaja respecto a la PCR a tiempo final. Como su nombre lo indica, la amplificación de secuencias de ADN específicas se va generando a medida que avanza la reacción y puede ser visualizada en tiempo real (Mohammadiha et al., 2013).

En leishmaniosis, ciertos trabajos reportan la utilización de la PCR convencional de

forma rutinaria y mientras que otros, basan sus resultados obtenidos con protocolos de qPCR y muchos de estos investigadores han comparado la performance de ambas técnicas (Mohammadiha, et al., 2013).

La PCR es uno de los métodos de mayor sensibilidad (92-98%) y especificidad (100%) para la detección de leishmaniosis en perros teniendo como ventaja la ausencia de interferencias de otros organismos y la posibilidad de automatización de la mayoría de las etapas (Iniesta González, 2007). Sin embargo, no es una técnica utilizada de rutina en perros en zonas endémicas, debido al equipamiento específico necesario para la realización de esta y su alto costo. Pero sí es la técnica más fiable para utilizar con fines de investigación. Por otro lado, en humanos, la PCR se utiliza de rutina en regiones endémicas con propósitos de diagnóstico, estudios epidemiológicos y en el control de donantes de sangre (Martínez Carrera, 2012).

Los primeros estudios llevados a cabo mediante PCR permitieron diagnosticar como positivos gran número de perros que a las técnicas serológicas habían resultado como negativos, pudiendo observar la importancia de detectar estos animales portadores asintomáticos, logrando así resultados más confiables y generando el interés para el uso de la PCR en los estudios epidemiológicos (Iniesta González, 2007; OMSA, 2021).

Peñuela, y Valencia, en el año 2007, mencionan que, muy probablemente, la proporción de portadores asintomáticos de *Leishmania* spp. en la población canina es aún mayor de lo que se ha reportado previamente. Asimismo, es de vital importancia detectar estos animales ya que cumplen un rol en la epidemiología de esta enfermedad. Por ende, la detección precoz de estos animales puede contribuir en el control de la LVC.

Otro punto importante por destacar es que la distribución de *L. infantum* en el organismo es muy variable. En particular, se ha visto que en hospederos asintomáticos hay una parasitemia intermitente, por lo que, la concentración de ADN de este parásito en sangre puede variar significativamente (Le Fichoux et al., 1999).

Por otro lado, hay evidencias de que linfonódulos y médula ósea son órganos donde se acantona por lo que los hacen buenos candidatos para el diagnóstico (Russo et al., 2021).

5. HIPÓTESIS

El tipo de tejido seleccionado para determinar la presencia de *L. infantum* condiciona el diagnóstico de LVC en perros asintomáticos.

6. OBJETIVOS GENERALES Y ESPECÍFICOS

6.1. OBJETIVO GENERAL

Determinar el tipo de muestra más adecuado para realizar un diagnóstico molecular de *L. infantum* en perros asintomáticos positivos al test de inmunocromatografía.

6.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar la presencia de ADN de *L. infantum* en sangre, médula ósea y linfonódulo en perros positivos asintomáticos
- Discernir cuál de los tejidos, ya sea sangre, médula o linfonódulo es el más adecuado para diagnóstico molecular.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1. MUESTRAS

Se utilizaron 20 perros. De cada individuo se evaluaron los siguientes tejidos: médula ósea, linfonódulos y sangre. Las muestras fueron obtenidas de perros asintomáticos que resultaron positivos al test de inmunocromatografía para *L. infantum*, Kalazar Detect Rapid Test (InBiOS International). No fue necesario obtener un protocolo de CHEA ya que las muestras utilizadas en esta tesis fueron previamente extraídas para un experimento anterior y están almacenadas a -20 °C en el Laboratorio de Parasitología del CENUR Salto. Las muestras se obtuvieron utilizando el protocolo “Punción-aspiración de linfonódulos y médula ósea para el diagnóstico de leishmaniosis visceral canina”. Resolución del Consejo del Centro Universitario Regional Litoral Norte de la UdelaR en sesión extraordinaria del 23 de abril de 2020 (Exp. 311170-000297-20).

7.2. EXTRACCIÓN DE ADN Y PCR A TIEMPO FINAL

La extracción de ADN se realizó de forma individual con un kit GeneJET Genomic DNA Purification (Thermo Scientific™, Lituania) siguiendo los protocolos de sangre o tejidos que indica el fabricante. El ADN obtenido fue cuantificado (ng/μl) con un espectrofotómetro NanoDrop One/OneC (ThermoFisher™, Lituania).

