



FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS
UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS

ESPECIALIZACIÓN EN DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO VETERINARIO

TRABAJO FINAL INTEGRADOR

**“LEISHMANIOSIS CANINA: ESTUDIO DIAGNÓSTICO TRANSVERSAL EN ÁREA
ENDÉMICA DE LA PROVINCIA DE MISIONES, ARGENTINA”**

ALUMNA: María Leila Marín

DIRECTOR: Diego Fernando Eiras

CODIRECTORA: Andrea Dellarupe

FECHA: junio de 2019

ÍNDICE

RESUMEN.....	4
ABSTRACT	5
1. INTRODUCCIÓN.....	6
1.1. Leishmaniasis Visceral Humana en Argentina	6
1.2. Leishmaniosis Canina	7
1.3. Prevalencia y Legislación vigente para Leishmaniosis Canina en Argentina	7
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	8
2.1. El Parásito, denominación histórica	8
2.1.1. Taxonomía.....	8
2.1.2. Morfología	9
2.2. El vector.....	10
2.2.2. Morfología	10
2.2.3. Características Biológicas	10
2.3. Reservorios	11
2.4. Factores de riesgo	11
2.5. Ciclo biológico	12
2.6. Respuesta inmune	13
2.7. Principales alteraciones patológicas	15
2.8. Manifestaciones clínicas	15
3. DIAGNÓSTICO EN ÁREAS ENDÉMICAS	16
3.1. Métodos Directos de Diagnóstico.....	17
3.1.1. Citología	17
3.1.2. Histopatología e Inmunohistoquímica	18
3.1.3. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).....	18
3.1.4. Aislamiento y Cultivo	18
3.2. Métodos Indirectos de Diagnóstico	19
3.2.1. Enzimoimmunoensayo (ELISA).....	19
3.2.2. Inmunofluorescencia indirecta (IFI).....	19
3.2.3. Test serológicos rápidos.....	20
4. CONTROL Y PREVENCIÓN EN LEISHMANIOSIS CANINA	22
5. JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO.....	22
6. OBJETIVOS.....	22
6.1. Objetivo General	22
6.2. Objetivos Específicos	22
7. HIPÓTESIS.....	22
8. MATERIALES Y MÉTODOS	23
8.1. Materiales.....	23
8.2. Metodología de la obtención de muestras	23

8.2.1. Características de los caninos en estudio	23
8.2.2. Técnica de extracción de Médula Ósea	24
8.2.3. Técnica de extracción de sangre	25
8.2.4. Recuperación de los caninos en estudio	25
8.2.5. Acondicionamiento y transporte de las muestras	25
8.3. Métodos Diagnóstico	26
8.3.1. Citología	26
8.3.2. Inmunofluorescencia indirecta	26
8.3.3. Test serológicos rápidos	27
8.4. Análisis estadístico	28
9. RESULTADOS	28
9.1. Análisis de los signos clínicos	28
9.2. Citología de Médula Ósea	30
9.3. Inmunofluorescencia Indirecta	31
9.4. Test serológicos rápidos	31
9.5. Análisis estadístico	32
10. DISCUSIÓN	33
11. CONCLUSIONES	36
12. BIBLIOGRAFÍA	38
13. ANEXOS	48

RESUMEN

La leishmaniosis canina (LC) es una enfermedad causada por protozoarios del género *Leishmania* y transmitida por la picadura de dípteros flebótomos. Afecta al hombre y otros mamíferos, siendo los caninos hospedadores naturales y principales reservorios. El vector más común para la transmisión de LC en Sudamérica es *Lutzomyia longipalpis*. El diagnóstico de LC es complejo y representa un desafío por la diversidad de signos clínicos de aparición heterogénea e inespecífica, las diferentes respuestas inmunitarias de los caninos frente a la infección y la insuficiente sensibilidad y/o especificidad de las técnicas diagnósticas. El objetivo de este trabajo fue evaluar alternativas diagnósticas de LC disponibles en nuestro medio, evidenciando por métodos directos (citología) e indirectos (pruebas rápidas de tres marcas comerciales e inmunofluorescencia indirecta), la presencia de *Leishmania* sp. en caninos de zona endémica de la provincia de Misiones, Argentina. Se trabajó en dos áreas diferentes, la primera en el departamento de Bonpland con 13 caninos domiciliados en viviendas y la segunda en un refugio con 156 perros abandonados en la ciudad de Posadas. Las muestras obtenidas fueron médula ósea y sangre. En ausencia de *gold* estándar, se utilizó inmunofluorescencia indirecta (IFI) a título 160 (IFI-160) como referente de control. De los 169 perros evaluados, 105 (62,1%) tenía al menos un signo clínico compatible con LC; 63 animales (37,2%) fueron positivos a IFI-160 y 30 (17,7%) a la citología. El 90% de los positivos se registró en animales sintomáticos. Las concordancias entre IFI-160 y Kalazar *Detect*TM (Inbios, USA), *FASTest*[®] LEISH (Megacor, Austria) y SNAP Leishmania (Idexx, USA) resultaron entre muy buenas y buenas ($Kappa=0,83$; 0,79 y 0,76 respectivamente). La IFI-160 con la citología tuvo concordancia de grado moderado ($Kappa= 0,44$). Se valoraron los aspectos positivos y negativos de cada técnica diagnóstica como así también el momento más adecuado para su utilización. Todas ellas son complementarias entre sí y no deberían ser utilizadas por sí solas en la toma de decisiones clínicas o sanitarias. Es necesario correlacionar los resultados obtenidos con los datos epidemiológicos, signos clínicos, alteraciones clínico-patológicas y diagnósticos diferenciales para arribar al diagnóstico certero de LC.

Palabras clave: caninos, Leishmaniosis canina, *Leishmania infantum*, Misiones, Argentina.

ABSTRACT

Canine leishmaniasis (LC) is a disease caused by protozoa of the genus *Leishmania* transmitted by the bite of dipteran sand flies. It affects man and other mammals, being canines natural hosts and main reservoirs. In South America *Lutzomyia longipalpis* is the most common vector for the transmission of LC. The diagnosis of LC is complex and represents a challenge in endemic areas due to the diversity of clinical signs, the wide range of nonspecific clinicopathological alterations, the different canine immune responses to infection and the lack of sensitivity and specificity of diagnostic techniques. The main objective of this work was to evaluate the available diagnostic alternatives and to demonstrate the presence of *Leishmania* sp. using direct methods (cytology) and indirect methods (serology from three commercial rapid tests and indirect immunofluorescence), in canines from the endemic area of Misiones, Argentina. Two different areas were studied, the first in the department of Bonpland with 13 canines domiciled in housing and the second in a shelter from Posadas with 156 dogs. The samples obtained were bone marrow and blood. In absence of a gold standard test, the IFI technique was used using title 160 as reference of control. Of the 169 canines evaluated, 105 (62.1%) had at least one clinical sign compatible with LC; 90% of the positive results were recorded in symptomatic animals, among them 63 (37.2%) were positive to IFI-160 and 30 (17.7%) to bone marrow cytology. The concordances between IFI-160 and Kalazar *Detect*TM (Inbios, USA), *FASTest*® LEISH (Megacor, Austria) and SNAP Leishmania (Idexx, USA) were between very good and good ($Kappa=0.83$, 0.79 and 0.76 , respectively). IFI-160 with cytology had moderate agreement ($Kappa= 0.44$). In this work, it was possible to show the positive and negative aspects of each diagnostic technique as well as the appropriate time to apply each one. All of them are complementary to each other and they should not be used independently in making clinical or health decisions. To reach the correct diagnosis of LC it is necessary to correlate the results with epidemiological data, clinical signs, clinicopathological alterations and differential diagnoses.

Key words: canines, canine Leishmaniosis, *Leishmania infantum*, Misiones, Argentina.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Leishmaniasis Visceral Humana en Argentina

Debido a su asociación con la pobreza y los recursos escasos para su control, la Organización Mundial de la Salud (OMS) considera las Leishmaniasis dentro del grupo de enfermedades tropicales zoonóticas desatendidas de alto impacto (siglas en inglés NTDs: *neglected tropical diseases*) (WHO, 2010).

Leishmania infantum se identificó como el agente etiológico involucrado en el primer caso autóctono emergente diagnosticado de Leishmaniasis Visceral Humana (LVH) durante el año 2006 en la ciudad de Posadas, Misiones, en un niño de 8 años. Tiempo después aparecieron 14 casos nuevos dispersos en zonas rurales y comienza a investigarse la transmisión relacionada directamente con caninos enfermos y la presencia de *Lutzomyia longipalpis* como principal vector (Salomón y col., 2008).

Desde el año 2006 al 2011 se han notificado 80 casos de LVH en la provincia de Misiones, con 8 decesos a pesar del tratamiento (Ministerio de Salud de Misiones, comunicación personal). LVH presenta una letalidad que oscila en un 7%, siendo mayor en niños y adultos inmunocomprometidos o coinfectados con VIH (OPS, 2013). A inicios de 2015 se habían registrado 140 casos en humanos en cuatro provincias, y la presencia del vector ya se había detectado en seis provincias del territorio argentino: Misiones, Corrientes, Santiago del Estero y Salta, estando en riesgo de la presencia inminente Formosa, Chaco y el norte de Entre Ríos. En la actualidad, en esta última provincia la enfermedad ya es endémica en muchas ciudades. Como se mencionó anteriormente el vector más frecuente es *L. longipalpis*, pero en Chaco y Santiago del Estero también puede participar *Migonemyia migonei* como vector putativo (Salomón y col., 2008).