Para la detección de ADN de *L. infantum* en los diferentes tejidos se utilizó un protocolo de PCR descrito por (Le Fichoux et al., 1999) utilizando los primers RV1 (5'-CTTTTCTGGTCCCGCGGGTAGG-3') y RV2 (5'-CCACCTGGCCTATTTTACACCA-3') que amplifica una banda 145pb del fragmento LT1 del kinetoplástico. Las condiciones de ciclado fueron las siguientes: desnaturalización inicial, 2 minutos a 94°C, seguidos de 45 ciclos de 60 segundos a 94°C; 90 segundos a 62°C; y 30 segundos a 70°C, la extensión final se realizó a 70°C por 10 minutos. En cada reacción se incluyó un control positivo (ADN de *L. infantum* previamente secuenciado obtenido de un perro sintomático) y un control negativo (agua ultrapura).

Los amplicones resultantes fueron visualizados bajo luz UV luego de una corrida electroforética en un gel de agarosa (NZYTech, Portugal) al 1,5 % que contiene una sustancia intercalante de ADN (GoodView™, China). Debido a que las muestras corresponden a diferentes tejidos y, por lo tanto, tuvieron diferentes concentraciones de ADN genómico total, se realizaron diluciones de las muestras para ajustarlas a la

concentración mínima obtenida. La sensibilidad de la PCR fue evaluada utilizando la misma concentración de ADN genómico en cada una de las muestras.

Las muestras fueron procesadas en la Unidad de Parasitología Veterinaria de Facultad de Veterinaria, Montevideo. Los equipos que se utilizaron fueron un termociclador Mastercycler® (Eppendorf, Estados Unidos) y una cuba de electroforesis My Gel mini™ (Accuris, Estados Unidos).

7.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para cada tejido, se estimó la sensibilidad de la PCR a la detección de leishmaniosis como la proporción de positivos en la muestra, y sus respectivos intervalos de confianza de 95 %. Con el fin de evaluar si la proporción de positivos (sensibilidad) varió a lo largo de los 3 tipos de muestras, se utilizó un el test de homogeneidad Chi-cuadrado, utilizando un nivel de significación alfa menor a 0,05.

8. RESULTADOS

Del total de perros procesados (n=20) se utilizaron para la detección molecular 16 que suman un total de 48 muestras. Cuatro muestras de médula ósea debieron ser desechadas porque hubo dificultades durante la extracción de ADN debido al taponamiento de la columna. Aunque la extracción se repitió una vez más con esas cuatro muestras no se pudo obtener ADN de estas. Los cuatro perros no incluidos se debieron a que se necesitaban tener los tres tipos de muestra por animal, la sangre y linfonódulos se desecharon en este trabajo ya que los resultados no podrían ser comparables. Como se mencionó anteriormente, las muestras que tuvieron mayor problema durante la extracción de ADN fueron las de médula ósea ya que contenían micro coágulos indigeribles lo cual dificultó el filtrado durante las rondas de centrifugación. Se obtuvieron concentraciones dispares de ADN en las diferentes muestras (Tabla 1) con un rango de 3 a 110,6 ng/uL.

La concentración mínima obtenida en las muestras fue de 3 ng/uL, por lo que se ajustó la concentración de cada una de las muestras a 15 ng totales de ADN. Debido a que las muestras tuvieron diferentes concentraciones, se diluyeron las que superaban los 30 ng/uL. Las muestras que tuvieron concentraciones entre 16 y 29 ng/uL se agregó entre 0,9 a 0,5 uL en el mix de PCR.

Debido a la cantidad de muestras, la PCR se realizó en 2 corridas utilizando 24 muestras en cada una (Figuras 7-12).

Para una visualización más clara de las bandas, las muestras fueron ordenadas por el número de perro de la siguiente manera: sangre, médula ósea y linfonódulo.

De las 48 muestras sujetas a PCR, se obtuvieron bandas de tamaño esperado en 31, los 17 restantes resultaron negativas. En la Tabla 2, se detallan los resultados de PCR en cada tipo de muestra. La sangre fue el tipo de muestra que arrojó mayor cantidad de resultados negativos (n=13). Asimismo, las 3 muestras positivas tuvieron bandas muy leves. La médula ósea fue la que obtuvo resultados intermedios siendo 12 positivos y 4 negativos. Por último, las muestras obtenidas de linfonódulos fueron las

que tuvieron la mejor performance ya que el 100 % de las mismas resultaron positivas (n=16).

Tabla 1. Concentración de ADN de las muestras de los distintos tejidos

N° de animal	Sangre (ng/ml)	Médula Ósea (ng/ml)	Linfonódulo (ng/ml)
51	34,3*	24,2	22
58	25,5	7,3	6,8
60	26,3	57,8*	3
74	33,5*	42,7*	22,7
83	22	12	3
85	22	28,3	60,1*
87	28,8	33,3*	20,2
89	20	35,1*	48,1*
90	22,4	25,6	15,6
94	30,9*	5,3	3,3
95	17,6	21,3	3
96	22,5	110,6*	5
97	15	26,7	3,2
98	16,9	100,5*	11,2
99	35,5*	35,2*	3,8
100	31,4*	51,8*	12,6
53# control			4,4
+			

*La concentración de la muestra fue ajustada realizando una dilución 1:10

Control positivo, perro asintomático diagnosticado por citología e inmunocromatografía

Con respecto a la proporción de animales que dieron positivo a PCR, en las muestras de sangre fue el 19 % [IC95%:0-38], en médula ósea el 75 % [IC95%:54-96] y en linfonódulo el 100 %, siendo esta última la muestra más sensible para la detección en animales asintomáticos. Se encontró que no hay homogeneidad en la proporción de positivos a lo largo del tipo de muestra (Test de Homogeneidad; $X^2=24,23$; $gl=2$, valor $p<0.001$), detectando diferencias significativas en la sensibilidad según el tipo de muestra.

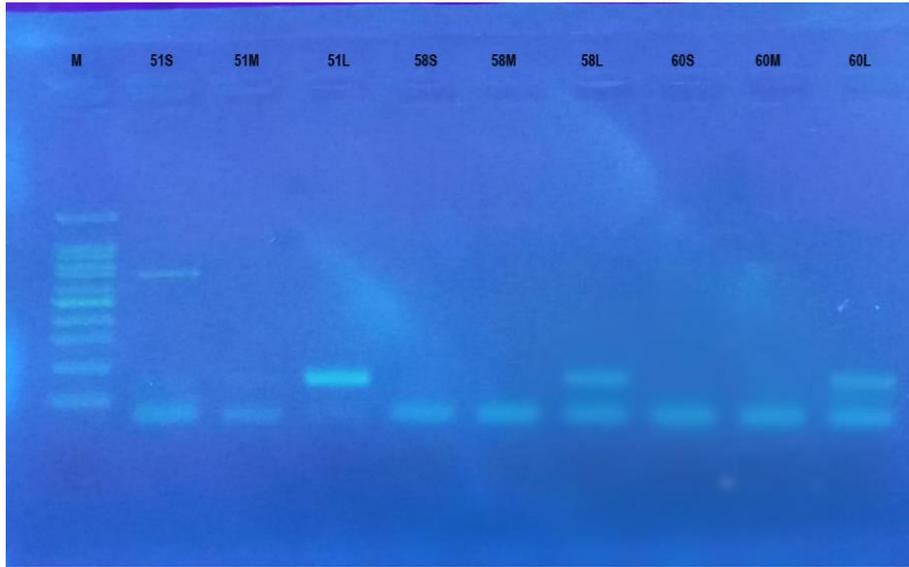


Figura 7. Fotografía del gel de electroforesis mostrando las bandas obtenidas de los tres tipos de tejidos de las muestras 51, 58 y 60, (M: marcador de peso molecular).

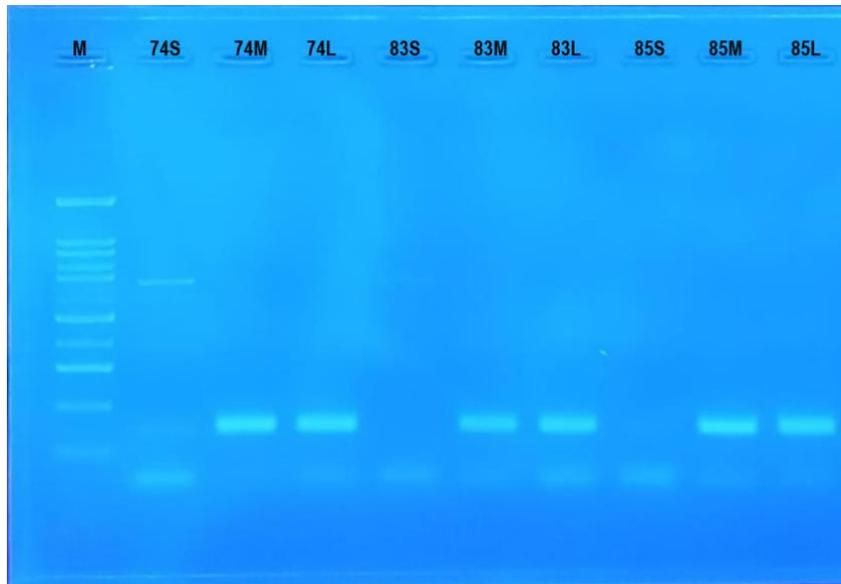


Figura 8. Fotografía del gel de electroforesis mostrando las bandas obtenidas de los tres tipos de tejidos de las muestras 74, 83 y 85, (M: marcador de peso molecular).