El aumento en la incidencia de la LVH y la Leishmaniosis canina (LC) están asociadas a ciertos factores de riesgo de diferente índole que incluyen socio-económicos como la pobreza, el hacinamiento, la falta de higiene, viviendas en estado precario, cría de animales para consumo familiar y acumulo de desechos. También el abandono, la presencia de perros callejeros y el constante transporte de caninos a través de países limítrofes sin control sanitario han provocado un cambio en la epidemiología de la enfermedad que se ha instalado en áreas urbanas y peri-urbanas. Además, ciertos factores ambientales contemporáneos como el cambio climático, la deforestación, la construcción de represas, la ruptura de barreras naturales favorecen la adaptación y la expansión del vector (WHO, 2010).

1.2. Leishmaniosis Canina

Dentro del género *Leishmania*, en América Latina, la especie *L. infantum* es el agente causal de la LVH y la LC, una zoonosis urbana y en expansión constante transmitida por flebótomos (WHO, 2010). Los caninos son hospedadores naturales y principales reservorios de la enfermedad debido a la estrecha relación de convivencia que mantienen los seres humanos (Gramiccia y Gradoni, 2005). Ciertas características propias de los caninos y factores eco-epidemiológicos hacen que la incidencia de la enfermedad sea de gran impacto. Esta susceptibilidad particular favorece una rápida diseminación de la parasitosis entre caninos que participan en el ciclo urbano a través de la picadura de flebótomos hematófagos como vía más común y efectiva de transmisión (Costa, 2008). Aunque menos habituales, otras formas de transmisión alternativas han sido comprobadas como las transfusiones sanguíneas provenientes de donantes infectados (De Freitas y col., 2006), y la transmisión vertical, transplacentaria y transmamaria (Boggiatto y col., 2011) y venérea (Da Silva y col., 2009).

LC es una enfermedad sistémica que puede afectar cualquier órgano, tejido o fluido biológico. El curso de infección es insidioso y crónico (Petters y Sacks, 2006). Una vez que los flebótomos inoculan promastigotes metacíclicos de *L. infantum* en la piel de un canino pueden esperarse periodos de incubación que oscilan desde los 3 meses a varios años dependiendo de la condición inmunológica de cada individuo (Rioux y col., 1979), por esta razón la mayoría de los caninos pueden padecer infecciones subclínicas en un principio (Solano Gallego y col., 2001) aunque esta condición no es necesariamente permanente y factores como inmunosupresión, patologías concomitantes o co-infecciones podrían romper el equilibrio y conducir a la progresión de la enfermedad clínica en perros portadores asintomáticos (Solano Gallego y col., 2009). Esta enfermedad no produce signos clínicos patognomónicos, puede involucrar múltiples órganos y es posible confundirla clínicamente con otras patologías por lo que siempre debería estar presente entre los diagnósticos diferenciales presuntivos del médico veterinario (Bordeau y Groulade, 1988).

1.3. Prevalencia y Legislación vigente para Leishmaniosis Canina en Argentina

Existen escasos estudios de prevalencia de LC en zonas endémicas debido a la sub-notificación de casos. La LC es una enfermedad de notificación obligatoria por el Médico Veterinario y Laboratorista según la Ley Nacional 15.465/60, Decreto PE 3.640/1964, Ley de Policía Sanitaria 3.959/1900, Decreto 27.342/44 y Resolución SENASA 422/2003. En Misiones, durante mayo del 2006 se determinó por combinación de métodos parasitológicos directos e indirectos una prevalencia del

57,3% (63/110) en caninos domésticos de Posadas, identificándose a *L. infantum* como única especie implicada (Acosta, 2013). Posteriormente el Departamento de Zoonosis de Posadas calculó una seroprevalencia aproximada del 36% para caninos que residen en la ciudad a través de un muestreo aleatorio simple en 349 caninos de viviendas elegidas al azar mediante un registro catastral donde 122 animales resultaron seropositivos (Gutierrez, 2009).

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. El Parásito, denominación histórica

Las leishmaniasis pertenecen a un grupo de enfermedades parasitarias, causadas por diferentes especies de protozoos flagelados del género *Leishmania* (Cavalier-Smith, 1998). Morfológicamente son indistinguibles por observación directa (Alvar y col., 2004). El género *Leishmania* fue descrito simultáneamente por Charles Donovan y William Leishman a partir de biopsias viscerales y cutáneas en enfermos de la India (Ross, 1903). Comprende hasta 35 especies, de las cuales 20 son responsables de enfermedades humanas (Fraga y col., 2013). Debido a sus descubridores se otorga el nombre de *Leishmania donovani* al complejo de especies de protozoos (complejo Donovan) y Leishmaniosis Visceral o Kala-azar (del sánscrito: Kala “negra, impura” y azar “fiebre”) a la enfermedad. A nivel mundial, la principal especie implicada en producir LC y LVH es *L. infantum* (*Syn. L. infantum chagasi*) (Alvar y col., 2004).

2.1.1. Taxonomía

El estado taxonómico de las especies de *Leishmania* se encuentra en constante revisión y ha evolucionado debido a los métodos de identificación molecular, izoenzimas y anticuerpos monoclonales que permiten caracterizar detalladamente todas las especies (WHO, 2010) (Tabla 1). Recientemente, se ha estudiado la presencia de genes específicos que codifican proteínas de choque térmico (sHSP) y son indispensables para supervivencia del parásito. El gen HSP70-II, es común entre varias especies de *Leishmania*. Está implicado en numerosos procesos celulares y su falta es causa de anomalías en promastigotes. Sin embargo, aún se encuentra en discusión cuáles serían los dianas genéticos más adecuados para definir una especie en particular y establecer nuevamente una taxonomía más sólida y segura (Fraga y col., 2010).

Tabla 1. Clasificación taxonómica de *Leishmania infantum* (NCBI: Taxonomy ID:5671)

TAXONOMÍA	
Phylum	Euglenozoa
Clase	Kinetoplastea
Orden	Trypanosomatida
Familia	Trypanosomatidae
Género	<i>Leishmania</i>
Subgénero	<i>Leishmania</i>
Especie	<i>Leishmania Infantum</i>

2.1.2. Morfología

Estos protozoos realizan un ciclo biológico heteroxeno, es decir, una parte en el tubo digestivo de un hospedador invertebrado y otra en un vertebrado superior. Por lo tanto, presenta dos morfologías diferentes: promastigotes y amastigotes respectivamente. La forma promastigote (extracelular): es fusiforme, posee un flagelo largo y libre en la región anterior que le permite movilidad, contiene en su interior un núcleo ovalado situado en la región central y un kinetoplasto bastoniforme (Chang, 1956) (Fig. 1). La forma amastigote (intracelular): es pequeña y aflagelada, contiene un núcleo esférico, voluminoso, excéntrico y un kinetoplasto próximo al núcleo de aspecto bacilar (Maia y Campino, 2008) (Figura 1).

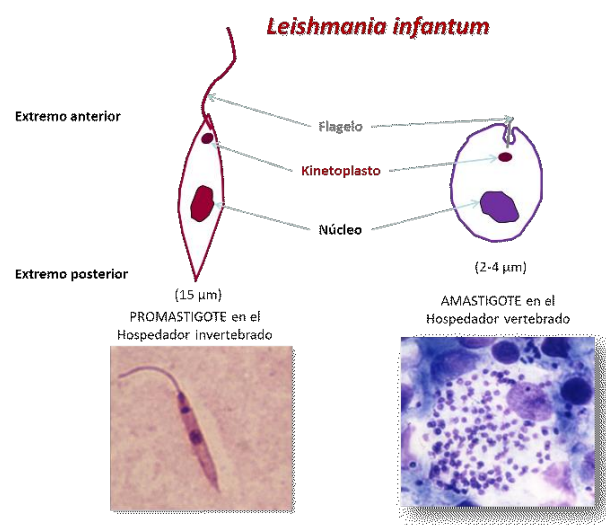


Figura 1. Esquema morfológico de *L. infantum*: a la izquierda como promastigote y a la derecha como amastigote. (Revista Parasitología Interactiva) <http://www.ingenius-learning.com/saluvet/pages/leishmaniafd.html>.

2.2. El vector

Diferentes especies de *Leishmania* son transmitidas por picaduras de hembras hematófagas de alrededor de 93 especies de flebótomos; todas ellas comprenden el género *Lutzomyia* en América y el género *Phlebotomus* en África, Asia y Europa (WHO, 2010). Dentro del género *Lutzomyia*, decenas de especies podrían actuar como vectores. En América Latina se ha descrito a *L. longipalpis* como principal vector para la transmisión de *L. infantum* y por evolución natural como vector putativo y permisivo para otras especies de *Leishmania* como *Leishmania braziliensis* (Salomón y col., 2001).

2.2.2. Morfología

Los adultos de *L. longipalpis* tienen características morfológicas particulares: son muy pequeños (2 a 3 mm) y poseen tórax abultado y cuerpo veloso de color amarillento. Las patas son largas y tienen alas de forma lanceolada (Munstermann, 2005) (Imagen 1).

Imagen 1. Hembra de *Lutzomyia longipalpis* alimentándose. Fuente:

http://www.raywilsonbirdphotography.co.uk/2009-05-20_JS8Q8663-Lu_longipalpis.jpg



2.2.3. Características Biológicas

Los flebótomos presentan adaptaciones a diferentes sistemas ecológicos y se encuentra distribuida en zonas tropicales en una variedad de hábitats, desde áreas rocosas, áridas hasta muy húmedas y boscosas, aunque también se han adaptado a los ámbitos peri domiciliarios urbanos (Galati, 2003). Tienen vuelo corto y zigzagueante; son difíciles de distinguir a simple vista por sus hábitos crepusculares y nocturnos. Sólo las hembras se alimentan de sangre durante la estación reproductiva (Killick-Kendrick, 1999).