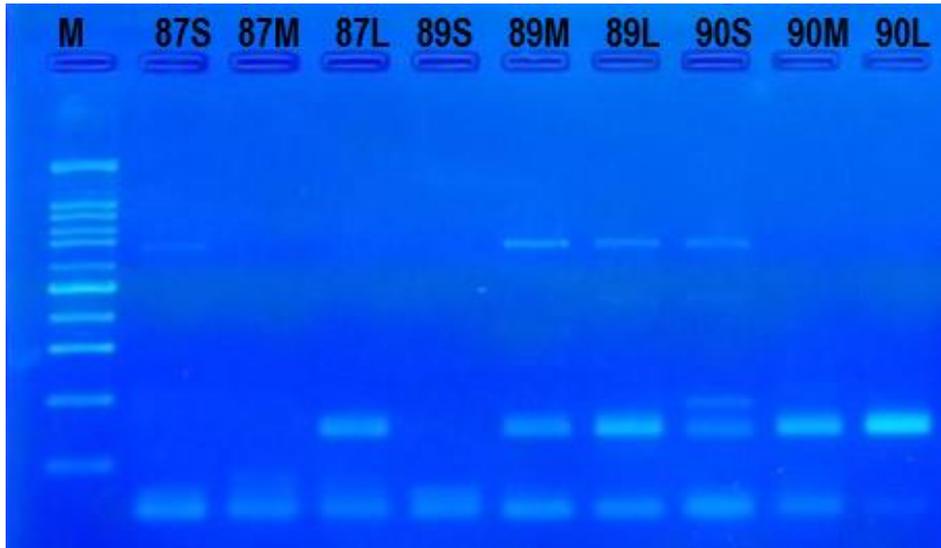


Figura 9. Fotografía del gel de electroforesis mostrando las bandas obtenidas de los tres tipos de tejidos de las muestras 87, 89 y 90, (M: marcador de peso molecular).

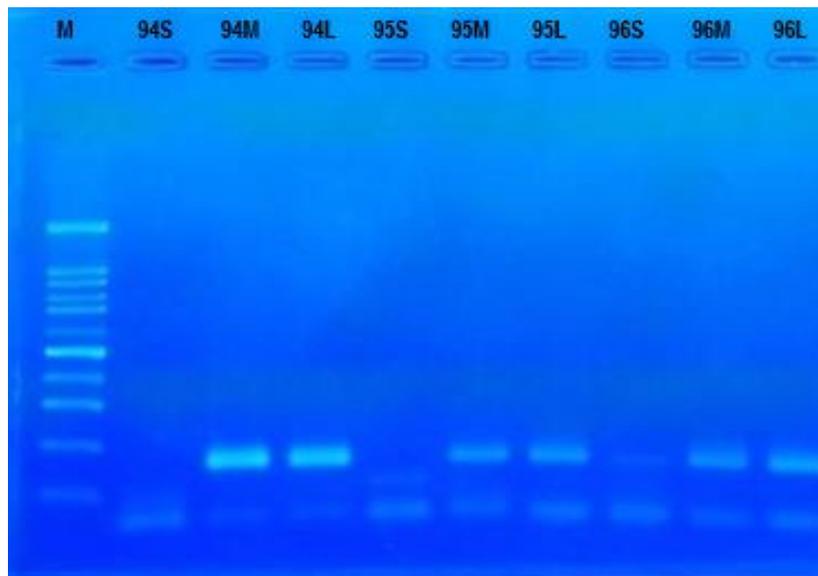


Figura 10. Fotografía del gel de electroforesis mostrando las bandas obtenidas de los tres tipos de tejidos de las muestras 94, 95 y 96, (M: marcador de peso molecular).

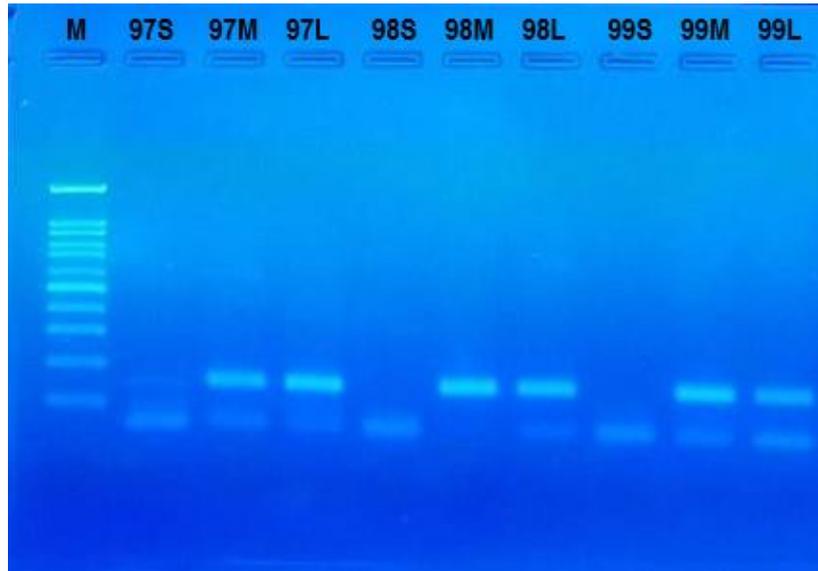


Figura 11. Fotografía del gel de electroforesis mostrando las bandas obtenidas de los tres tipos de tejidos de las muestras 97, 98, 99, (M: marcador de peso molecular).



Figura 12. Fotografía del gel de electroforesis mostrando las bandas obtenidas de los tres tipos de tejidos del animal 100, (M: marcador de peso molecular). C- (control negativo) y C+ (control positivo)

Tabla 2. Total de muestras positivas y negativas a PCR de acuerdo con el tipo de muestra.

Observados	Sangre	Médula ósea	Linfonódulo
Positivo	3	12	16
Negativo	13	4	0
TOTAL	16	16	16

9. DISCUSIÓN

En nuestro trabajo se partió de muestras de perros que resultaron positivos al test de inmunocromatografía. Esta técnica demostró no arrojar falsos positivos ya que en todos los perros analizados se detectó ADN de *L. infantum*. Por ende, es importante destacar que la inmunocromatografía sigue siendo una técnica de tamizaje útil para detectar tanto perros sintomáticos como asintomáticos.

Las muestras utilizadas en este trabajo habían sido almacenadas por un periodo mayor a un año. Algunos protocolos de extracción hacen referencia a la formación de micro coágulos que pueden entorpecer la extracción de ADN obstruyendo la membrana y de esta manera impidiendo el filtrado (Hernandes, Barbas, Dudzik, 2017). Esta podría haber sido la causa por la cual se tuvo dificultades en la extracción con algunas de las muestras de médula ósea (n=4).

El ADN fue eluido en el buffer provisto por el fabricante y éste contiene EDTA. Esto resultó ser la limitante para determinar el volumen máximo de cada muestra a agregar en el mix de PCR. El EDTA es un agente quelante que se une a diferentes iones como calcio y magnesio. Por lo tanto, altas concentraciones de EDTA pueden inhibir la PCR ya que se unen al Mg⁺⁺ e indirectamente afecta la funcionalidad de la polimerasa (Huggett et al., 2008). Por lo tanto, el volumen máximo agregado en cada reacción fue de 5 uL.

Cuando se extrae ADN de una muestra, la mayor cantidad de ADN obtenido corresponde al hospedero y una ínfima parte es del patógeno. Debido a que hubo una gran disparidad en las concentraciones de las diferentes muestras (3 ng/uL - 110,6 ng/uL), se hicieron diluciones para igualar la concentración de ADN genómico total en cada muestra (15ng totales). Con la técnica de PCR convencional utilizada en este estudio fue imposible conocer *a priori* la concentración de ADN del parásito, ya que la limitante que tiene esta técnica es que no se puede establecer la carga parasitaria en las muestras, como sí puede determinarse con protocolos de qPCR (Russo Chagas, Moreira de Avelar, Dolor Marcelino, Fontes Paz y Ferreira Gontijo, 2021).

Esto puede haber sido una de las causas por la cual se vio diferencias en los resultados de PCR en los diferentes tipos de muestras.

Si bien la extracción de sangre es el tipo de muestra más fácil de obtener y menos invasiva ya que la maniobra es rápida y poco dolorosa resultó ser la menos sensible ya que fueron las que arrojaron menor número de PCR positivos. La reducción en la sensibilidad de la PCR utilizada con las muestras de sangre puede ser debida a que las mismas ya partieran de una muy baja carga parasitaria, por lo que no fue capaz de amplificar y obtener una concentración suficiente de amplicones para ser detectada luego de la corrida electroforética. Esto estaría en concordancia con lo que postulan Le Fichoux et al., (1999) quienes mencionan que *L. infantum* circula de manera intermitente en la sangre en hospederos asintomáticos. Por otro lado, en un trabajo realizado por Russo Chagas, Moreira de Avelar, Dolor Marcelino, Fontes Paz y Ferreira Gontijo en 2021 se observó que las muestras de médula ósea y linfonodulo no mostraron una diferencia significativa en la cantidad de ADN de los parásitos, a su vez, el parasitismo en ambos tejidos demostró tener una buena concentración. Debido a esto se considera que, entre estos dos tipos de tejido, el muestreo de linfonódulo es menos invasivo que la extracción de médula para el diagnóstico molecular, resultando ser muy prometedor, a diferencia de lo expresado en nuestro trabajo el linfonódulo si respondió de mejor manera que medula ósea.