La actividad y presencia de los flebótomos adultos está condicionada principalmente por el hábitat (ciudad, rural-periurbano y rural), la temperatura en la superficie del suelo, cobertura vegetal, presencia de animales de cría y deficiencias en el saneamiento público (Laison y Rangel, 2005; Queiroz y col., 2012). *Lutzomyia longipalpis* es la especie más prevalente y estable en áreas rurales-periurbanas por

disponer todos los factores eco-epidemiológicos favorables para la reproducción (Danta-Torres y col; 2014). Estas zonas se denominan “puntos calientes” y sirven como sitios de origen para contribuir con vectores a zonas adyacentes de baja abundancia (Whoolhouse y col., 1997).

La temperatura ideal para su pleno desarrollo varía entre 15 y 28 °C en ausencia de viento y lluvia. En Clorinda (Formosa) se encontró la mayor abundancia de *L. longipalpis* con las estaciones más cálidas que van desde mediados de la primavera hasta los primeros días del otoño (Gomez Bravo y col., 2017). Fuera de este rango, disminuyen los adultos y las larvas permanecen en latencia (Killick-Kendrick, 1999). No se ha comprobado la transmisión transovárica del parásito en los vectores (Bates, 2007).

2.3. Reservorios

El principal reservorio de *L. infantum* es el perro doméstico (*Canis lupus familiaris*). La transmisión aumenta si los caninos se encuentran en contacto con el vector y en estrecha relación con las personas dentro del mismo nicho ecológico (Alvar y col., 2004). Una vez producida la infección, es frecuente que *L. infantum* genere un curso crónico sin manifestación de signos clínicos, pero manteniendo parasitismo cutáneo y oferta de parásitos constante que permite continuar la transmisión vectorial (Ashford, 1996). Todos los caninos son reservorios potenciales porque pueden permanecer infectados por largos periodos de tiempo sin enfermar y aun así ser infectantes para otros flebótomos (Moreno y Alvar, 2002).

Diferentes animales domésticos han sido propuestos como reservorios secundarios del ciclo doméstico en áreas endémicas. El gato (*Felis silvestris catus*) por sus hábitos de vida y afinidad con las personas está siendo estudiado para descubrir su rol principal en la naturaleza que aún no está muy claro. En la Argentina no hay datos publicados al respecto, aunque en Misiones se han reportado casos en felinos (Gomez y Guida, 2010).

2.4. Factores de riesgo

La prevalencia de LC en un área determinada puede estar sujeta a la presencia de ciertos factores de riesgo incluidos en la triada biológica (ambientes, hospedadores y vectores). De los asociados a los caninos se mencionaron el sexo, la raza, fisonomía, antecedentes genéticos, edad y el estilo de vida. La incidencia puede ser mayor en machos que en hembras (Brandonisio y col., 1992) aunque el sexo no es considerado un factor determinante por otros autores (Amelay col., 1995). Entre las razas predispuestas o susceptibles se menciona al Bóxer, Cocker Spaniel Labrador,

Rottweiler y Pastor Alemán. Además, los caninos de pelo corto como el Dachund facilitan el acceso a la ingesta de sangre por los flebótomos (Franca-Silva y col., 2003). La raza Podenco Ibicenco, originaria de las islas Baleares, se considera resistente debido a su condición genética (Solano Gallego y col., 2000). Aunque no sólo esta raza en particular puede ser resistente, también aquellos sin raza definida que poseen genes específicos moduladores de una respuesta inmune protectora a la enfermedad (Palatnik-de-Sousa y Day, 2011).

La edad es un factor de riesgo con características particulares. En numerosos estudios se ha comprobado una distribución bimodal relacionada a la prevalencia de la enfermedad. Tienen mayor riesgo a enfermar los caninos en edades comprendidas entre 1 a 3 años y adultos mayores 8 años en adelante, no obstante, a cualquier edad todo canino puede verse afectado de acuerdo al comportamiento biológico de LC (Dantas-Torres, 2009).

Según el estilo de vida los que habitan fuera de las viviendas y tienen piel desprovista de pelos o zonas alopecicas están más expuestos a las picaduras de los flebótomos y por lo tanto tienen un mayor riesgo de infección en comparación con los que viven dentro y tienen un manto piloso protector (Padilla y col., 2002). También los caninos hacinados en refugios y aquellos que deambulan abandonados en las calles tienen más probabilidades de infectarse por hallarse en pobres condiciones de salud o inmunosuprimidos (Acosta, 2013).

2.5. Ciclo biológico

El ciclo de *L. infantum* es asexual y heteroxeno ya que interviene un hospedador intermediario y otro definitivo donde el parásito cambia su morfología de acuerdo al hospedador donde se encuentre (killick –Kendrick, 1990). Este ciclo se lleva a cabo en un flebótomo hembra que se infecta durante su alimentación al ingerir sangre con las formas amastigotes. En el tubo digestivo del vector ocurre la metacicloogénesis, proceso por el cual los amastigotes se transforman en promastigotes procíclicos, que se multiplican por fisión binaria (agamogonia) y alcanzan la capacidad infectiva en la proximidad de la probóscide como promastigotes metacíclicos, quedando así dispuestos para ser inoculados en la piel de un nuevo hospedador (Molyneux y Killick-Kendrick, 1987) (Figura 2). Una vez que los promastigotes alcanzan los capilares cutáneos, son englobados por el citoplasma de macrófagos tisulares y células dendríticas dentro de una vacuola parasitósfora (fagosoma) que intenta destruirlos a través de enzimas lisosomales (Holzmullery col., 2006). El parásito puede lograr evadir la respuesta inmune y multiplicarse activamente por fisión binaria (Antoine y col., 1990) en grandes grupos de amastigotes hasta que

las células estallan, se liberan y adquieren capacidad para infectar nuevas células alcanzado otros órganos del sistema linfo-hematopoyético como médula ósea (MO), linfonódulos (LN), bazo e hígado entre otros (Baneth y col., 2008). Ciertos factores del hospedador modulan la eficacia de la respuesta inmune. Se ha descrito una amplia gama de respuestas inmunitarias y manifestaciones clínicas en LC. La infección en los perros puede ser subclínica y expresada como una enfermedad auto-limitante o como una enfermedad grave y mortal (Solano Gallego y col., 2009). Los caninos infectados no enfermos pueden desarrollar un largo periodo de incubación con la protección de una respuesta inmune adecuada de tipo celular. Asimismo, durante este periodo de resistencia pueden ser capaces de infectar otros flebótomos a pesar de tener menor carga parasitaria en sangre y sus tejidos, que aquellos que presentaron signos clínicos y enfermaron (Molina y col., 1994). Independientemente de la respuesta inmune que desarrolle un canino infectado, un vector puede alimentarse, adquirir el parásito, inocularlo en otro individuo susceptible y generar un nuevo ciclo de transmisión (Alvar y col., 2004).

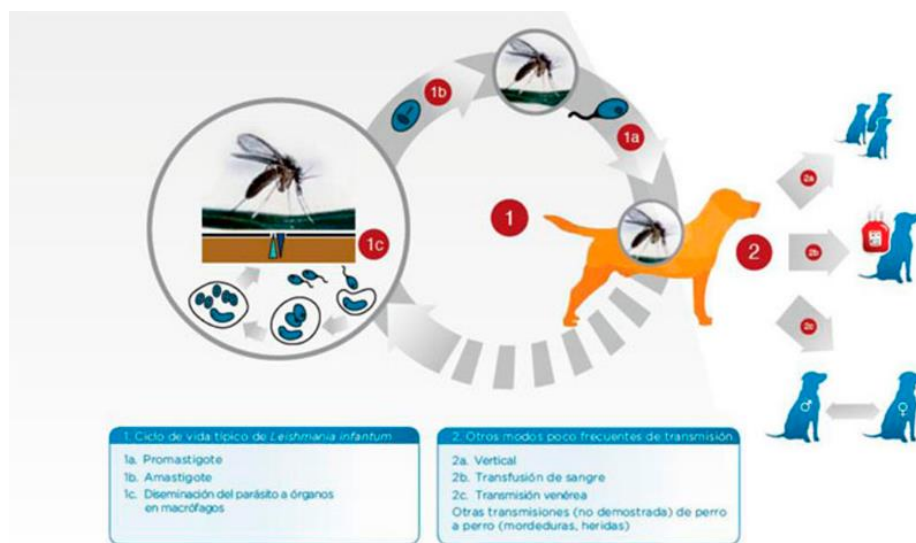


Figura 2. Ciclo biológico de *Leishmania infantum* y sus diferentes vías de transmisión (Solano Gallego y col., 2011).

2.6. Respuesta inmune

La progresión de la enfermedad está ligada a la virulencia del parásito, la dosis infectante inoculada por el vector y las condiciones inmunológicas del hospedador infectado (Alvar y col., 2004).