Existen muchísimos protocolos de PCR disponibles que tienen diferente sensibilidad y por eso es crucial establecer cuál es el mejor para detectar perros infectados con *L. infantum* en Uruguay. Con respecto a la selección de primers para este trabajo, se utilizaron los reportados por Le Fichoux et al., (1999), ya que se demostró que estos primers detectan el 100 % de perros sintomáticos en muestras de sangre (Lachaud et al., 2002). En nuestro trabajo, queríamos probar si tenían la misma performance con muestras de sangre obtenidas de perros asintomáticos. Lo que se vió es que hubo una disminución marcada en la sensibilidad de estos primers en las muestras de sangre, ya que solo se detectó ADN de *L. infantum* en el 19 % de los animales. En trabajos reportados por Paiva-Cavalcanti, Regis-da-Silva, Gomez (2010) utilizaron sangre periférica de 40 perros con leishmaniosis sintomática (n=25) y asintomática (n=15) para evaluar la diferencia en la performance de una qPCR y una PCR convencional. El resultado de este trabajo demostró una mejor performance de la qPCR sobre la convencional ya que detectó un alto porcentaje de animales asintomáticos en las muestras de sangre frente a un menor porcentaje en la PCR convencional. Asimismo, postulan que la eficacia de PCR convencional puede estar supeditada a la carga parasitaria contenida en las muestras, lo que estaría en concordancia con los resultados observados en nuestro trabajo.

Si bien la cantidad de muestras que se utilizaron en nuestro trabajo puede considerarse pequeña fue suficiente para poder observar diferencias en los resultados de acuerdo con los tipos de muestra. Esto se puede demostrar luego de obtener el resultado, el cual demuestra que linfonódulo fue la muestra que arrojó un resultado 100 % de positividad para la detección de *L. infantum* en animales asintomáticos. Por otro lado, las muestras de médula ósea obtuvieron un resultado intermedio, detectándose sensibilidad al parásito en un 75 %, y por último las muestras de sangre arrojaron un 19 % de sensibilidad para la detección, corroborando así las diferencias significativas obtenidas.

Si bien la OMSA (2021) menciona que tanto médula ósea y ganglios linfáticos son una buena muestra para realizar el diagnóstico molecular, en este trabajo se evidenció que no fue indiferente realizar la PCR en ambas muestras, sino que linfonódulos resultó ser la mejor muestra para la detección en perros asintomáticos.

10. CONCLUSIÓN

Con respecto a la diferencia entre tipo de muestra, linfonódulos resultó ser el tejido más fiable para la detección de ADN de *L. infantum* en perros asintomáticos ya que presentó una sensibilidad de un 100 %, en contrapartida a lo observado en médula ósea y sangre que obtuvieron una sensibilidad de 75 % y 19 %, respectivamente.

11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Santamaría, E., Cabrera, O. L., Avendaño, J., & Pardo, R. H. (2016). Leg loss in *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) due to pyrethroid exposure: Toxic effect or defense by autotomy?. *Journal of Vector Borne Diseases*, 53(4), 317-326.
- Akhoundi, M., Kuhls, K., Cannet, A., Votýpka, J., Marty, P., Delaunay, P., y Sereno, D. (2016). A historical overview of the classification, evolution, and dispersion of leishmania parasites and sandflies. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 10, 1-40.
- Armúa-Fernández, M. T., y Venzal, J. M. (2019). Leishmaniosis: breve puesta al día. *Veterinaria (Montevideo)*, 55(211), 29-36.
- Asuar, L. E. (2007). Guía práctica sobre la técnica de PCR. En L.E. Eguiarte, V. Souza, y X. Aguirre (Eds), *Ecología Molecular* (pp. 517-552). México: LE. INECC.
- Baneth, G., Koutinas, A. F., 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.
- Borba, M., Castro, S., Mojoli, M., y Rodriguez, A. (2020). Situación actual de la Leishmaniosis en el Uruguay. *Salud Mil*, 39(1), 20-34.
- Bruschi, F, y Gradoni, L. (2018). *The leishmaniases: old neglected tropical diseases*. Cham: Springer.
- Dantas-Torres, F., Solano-Gallego, L., Baneth, G., Ribeiro, V.M., de Paiva-Cavalcanti, M., y Otranto, D. (2012). Canine leishmaniosis in the Old and New Worlds: unveiled similarities and differences. *Trends in Parasitology*, 28, 531-538.
- Duarte da Fonseca Junior, J., Lopes Mazzinghy, C., França, E. C., Silva Pinow, A. C., y de Sousa Almeida, K. (2021). Leishmaniose visceral canina. *Pubvet*, 15(3). <https://doi.org/10.31533/pubvet.v15n03a779.1-8>.
- Gállego, M., y Riera, C. (2000). *Las leishmaniosis humanas: leishmaniosis autóctona por Leishmania infantum*. Recuperado de <https://www.seimc.org/contenidos/ccs/revisionestematicas/parasitologia/leish.pdf>