La respuesta inmune innata comienza cuando el parásito ingresa a través de la epidermis por la picadura del flebótomo. En ese momento se produce una respuesta inflamatoria local que puede pasar desapercibida o provocar una intensa reacción

cutánea granulomatosa o “chancro” (Lombardo y col., 2014). Se estimula localmente la quimiotaxis celular y la puesta en marcha de primera línea de defensa: sistema del complemento, neutrófilos, macrófagos, Linfocitos T $\gamma\delta$ y células *natural killer* (NK) (Teixeira y col., 2006). Estas células atraídas en el punto de inoculación intentarán neutralizar la infección durante las primeras horas. Si la respuesta inmune innata fue exitosa pueden eliminarse hasta el 80 % de los promastigotes (Lewis y Peters, 1977) marcando la diferencia entre la resistencia y la diseminación parasitaria (Ferrer, 2002). Cuando la respuesta celular innata no ha sido suficiente, la infección se establece y los parásitos alcanzan la vía linfática y hematógena para llegar a los LN, bazo, MO y otros órganos (Molyneux y Ashford, 1983). Los macrófagos residentes modulan la respuesta inmune mediante la secreción de citoquinas, además, junto con las células dendríticas, funcionan como células presentadoras de antígeno (CPA) en los LN. En este punto pueden desarrollarse dos respuestas mediadas por linfocitos T asociadas a la resistencia (LTh1) o a la susceptibilidad de enfermar (LTh2) (Baneth y col., 2008). La respuesta inmune adquirida de base celular Th1 es la más adecuada y efectiva donde los linfocitos T CD4+ sintetizan fundamentalmente Interferón- γ (IFN- γ), TNF- α e interleuquina-2 (IL-2); que a su vez activa la función leishmanicida de los macrófagos a través de la producción de óxido nítrico (NO) responsable de la muerte parasitaria intracelular a través de la activación de la enzima óxido nítrico sintetasa (iNOS) (Pinelli y col., 1994; Kaye y col., 2011; Rodrigues y col., 2016). Además, la respuesta protectora Th1 provoca activación de las células T CD8+ (Saporito y col., 2013), que pueden eliminar macrófagos infectados (Kumar y Nylén., 2012). Si prevalece la respuesta inmune de base celular los caninos infectados pueden frenar el avance de la enfermedad clínica y permanecer asintomáticos por largos periodos de tiempo (Ferrer, 2002).

La respuesta inmune de base humoral está mediada principalmente por interleuquina 10 (IL-10), 4, y 13 sintetizados a partir de LTh2. Estas citoquinas intervienen en la regulación negativa y depresión de la respuesta celular de LTh1, y junto con la IL-21 secretada por el L Th folicular promueven la activación de los linfocitos B (LB) y la síntesis de anticuerpos específicos incapaces de contrarrestar al parásito de ubicación intracelular, aunque tienen un papel relevante en la etapa de parasitemia como opsoninas o anticuerpos neutralizantes (Persechino y Oliva, 1986; Fainboim y Geffner, 2011). La sintomatología característica de LC se debe en gran parte al depósito de inmunocomplejos generados en exceso durante este tipo de respuesta inmune (Alvar y col., 2004).

2.7. Principales alteraciones patológicas

La formación de inmunocomplejos, auto-anticuerpos, hiper-producción de anticuerpos e inmunosupresión son responsables de generar la mayoría de los signos clínicos (Koutinas y Koutinas, 2014). Además, la magnitud de las alteraciones observadas en los caninos infectados guarda relación con la tasa de reproducción de amastigotes de *Leishmania* en los tejidos (Saridomichelakis, 2009). Según ciertos hallazgos histopatológicos pueden producirse lesiones inflamatorias no supurativas como por ejemplo hiperplasia epitelial y estimulación de la matriz ungueal con excesivo crecimiento de las uñas (Solano Gallego y col., 2004). También lesiones generadas por infiltración celular en diferentes órganos que incluyen inflamación macrófaga granulomatosa, neutrofílica y linfo-pasmocitaria con hiperplasia reactiva en LN, MO bazo, hígado, intestino, huesos, aparato genital masculino y mucosas (Saridomichelakis, 2009).

2.8. Manifestaciones clínicas

Los signos dermatológicos son los más frecuentes e incluyen el 81-89 %, entre ellos la principal manifestación está dada por la dermatitis exfoliativa no pruriginosa con o sin alopecia. También dermatitis nodulares, papulares, pustulosas y ulcerativas en uniones mucocutáneas en ojos, nariz, labios y genitales (Baneth y col., 2008). Un signo clínico tardío y de carácter crónico es la onicogriposis o excesivo crecimiento de las uñas promovido por la ubicación del parásito en la matriz ungueal (Koutinasy col., 2010).

La linfadenomegalia está presente en el 62-89 % de los caninos sintomáticos y es el segundo signo clínico más frecuente (Baneth y col., 2008) debido a la hipertrofia cortical y medular en respuesta a la infección (Lima y col., 2004).

Las lesiones oculares y perioculares son frecuentes en un 16-81 % de los casos pudiendo llegar a ser la única manifestación clínica en el 15 % de los casos (Baneth y col., 2008) e incluyen uveítis anterior, blefaritis, queratoconjuntivitis común o seca y en menor medida de acuerdo a la progresión hemorragias retinianas, iridociclitis, coriorretinitis, uveítis posterior, glaucoma, desprendimiento de retina y ceguera (García-Alonso y col., 1996).

La anemia y la palidez de las membranas mucosas se presentan por diferentes mecanismos asociados a la pérdida de sangre. Los signos clínicos relacionados son: epistaxis, hematuria y diarrea hemorrágica (Ciaramellaycol., 2005). La caquexia, emaciación y atrofia muscular son muy comunes debido a la polimiositis crónica (Vamvakidis y col., 2000). Los trastornos renales son comunes, y la frecuencia de insuficiencia renal crónica (IRC) es mayor al 50% en estadios avanzados (Cortadellas

y col., 2006) siendo la principal causa de muerte en caninos con LC (Costa y col., 2013).

3. DIAGNÓSTICO EN ÁREAS ENDÉMICAS

En Argentina, la LC es endémica en las provincias de Salta, Santiago del Estero, Formosa, Misiones, Corrientes, Chaco y Entre Ríos, aunque pueden reportarse casos en cualquier provincia (Ministerio de Salud, 2016). La figura 3 representa a este tipo de poblaciones donde la relación entre el comportamiento clínico de la enfermedad y las técnicas diagnósticas es piramidal (Baneth y col., 2008), es decir, siguen un efecto “*iceberg*” donde la punta (naranja) está representada por caninos enfermos, claramente visibles y positivos a cualquier método diagnóstico. En los estratos inferiores (blanco y morado) se encuentra la mayoría de la población infectada y asintomática. En ellos se observa una pérdida progresiva de la sensibilidad de los métodos serológicos y citológicos de diagnóstico, siendo la PCR la única técnica capaz de diferenciar a este nivel la población infectada (banda morada) de la no infectada (banda violeta) (Reis y col., 2006). Se estima que un 90 % de los caninos infectados presentará la condición de “asintomáticos” debido al desarrollo de respuestas inmunológicas adecuadas, manteniéndolos libres de enfermedad durante mucho tiempo e incluso por muchos años (Solano-Gallego y col., 2011). La infección no es sinónimo de enfermedad clínica, punto importante a tener en cuenta durante el proceso diagnóstico (Baneth y col., 2008) que incide en las pautas de control dirigidas a la detección precoz de caninos infectados inclusive antes de la aparición de los signos clínicos.

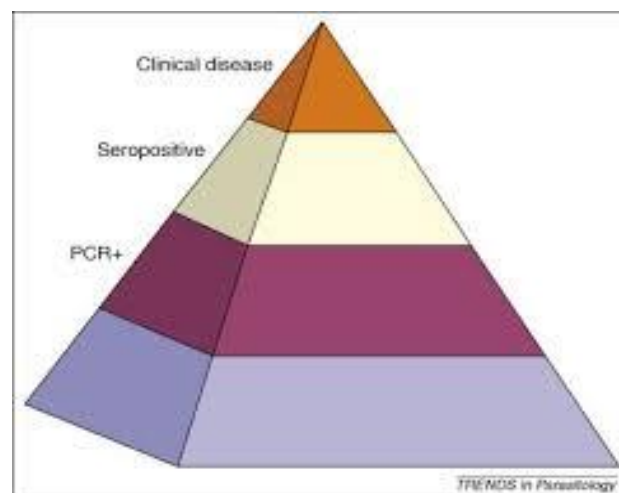


Figura 3. Distribución de LC en la población canina en un foco endémico (Baneth y col., 2008).

A continuación, se detallan los métodos diagnósticos disponibles. En la Tabla 2 se resumen las ventajas y desventajas de cada uno de ellos.

3.1. Métodos Directos de Diagnóstico

Consisten en la identificación del parásito mediante visualización microscópica como citología, histopatología, Inmunohistoquímica, cultivo y aislamiento y xenodiagnóstico; o amplificación del ADN parasitario mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Los resultados positivos a los métodos de diagnóstico directo son muy fiables y presentan elevada especificidad, aunque la sensibilidad puede ser muy variable (Saridomichelakis y col., 2005).

3.1.1. Citología

La identificación parasitaria se realiza a través de la obtención de muestras citológicas, raspajes e improntas de lesiones cutáneas, aspirados de LN, MO, bazo y/o nódulos cutáneos obtenidas de manera más y menos invasiva. Las formas de amastigotas de *Leishmania* tienen afinidad por tinciones metacromáticas de la familia Romanowsky como Giemsa, May-Grunwald Giemsa y Diff-Quick. Al microscopio óptico se visualizan por su morfología libre o dentro de macrófagos. Su presencia en los tejidos puede acompañarse de inflamación mixta con neutrófilos, eosinófilos, macrófagos y plasmocitos o inflamación granulomatosa compuesta principalmente por células mononucleares. Algunas ventajas de este método son el bajo costo, puede realizarse en cualquier clínica veterinaria con sujeción química o física de un ayudante, requiere poco tiempo, escasos materiales y es simple, además mediante la visualización de muestras de piel y MO, otra ventaja es que pueden identificarse o descartarse diagnósticos diferenciales como infecciones secundarias o co-infecciones que exacerban el cuadro clínico y la severidad de los síntomas de LC (Cortese y col., 2006).