- González, U., Pinart, M., Rengifo-Pardo, M., Macaya, A., Alvar, J., y Tweed, J.A. (2009). Interventions for American cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, (8). <https://doi.org/10.1002/14651858.CD004834.pub2>
- Hernandes, V. V., Barbas, C., y Dudzik, D. (2017). A review of blood sample handling and pre-processing for metabolomics studies. *Electrophoresis*, 38(18), 2232-2241.
- Hernández, Z. (2017). Consecuencias sociosanitarias directas e indirectas de la inundación: Leishmaniasis visceral americana. En *Compartiendo lecciones aprendidas* (pp. 61-71). Montevideo: Ediciones Universitarias.
- Huggett, J. F., Novak, T., Garson, J. A., Green, C., Morris-Jones, S. D., Miller, R. F., y Zumla, A. (2008). Differential susceptibility of PCR reactions to inhibitors: an important and unrecognised phenomenon. *BMC Research Notes*, 1, 70.
- Iniesta González, L. (2007). *Diagnóstico de la leishmaniasis críptica en el perro. Expresión isotípica e idiotípica de los anticuerpos producidos en distintas fases de la infección* (Tesis de Grado). Universitat de Barcelona.
- Killick-Kendrick, R. (1999). The biology and control of phlebotomine sand flies. *Clinics in Dermatology*, 17, 279-289.
- Lachaud, L., Marchergui-Hammami, S., Chabbert, E., Dereure, J., Dedet, J. P., y Bastien, P. (2002). Comparison of six PCR methods using peripheral blood for detection of canine visceral leishmaniasis. *Journal of Clinical Microbiology*, 40(1), 210-215.
- le Fichoux, Y., Quaranta, J. F., Aueuvre, J. P., Lelievre, A., Marty, P., Suffia, I., ... Kubar, J. (1999). Occurrence of *Leishmania infantum* parasitemia in asymptomatic blood donors living in an area of endemicity in southern France. *Journal of Clinical Microbiology*, 37(6), 1953-1957.
- Lucientes, J., Castillo, J. A., Gracia, M. J., y Peribáñez, M. Á. (2005). Flebotomos, de la biología al control. *REDVET*, 6(8), 1-8
- Martínez Carrera, W. Á. (2012). *Leishmaniasis: Reporte de un caso clínico en Uruguay* (Tesis de grado). Facultad de Veterinaria, Universidad de la República, Montevideo.
- Ministério da Saúde. (2014). *Manual de vigilância e controle da leishmaniose Visceral*. Brasília: Ministério da Saúde. Recuperado de http://bvsm.sau.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_controle_leishmaniose_visceral_1edicao.pdf
- Ministerio de Salud de la Nación. (2010). *Enfermedades infecciosas: leishmaniasis visceral. Guía para el equipo de salud*. Buenos Aires: Ministerio de Salud de la Nación. Recuperado de

<https://bancos.salud.gob.ar/recurso/leishmaniasis-visceral-guia-para-equipos-de-salud>

- Ministerio de Salud Pública. (2016a). *Guía de diagnóstico, tratamiento y control de la leishmaniosis visceral en Uruguay*. Recuperado de https://www.gub.uy/ministerio-salud-publica/sites/ministerio-salud-publica/files/documentos/publicaciones/MSP_GUIA_LEISHMANIASIS_VIS_CERAL_ABRIL_2016%20.pdf
- Ministerio de Salud Pública. (2016b). Ordenanza Ministerial N° 498. Recuperado de <https://www.gub.uy/ministerio-salud-publica/sites/ministerio-salud-publica/files/2018-08/ord%2034%202017%20LEISHMANIASIS.pdf>
- Ministerio de Salud Pública (2021). Ordenanza Ministerial N° 1.404/021. Recuperado de <https://www.gub.uy/ministerio-salud-publica/institucional/normativa/ordenanza-n-1404021-leishmaniasis>
- Miraballes Ferrer, M. C. (2013). *Leishmaniosis: Enfermedad emergente en Uruguay* (Tesis doctoral). Facultad de Veterinaria, Universidad de la Republica, Montevideo.
- Mohammadiha, A., Haghghi, A., Mohebbali, M., Mahdian, R., Abadi, A. H., Zarei, Z., ... Mahmoudi, M. (2013). Canine visceral leishmaniasis: A comparative study of real-time PCR, conventional PCR, and direct agglutination on sera for the detection of *Leishmania infantum* infection. *Veterinary Parasitology*, 192(1-3), 83-90. Recuperado de <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.10.013>
- Muñoz C., Berriatua E., y Ortiz, J. (2016, junio). 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*, España. Recuperado de <https://digitum.um.es/digitum/bitstream/10201/92802/1/Estudio%20preliminar%20de%20los%20factores%20medioambientales%20que%20influyen%20en%20....pdf>
- Oliveira-Sequeira, T. C. G., Oliveira, M. D. S., Araujo Jr, J. P., y Amarante, A. F. T. (2005). PCR-based detection of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* in their natural host *Boophilus microplus* and cattle. *International Journal for Parasitology*, 35(1), 105-111.
- Organización Mundial de la Salud. (2010). *Control de la Leishmaniosis*. Ginebra: OMS. Recuperado de https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/82766/WHO_TRS_949_spa.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Organización Mundial de Sanidad Animal. (2021). *Manual de las Pruebas de Diagnóstico y de las Vacunas para los Animales Terrestres*. Recuperado de