La citología presenta una especificidad cercana al 100% ya que la presencia de un sólo amastigote de *Leishmania* es concluyente de infección y no requiere confirmación por otra técnica diagnóstica sobre todo en caninos con sintomatología clínica (Moreira y col., 2007). En contraposición, la sensibilidad varía de 17 a 83 % (Bensoussan y col., 2006) y depende de ciertos factores propios de los caninos, del parásito, del operador y de la técnica. Entre los primeros puede mencionarse que la sensibilidad es mayor en caninos que presentan sintomatología y correlación positiva con la carga parasitaria, que además está condicionada por la afinidad de *Leishmania* en ciertos tejidos como bazo, MO y LN poplíteos donde presenta mayor tropismo que en otros fluidos corporales (Saridomichelakis y col., 2005; Moreira y col., 2007). Otros

factores que impactan sobre la sensibilidad incluyen la cualificación de los operadores que ejecutan la obtención de las muestras, las procesan, observan y emiten resultados. Por último, la calidad de las muestras obtenidas, el número de campos visuales examinados y la experiencia del observador son puntos claves que pueden hacer la diferencia entre un resultado positivo y otro negativo.

3.1.2. Histopatología e Inmunohistoquímica

Los cortes histológicos teñidos con hematoxilina y eosina siempre requieren muestras obtenidas de manera invasiva. Las limitaciones diagnósticas son similares a las citológicas. La observación al microscopio de la histopatología es más dificultosa y depende del tipo de muestra, el corte histológico y la carga parasitaria por lo que la sensibilidad y especificidad es menor que para la citología (Ordeix y col., 2017). Una ventaja es que permite descartar otros procesos patológicos o inferir la presencia de infección por *Leishmania* a través de infiltrados celulares característicos y descartar otras patologías como neoplasias (Koutinas y koutinas, 2014). La aplicación de métodos inmunohistoquímicos es más compleja, costosa y específica ya que colorea y destaca la presencia de parásitos aumentando la sensibilidad en casos donde la carga parasitaria es baja y no se dispone de otros métodos diagnósticos (Moreira y col., 2007).

3.1.3. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Permite amplificar el ADN de *Leishmania* en diferentes muestras obtenidas de manera invasiva (MO, LN, piel, sangre, etc.) y no invasiva (hisopado conjuntival, oral, nasal y orina). Esta técnica tiene una alta sensibilidad y especificidad, pudiendo detectar infección de manera precoz incluso antes de la seroconversión (Coura-Vital y col., 2011). Además, la PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR) es la más utilizada para el diagnóstico y seguimiento post tratamiento a través de la cuantificación de la carga parasitaria en muestras de diferentes orígenes (Pennisi y col., 2005). Como desventaja esta técnica no revela estado el inmunológico ni determina enfermedad. También se han detectado falsos negativos sobre todo en aquellos individuos asintomáticos y falsos positivos por contaminación del ADN durante la obtención de las muestras (Baneth y Aroch, 2008).

3.1.4. Aislamiento y Cultivo

El medio de cultivo más idóneo para *Leishmania* es Novy-McNeal-Nicolle (NNN). Su especificidad es cercana al 100% y la sensibilidad varía según la carga parasitaria de las muestras. Este método no es utilizado de rutina por veterinarios ya

que es una técnica laboriosa y poco eficiente. Los cultivos deben ser observados como mínimo durante de un mes antes de obtener el resultado y en el proceso pueden contaminarse, por este motivo se utilizan únicamente en laboratorios de investigación con fines científicos (Maia y Campino, 2008) y caracterización isoenzimática de especies.

3.2. Métodos Indirectos de Diagnóstico

Los caninos infectados por *L. infantum* desarrollan una concentración de anticuerpos que es dinámica y que con frecuencia se incrementa en el tiempo (Oliva y col., 2006). El diagnóstico serológico comprende: enzimoimmunoensayo (ELISA), Inmunofluorescencia indirecta (IFI) y pruebas serológicas rápidas como los test Inmunocromatográficos (IC). Todos ellos detectan anticuerpos anti-*Leishmania* a partir de suero de manera cuantitativa (IFI y ELISA) o de suero, sangre o plasma de manera cualitativa (IC).

3.2.1. Enzimoimmunoensayo (ELISA)

Es una técnica serológica cuantitativa muy eficiente que utiliza diferentes antígenos como: amastigotes, proteínas recombinantes (rK39) o proteínas purificadas (Solano-Gallego y col., 2014). Consiste en una reacción colorimétrica a través de un método estandarizado en el que interviene posteriormente una lectura espectrofotométrica para cuantificar niveles de anticuerpos específicos. La sensibilidad oscila en un 80-99,5 % y la especificidad 81-100 % (Marcondes y col., 2011). Se han elaborado diferentes variantes de ELISA que son ampliamente aceptados por ser fáciles de utilizar, simples y muy útiles (Cardoso y col., 2004). A pesar de ser una técnica de considerable valor diagnóstico, en Argentina no es el método más difundido (Ministerio de Salud 2016).

3.2.2. Inmunofluorescencia indirecta (IFI)

Es un método de diagnóstico considerado de referencia por la organización mundial de la salud animal (OIE) por su alta sensibilidad y especificidad. Se clasifica como indirecta y cuantitativa porque detecta concentración de anticuerpos anti-*Leishmania* presentes en el suero canino (Deplazes y col., 1995) y es la técnica serológica más aplicada en países endémicos para todos los tipos de leishmaniasis (Gradonni y Gramiccia, 2000).

Como ventajas de esta técnica se destaca su capacidad de cuantificar niveles altos, intermedios o bajos de anticuerpos anti-*Leishmania* en individuos sanos y enfermos respectivamente (Alvar y col., 2004). Se identifica como ventaja que los

títulos elevados de anticuerpos no sólo sugieren la presencia de *Leishmania*, sino que también indican una elevada tasa de reproducción parasitaria en los tejidos, correlacionándose positivamente con caninos enfermos (Reis y col., 2006) (Tabla 2). Sin embargo, la sensibilidad de la detección de anticuerpos es generalmente más baja en infecciones caninas tempranas o asintomáticas 29,4 % versus 90 % en caninos sintomáticos (Mettler y col., 2005) y deben interpretarse con cautela considerando que la seroconversión ocurre en promedio a los cinco meses pos-infección (Moreno y Alvar, 2002). En medicina veterinaria es una técnica de elección ya que utiliza suero como muestra que se obtiene con facilidad. Además, permite monitorear el éxito de una terapia, aunque en Europa es cada vez más frecuente el uso de qPCR con este propósito (Miro y col., 2008).

Una limitante de la IFI es la reacción cruzada con otros protozoos, razón por la cual se deben considerar positivos los títulos de anticuerpos moderados a altos en las áreas donde coexisten más de una especie de *Leishmania* u otros parásitos relacionados como *Trypanosoma* sp. (Eiras y col., 2014). Otra desventaja está asociada a los costos de infraestructura, equipamiento e insumos y a la necesidad de contar con personal calificado para la realización e interpretación de la técnica. Además, el punto de corte de la IFI, su rendimiento y precisión varía entre laboratorios oscilando de 1:40 a 1:360 según la región (Solano-Gallego y col., 2009). Por último, la subjetividad en la lectura, las diferencias entre laboratorios y la falta de estandarización de esta técnica son factores que deberían ser considerados (Gradoni, 2002).

3.2.3. Test serológicos rápidos

Los métodos rápidos son técnicas serológicas cualitativas para la detección de anticuerpos anti-*Leishmania*. Como ventajas podemos mencionar que son muy atractivos y convenientes de utilizar a nivel clínico ya que permiten tomar decisiones en el momento de ser realizados (Gradoni, 2002) y pueden llevarse a cabo por personal con poco entrenamiento. Sin embargo, como desventaja principal proporciona un resultado que puede ser sólo positivo o negativo (Mettler y col., 2005). Además, resultan incapaces de detectar caninos asintomáticos que presentan títulos bajos de anticuerpos produciendo resultados falsos negativos. Se ha estudiado que la sensibilidad de IC oscila alrededor del 30-70 % (Solano-Gallego y col., 2014) y no debería ser utilizada como único método de diagnóstico, siendo ampliamente recomendado contrastar el resultado con una técnica cuantitativa como IFI (Solano-Gallego y col., 2011). Además, también puede observarse una disminución de la especificidad debido a reacciones cruzadas con otros microorganismos como

Trypanosoma cruzi, *Ehrlichia canis*, *Babesia canis*, *Toxoplasma gondii* y *Neospora caninum* (Zanette y col., 2013).

Tabla 2 Ventajas y desventajas de los métodos de diagnóstico comunes para la detección de la infección por *L. infantum* en perros (Solano-Gallego y col., 2011).

TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO	VENTAJAS	DESVENTAJAS
SEROLOGÍA CUALITATIVA (test rápidos)	Prueba rápida en la clínica	Proporciona solo resultado positivo o negativo. Sensibilidades variables y rendimiento con riesgo de falsos negativos. Un resultado positivo debe evaluarse más a fondo mediante una serología cuantitativa Posibles reacciones cruzadas con otros agentes.
SEROLOGÍA CUANTITATIVA (IFAT, ELISA)	Determina el nivel de anticuerpos. Los niveles altos de anticuerpos en presencia de signos clínicos compatibles y / o anomalías clínico-patológicas son concluyentes de leishmaniosis clínica	El rendimiento y la precisión del corte dependerán del laboratorio. Diferencias entre laboratorios y escasa estandarización de las técnicas. Los niveles bajos de anticuerpos requerirán un tratamiento adicional. Posibles reacciones cruzadas con otros agentes.
CITOLOGIA / HISTOPATOLOGIA	Permite la detección directa del propio parásito y el tipo de hallazgos patológicos. Hallazgos patológicos sospechosos de infección. Permite la exclusión de otros diagnósticos diferenciales. Rápido y no invasivo (citología).	Baja sensibilidad para la detección de amastigotes de <i>Leishmania</i> en tejidos o fluidos corporales. Requiere la realización de otras pruebas de diagnóstico como inmunohistoquímica y / o PCR cuando no se visualizan los parásitos. No revela el estado inmunológico del perro. Necesita experiencia.
PCR	Permite la detección de ADN de <i>Leishmania</i> . Alta sensibilidad (kDNA) y especificidad. Cuantificación de carga parasitaria (en tiempo real-PCR).	Posibles resultados positivos falsos debido a la contaminación del ADN. Diferentes estandarizaciones y técnicas utilizadas por los diferentes laboratorios de diagnóstico. No revela estado inmunológico. No se puede realizar como la única técnica de diagnóstico para la confirmación de la enfermedad porque un resultado positivo confirma la infección de <i>Leishmania</i> pero no la enfermedad.
CULTIVO DEL PARÁSITO	Permite el aislamiento de parásitos de <i>Leishmania</i> . Facilita la identificación isoenzimática del parásito.	Técnica de diagnóstico laboriosa. Puede requerir un mes para dar un resultado. Realizado únicamente en laboratorios de investigación.

4. CONTROL Y PREVENCIÓN EN LEISHMANIOSIS CANINA

A nivel internacional, la tendencia para el control de LC se realiza mediante diagnóstico precoz, tratamiento de los caninos infectados, desarrollo y aplicación de nuevas alternativas terapéuticas, el uso de vacunas y la lucha anti-vectorial que implica la disminución del contacto vector-humano. La eutanasia masiva de caninos sospechosos ha sido adoptada durante muchos años por algunos países como método de control sanitario aun habiéndose demostrado la ineficacia de esta medida y su consecuente controversia ética (Dantas-Torres y col., 2012).

5. JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO

Debido a la variabilidad de las manifestaciones clínicas, respuestas inmunológicas y alteraciones clínico-patológicas, el diagnóstico es complejo y dificultoso. Pocos estudios se han realizado hasta el momento para evaluar la concordancia entre las técnicas diagnósticas directas e indirectas. Motivados además por el profundo debate ético sobre el control de la leishmaniosis mediante la eutanasia en América Latina y apuntando a generar conciencia sobre el diagnóstico precoz en caninos como pilar fundamental en las estrategias de control, este trabajo fue planteado para aportar al conocimiento que permita elaborar criterios de diagnóstico (directos: citología de MO; e indirectos: IFI, IC y Dot-ELISA) en caninos de zona endémica de la provincia de Misiones, Argentina.

6. OBJETIVOS

6.1. Objetivo General

Evaluar diferentes técnicas diagnósticas para la detección de LC en muestras de perro obtenidas de manera transversal en zonas endémicas de la Provincia de Misiones, Argentina.

6.2. Objetivos Específicos

- 1- Identificar caninos infectados con *Leishmania sp.* en área endémica de la ciudad de Posadas y en el departamento de Bonpland (Misiones, Argentina) mediante la utilización de diferentes de métodos diagnósticos.
- 2- Evaluar la concordancia entre el diagnóstico citológico y los test serológicos rápidos con la serología por IFI.

7. HIPÓTESIS

- En la población estudiada, la tasa de infección con *Leishmania* es mayor al 30%.
- La IFI es más sensible que la observación citológica de médula ósea y que los test serológicos rápidos.
- La observación directa mediante citología de médula ósea posee buena concordancia con la IFI.
- Diferentes marcas comerciales de test serológicos rápidos muestran una buena concordancia con la IFI.

8. MATERIALES Y MÉTODOS

8.1. Materiales

Siguiendo con las medidas de bioseguridad se utilizaron guantes de nitrilo, camisolín y antiparras. Para llevar a cabo maniobras invasivas se utilizaron bozales, sedantes, máquina para tricotomía, elástico para extracción de sangre, agujas 25/8, jeringas de 5 ml, algodón y alcohol. La sangre extraída se colocó en tubos Khan y el suero obtenido en tubos de 1,5 ml. Las muestras de MO se extendieron en portaobjetos comunes. Para el procesamiento, conservación y transporte también se utilizaron gradillas, centrifugas, cinta de papel, fibra indeleble, bolsas plásticas con cierre hermético, pipetas Pasteur, conservadoras de telgopor y conservantes térmicos.

8.2. Metodología de la obtención de muestras

8.2.1. Características de los caninos en estudio.

Cada canino fue evaluado clínicamente a través de un protocolo estandarizado donde se registró el sexo, la edad, la raza y la presencia de cinco signos clínicos compatibles con LC: condición corporal mala, moderada y buena, linfadenomegalia generalizadas, uni o bilateral de los ganglios mandibulares, pre-escapulares, inguinales y poplíteos, enfermedad ocular (Imagen 2 F), lesiones en la piel como: dermatitis exfoliativas, úlceras, seborrea seca, costras y nódulos cutáneos (Imagen 2 A, C, D y E). También las alteraciones en las uñas son frecuentes e incluyen: exagerado crecimiento, onicorrexia y onicogrifosis (Imagen 2 B). Se consideraron individuos asintomáticos aquellos caninos sin signos clínicos y sintomáticos aquellos con un signo clínico o más.

Imagen 2. Imágenes de caninos de “El Refugio” que muestran los principales signos clínicos de LC.



A) Dermatitis exfoliativa; B) Onicogriphosis; C) Úlcera en unión mucocutánea de la nariz. D) Mala condición corporal, E) Canino con linfadenomegalia generalizada y alteraciones cutáneas, F) Enfermedad ocular: uveítis y opacidad corneal (L. Marín, 2014).

Se realizó un muestreo sistemático para dos poblaciones caninas diferentes. En el departamento Bonpland, sólo pudieron obtenerse 13 muestras debido a la negativa de la población que por diferentes motivos no dio su consentimiento para realizar el diagnóstico de LC en sus mascotas. El segundo grupo evaluado perteneció a “El Refugio”, un refugio de animales abandonados ubicado en la ciudad de Posadas, Misiones (ver ubicación ANEXO I). La población canina de dicho refugio se encontraba hacinada y en condiciones de salud desfavorables, alojados en recintos o a la intemperie. Las edades oscilaban entre los 2 meses y los 10 años de vida.

Luego del examen clínico, a cada canino se le administró una dosis de xilacina como sedante (al 2 % - 0,5 mg/kg), en la vena safena izquierda. Con el animal inmóvil se prepararon las áreas de muestreo mediante tricotomía y antisepsia.

8.2.2. Técnica de extracción de Médula Ósea.

La aspiración de MO se realizó en la unión costo-condral de la octava o novena costilla donde se introdujo una aguja (25/8) atravesando el hueso esponjoso, luego se acopló una jeringa de 5 ml ejerciendo succión desde el émbolo. Una vez que la MO comenzó a fluir en el cono de la aguja se extendieron rápidamente 3 portaobjetos, que

fueron rotulados según el número asignado para cada canino. Las muestras sobrantes se colocaron en tubos de 1,5 ml con EDTA como resguardo. Se obtuvieron 169 muestras. Para la lectura de los frotis coloreados se aplicó un criterio que consistió en observar 300 campos a 1000x con aceite de inmersión de dos muestras distintas por canino. Para asegurar ciertos parámetros de calidad en los frotis se examinó macroscópicamente cada muestra obtenida en cuanto a su consistencia (espesa, muy fluida, viscosa), color (amarillenta, roja, naranja) y cantidad (escasa o abundante). En caso de no obtener la muestra deseada o una punción seca se repitió la maniobra.

8.2.3. Técnica de extracción de sangre

Se obtuvieron 5 ml de sangre de cada canino de la vena cefálica antebraquial izquierda (Imagen 3) o del surco yugular en individuos menores de 10 kg. La sangre fue colocada en tubos de Khan identificados con el número asignado a cada canino. Las muestras insuficientes o hemolizadas se descartaron y reemplazaron por otras de óptima calidad.

Imagen 3. Extracción de sangre periférica en un canino de “El Refugio” (L.Marin, 2014).



8.2.4. Recuperación de los caninos en estudio

Una vez finalizada la extracción de muestras se revirtió instantáneamente el estado de sedación de cada canino utilizando un antagonista del sedante. Todos los caninos muestreados se controlaron por dolor y alteraciones en el ritmo cardíaco. Más tarde fueron trasladados al recinto donde se alojaban.