<https://www.woah.org/es/que-hacemos/normas/codigos-y-manuales/acceso-en-linea-al-manual-terrestre/>

- Organización Panamericana de la Salud. (2019). *Manual de Procedimientos para Vigilancia y Control de las Leishmaniasis en las Américas*. Washington: OPS. Recuperado de https://iris.paho.org/bitstream/handle/10665.2/50524/9789275320631_spa.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Otranto, D., y Dantas-Torres, F. (2013). The prevention of canine leishmaniasis and its impact on public health. *Trends Parasitology*, 29, 339-345.
- Paiva-Cavalcanti, M., Regis da Silva, C., y Gomez, Y. (2010). Comparison of real-time PCR and conventional PCR for detection of *Leishmania (Leishmania) infantum* infection: a mini-review. *The Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*, 16(4), 537-542.
- Peñuela, M. H. R., y Valencia, J. A. S. (2007). El diagnóstico de la leishmaniasis visceral canina (*Leishmania infantum*). *Revista Veterinaria y Zootecnia (On Line)*, 1(1), 51-59.
- Quinsa. (2021). *Inmunocromatografía*. Recuperado de <https://quinsa.com.mx/2021/09/24/inmunocromatografia/>
- Russo Chagas, M. U., Moreira de Avelar, D., Dolor Marcelino, A., Fontes Paz, G., y Ferreira Gontijo, C. M. (2021). *Correlaciones entre la carga parasitaria en los tejidos y los signos clínicos comunes en perros infectados naturalmente por Leishmania infantum*. Minas Gerais: Uberlandia.
- Salomón, O. D., Basmajdian, Y., Fernández, M. S., y Santini, M. S. (2011). *Lutzomyia longipalpis* in Uruguay: the first report and the potential of visceral leishmaniasis transmission. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 106, 381-382.
- Santamaría, E., Cabrera, O. L., Avendaño, J., y Pardo, R. H. (2016). Leg loss in *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) due to pyrethroid exposure: Toxic effect or defense by autotomy?. *Journal of Vector Borne Diseases*, 53(4), 317-326.
- 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), 536-538.
- Scayola, M., Cedano, J., Supparo, E., y Hernández, Z. (2024). Leishmaniasis visceral: descripción de los perfiles hematológicos, hepáticos y renales en perros naturalmente infectados con *Leishmania infantum* en la ciudad de Salto, Uruguay. *Veterinaria (Montevideo)*, 60(221), e20246022101.

- Scayola, M., Supparo, E., Cedano, J., y Hernández, Z. (2019). Leishmaniosis visceral: presentación en perros de la ciudad de Salto, Uruguay. *Veterinaria (Montevideo)*, 55(211), 37-46.
- Scayola Xamo, P. (2018). *Evaluación de las manifestaciones clínicas y los perfiles sanguíneos, hepáticos y renales de caninos positivos a leishmaniosis visceral en Salto, Uruguay* (Tesis de grado). Facultad de Veterinaria, Udelar, Montevideo.
- Soares, J. F., Carvalho, L., Maya, L., Dutra, F., Venzal, J. M., y Labruna, M. B. (2015). Molecular detection of *Rangelia vitalii* in domestic dogs from Uruguay. *Veterinary Parasitology*, 210(1-2), 98-101.
- Solano Gallego L, Koutinas A, Miró G, Cardoso L, Pennisi M.G., Ferrer L, ... Baneth, G. (2009). Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniosis. *Veterinary Parasitology*, 165(1-2), 1-18.
- Torres-Guerrero, E., Quintanilla-Cedillo, M.R., Ruiz-Esmenjaud, J., y Arenas, R. (2017). Leishmaniosis: a review. *F1000Research*, 6(750). Recuperado de <https://f1000research.com/articles/6-750>