8.2.5. Acondicionamiento y transporte de las muestras

Las muestras de sangre se transportaron al laboratorio de la Veterinaria del Oeste, Posadas (Misiones). El suero fue separado mediante centrifugación a 3000 rpm en tubos de 1,5 ml rotulados con el número de canino correspondiente. Luego se almacenaron a 4°C hasta su envío al Laboratorio de Inmunoparasitología (LAINPA;

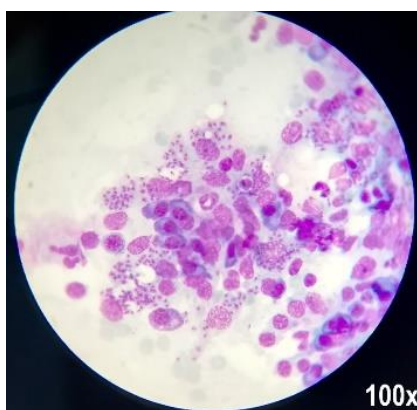
FCV-UNLP) donde se conservaron a -20° C para su posterior procesamiento. Los frotis medulares secos y sin colorear fueron almacenados para su transporte.

8.3. Métodos Diagnóstico

8.3.1. Citología

La citología consiste en colorear los frotis obtenidos con tinciones metacromáticas de tipo Romanowsky como May Grunwald-Giemsa. A continuación, como muestra la Imagen 4, los amastigotes de *Leishmania* presentan afinidades tintoriales específicas que permiten su adecuada visualización con el objetivo de inmersión (100x) a mil aumentos. El procedimiento de la técnica y la interpretación de los resultados se detallan en el ANEXO II.

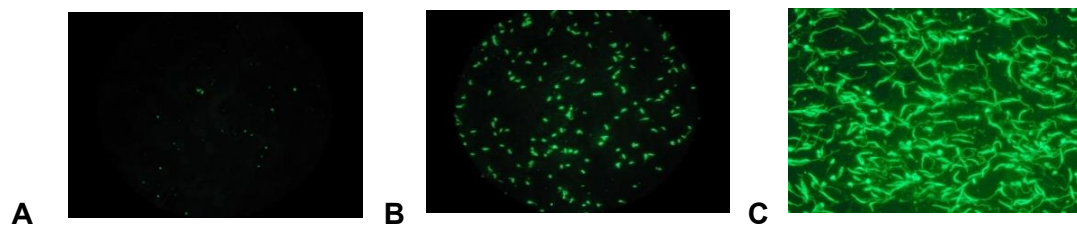
Imagen 4. Amastigotes de *Leishmania* intracelulares y extracelulares.



8.3.2. Inmunofluorescencia indirecta

La IFI es una técnica serológica que permite la titulación de anticuerpos anti-*Leishmania* presentes en el suero canino. Se utilizaron portaobjetos comerciales MegaFLUO® LEISH (Megacor, Austria) con promastigotes de *L. infantum* como antígeno y un conjugado anti-IgG canino marcado con fluoresceína (Sigma). Los sueros obtenidos durante el muestreo fueron procesados siguiendo la metodología estandarizada a las diluciones 1/40, 1/80 y 1/160. Además, se utilizaron controles negativos y positivos (Imagen 5). El procedimiento de la técnica y la interpretación de los resultados se detallan en el ANEXO II.

Imagen 5. Observación de promastigotes de *Leishmania* al microscopio de fluorescencia.



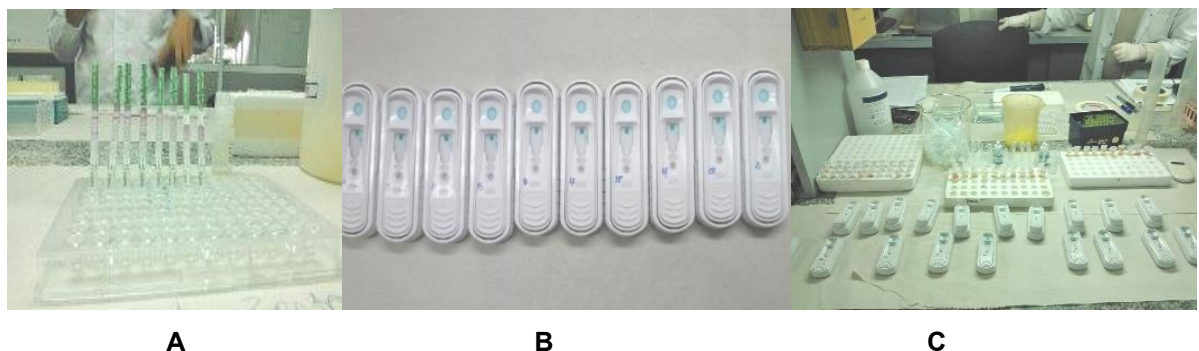
A) Negativo B) Positivo IFI (100x) C) Positivo IFI (400x).

8.3.3. Test serológicos rápidos

Las pruebas rápidas son dispositivos que contienen una membrana de nitrocelulosa en donde se encuentra el antígeno al cual se enfrentará la muestra (sangre entera, suero, plasma, etc.) en determinadas condiciones de reacción. Si bien todas utilizan un principio similar, pueden tener diferente desempeño técnico de acuerdo a las diferencias en el antígeno, el reactivo y el dispositivo provisto por el kit (Imagen 6).

En este estudio se utilizaron tres marcas, Kalazar *Detect*[™] (Inbios, USA) que utiliza un antígeno recombinante (rK39) para detectar anticuerpos anti *L. infantum*. FASTest[®] LEISH (Megacor, Austria) utiliza como antígenos péptidos recombinantes altamente específicos para la detección rápida de anticuerpos anti *L. infantum*, y SNAP Leishmania (Idexx, USA) dispositivo Dot-ELISA que reacciona con la muestra y el conjugado preparado previamente para la detección de anticuerpos anti-*L. infantum*. La interpretación de los resultados se detalla en el ANEXO II.

Imagen 6. Test serológicos rápidos



A) Kalazar *Detect*[™] (Inbios, USA), B) SNAP Leishmania (Idexx, USA), C) Mesa de trabajo con sueros provenientes de Misiones en el LAINPA, FCV-UNLP (L. Marín, 2014).

8.4. Análisis estadístico

Se obtuvo la concordancia entre los métodos diagnósticos aplicados utilizando el software Win Epi (Working in Epidemiology: <http://www.winepi.net/>) mediante la estimación del coeficiente *Kappa* de Cohen, con un 95 % de confianza y utilizando la prueba de IFI a título 160 como referente de control. De acuerdo al valor *Kappa* obtenido, según Landis y Koch (1977), se clasificó la concordancia de las técnicas diagnósticas de manera cualitativa en: débil, moderada, buena y muy buena.

Complementariamente, los resultados de los estudios serológicos se relacionaron con las variables sexo, edad, raza y signos clínicos.

9. RESULTADOS

9.1. Análisis de los signos clínicos

De 169 caninos en estudio 105 (62,1 %) fueron sintomáticos y 64 asintomáticos (37,9 %). En la Tabla 3 se resumen los resultados de la relación entre el Estatus Clínico y las variables de sexo, edad y raza de los animales estudiados. Para cada grupo de caninos se documentaron cinco signos clínicos compatibles con LC: mala condición corporal, linfadenomegalia, signos oculares, cutáneos y ungueales (onicogrifosis). En la Tabla 4 se detalla con qué frecuencia se encontraron los signos clínicos antes mencionados sobre el total de caninos estudiados. Independientemente del origen, de los 105 caninos sintomáticos se encontró que los signos clínicos cutáneos fueron los más prevalentes y estuvieron presentes en 102 (97,1 %) animales. En segundo lugar, la linfadenomegalia se observó en 92 (87,6 %) y en tercer lugar las afecciones ungueales (onicogrifosis) en 58 (55,2 %) caninos enfermos. Siguiendo un orden decreciente, aunque con frecuencias similares los signos oculares y la mala condición corporal estuvieron presentes en 47 (44,7 %) y en 43 (40,9 %) de los caninos evaluados respectivamente.

Tabla 3. Descripción de los caninos según el Estatus Clínico en relación a las variables de origen, sexo, edad y raza.

Origen	Otras Variables	Estatus Clínico		Frecuencia Total
		Sintomático	Asintomático	n (%)
Bonpland				
	Total	5 (38,5)	8 (61,5)	13 (100)
	Sexo			
	Machos	4 (57,1)	3 (42,9)	7 (100)
	Hembras	1 (16,6)	5 (83,4)	6 (100)
	Grupo Etario			
	≤5 años	2 (33,3)	5 (66,7)	7 (100)
	>5 años	0 (0)	1 (100)	1 (100)
	Raza			
	SRD	5 (38,5)	8 (61,5)	13 (100)
	RD	0 (0)	0 (0)	0 (0)
El Refugio				
	Total	100 (64,1)	56 (35,9)	156 (100)
	Sexo			
	Machos	43 (63,2)	25 (36,8)	68 (100)
	Hembras	58 (66)	30 (34)	88 (100)
	Grupo Etario			
	≤5 años	55 (60)	37 (40)	92 (100)
	>5 años	45 (70,3)	19 (29,7)	64 (100)
	Raza			
	SRD	98 (63,6)	56 (36,4)	154 (100)
	RD	2 (100)	0 (0)	2 (100)

RD (Raza Definida), SRD (Sin Raza Definida).

Tabla 4. Frecuencia de los 5 signos clínicos estudiados en caninos sintomáticos de Bonplad y “El Refugio”.

SIGNOS CLÍNICOS	FRECUENCIA N= 105
Alteraciones Cutáneas	102 (97,1 %)
Linfadenomegalia	92 (87,6 %)
Onicogriphosis	58 (55,2 %)
Signos Oculares	47 (44,7 %)
Mala Condición Corporal	46 (43,8 %)

En el Grafico 1 se muestra, según el origen, el porcentaje de los diferentes signos clínicos hallados en cada grupo (Bonpland y “El Refugio”). Se observó que en Bonpland predominaron los signos clínicos cutáneos por sobre los demás y en “El Refugio” los signos clínicos cutáneos y la linfadenomegalia estuvieron presentes en similares proporciones.

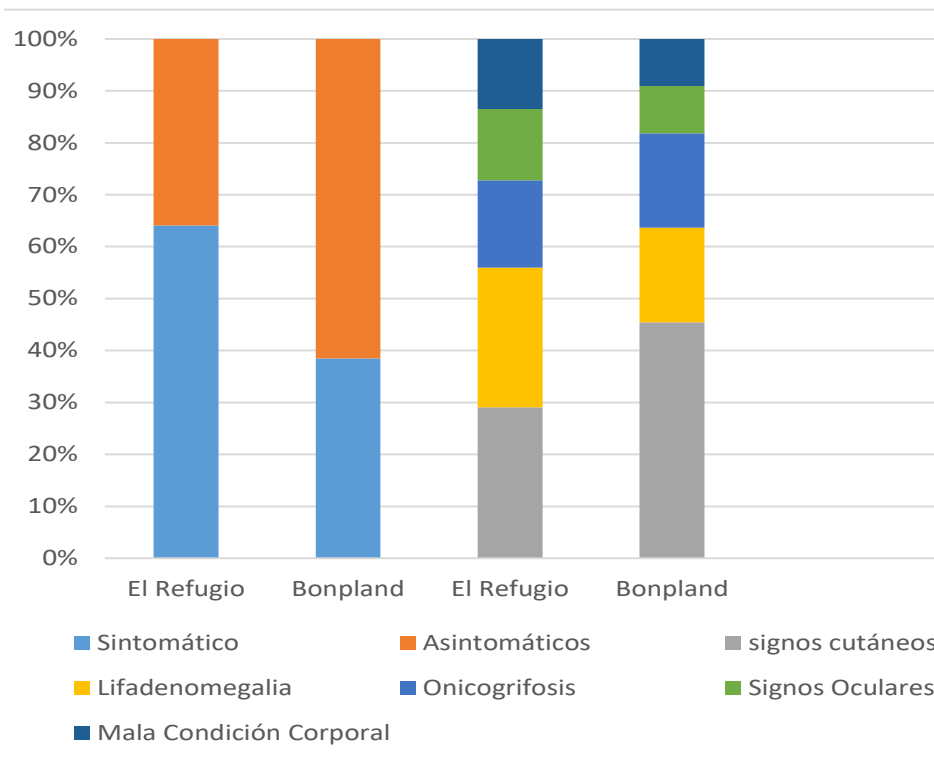


Gráfico 1. Porcentaje del estatus clínico asintomático y sintomático. Asociación entre 5 signos característicos de LC en relación al origen (Bonpland y “El Refugio”).

9.2. Citología de Médula Ósea

De los 169 caninos estudiados se hallaron en total de 30 (17,7 %) individuos positivos para *Leishmania* mediante identificación citológica de amastigotes en MO. 28 caninos positivos eran sintomáticos y sólo 2 asintomáticos. Los signos clínicos predominantes en estos pacientes fueron: signos cutáneos (90 %), linfadenomegalia (83 %), onicogrifosis (56 %), mala condición corporal (53 %) y signos oculares (46 %) pudiendo coexistir más de dos asociaciones de signos clínicos para cada uno de los caninos sintomáticos (Tabla 5).

Cuando se analizaron los datos según el sexo; se encontraron que de los 30 animales positivos 17 fueron hembras y 13 machos; y para la variable “edad” 12 caninos fueron menores a 5 años, 9 tenía entre 5 y 10 años y 8 fueron mayores a 10 años. De los 30 caninos sólo 2 fueron de raza. Según el origen 3 fueron provenientes de Bonpland y 27 de “El Refugio” (Tabla 6).

Tabla 5. Frecuencia de Signos Clínicos hallados en caninos positivos a citología MO.

Signos Clínicos	n° Positivos Citología MO	%
Cutáneos	27/30	90
Linfadenomegalia	25/30	83
Onicogriphosis	17/30	56
Mala Condición Corporal	16/30	53
Oculares	14/30	46

9.3. Inmunofluorescencia Indirecta

De los 169 animales evaluados, 130 (76,9%) fueron positivos a la dilución 1/40, 101 (59,8%) a la dilución 1/80 y 63 perros (37,2 %) fueron positivos a IFI-160. De estos últimos, 57 (90,4 %) presentaron signos clínicos compatibles con LC (Tabla 6).

9.4. Test serológicos rápidos

En la Tabla 7 se muestran los pacientes positivos y negativos en relación a las diferentes técnicas diagnósticas. De las marcas evaluadas *FASTest*® LEISH detectó 72 (42,6 %) caninos positivos. Para *Kalazar Detect*™ se hallaron 70 (41,4 %) y para *SNAP Leishmania* 68 (40,2 %) caninos positivos. Se halló que 62 (88,5 %) de los pacientes positivos a *Kalazar Detect*™ resultaron sintomáticos. De los positivos a *SNAP Leishmania* y *FASTest*® LEISH se encontraron 57 (83,8 %) y 57 (79,1 %) individuos con manifestaciones clínicas. Las variables origen, sexo, raza y edad en relación a las diferentes pruebas serológicas cualitativas se detallan en la Tabla 6. De los 169 caninos estudiados, 55 (32,5 %) resultaron positivos simultáneamente a las tres marcas de kits comerciales utilizadas.

Tabla 6. Frecuencia de caninos positivos a SNAP Leishmania, FASTest® LEISH y Kalazar Detect™, IFI-160 y citología de médula ósea en relación a las variables: origen, sexo, raza y estatus clínico.

Variables	Frecuencia n (%)	SNAP Leishmania	FASTest® LEISH	Kalazar Detect™	IFI-160	Citología+
ORIGEN						
Bonpland	13(7,6)	4(5,9)	4(5,5)	4(5,7)	4(6,3)	3(10,0)
Refugio	156(92,4)	64(94,1)	68(94,5)	66(94,3)	59(93,7)	27(90,0)
SEXO						
Macho	75(44,3)	32(47,1)	32(44,4)	34(48,5)	29(46,0)	13(43,3)
Hembra	94(55,6)	36(52,9)	40(55,6)	36(51,5)	34(54,0)	17(56,7)
G.E						
<5 años	87(5,4)	37(21,8)	37(51,3)	34(48,5)	31(49,2)	12(40,0)
5-10 años	38(22,4)	14(20,5)	14(19,4)	15(21,4)	15(23,8)	9(30,0)
>10 años	43(25,4)	16(23,5)	20(27,7)	20(28,5)	16(25,3)	8(26,6)
S.E.R	1(0,5)	1(1,5)	1(1,4)	1(1,4)	1(1,6)	0(0)
RAZA						
S.R.D	167(98,8)	67(98,5)	72(100,0)	69(98,5)	62(98,3)	30(100,0)
R.D	2(1,2)	1(1,5)	0(0)	1(1,5)	1(1,7)	0(0)
E.C						
Sintomático	105(62,1)	57(83,8)	57(79,1)	62(88,5)	57(90,5)	28(93,3)
Asintomático	64(37,8)	11(16,1)	15(21,0)	8(11,5)	6(9,5)	2(6,7)
TOTAL	169(100)	68(100)	72(100)	70(100)	63(100)	30(100)

G.E: Grupo Etario, S.E.R (Sin Edad Registrada), RD (Raza Definida), SRD (Sin Raza Definida), EC (Estatus Clínico).

Tabla 7. Porcentaje de caninos serológicamente positivos a *Leishmania* sp. en relación a los métodos diagnósticos empleados.

Método	Caninos Positivos (n)	%
Citología MO	30/169	17,7
Kalazar Detect™	70/169	41,0
FASTest® LEISH	72/169	42,6
SNAP Leishmania	68/169	40,2
Tres marcas IC	55/169	32,0
IFI-160	63/169	37,2
IFI-160, 80 y 40	102/169	60,0

9.5. Análisis estadístico

Las concordancias entre IFI-160 y Kalazar Detect™, FASTest® LEISH y SNAP Leishmania resultaron entre muy buenas y buenas ($Kappa= 0.83, 0.79$ y 0.76 respectivamente), mientras que entre IFI-160 y citología de MO se obtuvo moderada concordancia ($Kappa= 0,44$) (Tabla 8).

Tabla 8. Coeficiente *Kappa* calculado a partir de los resultados positivos y negativos de los test rápidos y citología de médula ósea en comparación con los resultados de la prueba de IFI dilución 160, con un nivel de confianza de 95 %.

TEST	IFI 160 +	IFI 160 -	Total	<i>Kappa</i>	Concordancia
Kalazar Detect™ +	60	10	70	0,839	muy buena
Kalazar Detect™ -	3	96	99		
Total	63	106	169		
FASTest® LEISH +	59	13	72	0,791	buena
FASTest® LEISH -	4	93	97		
Total	63	106	169		
SNAP Leishmania +	56	12	68	0,763	buena
SNAP Leishmania -	7	94	101		
Total	63	106	169		
CITOLOGÍA +	27	3	30	0,448	moderada
CITOLOGÍA -	36	103	139		
Total	63	106	169		

Concordancia: valoración cualitativa según Landis y Koch para la interpretación del coeficiente *Kappa*: débil (<0.4) moderada (0,41-0,6), buena (0,61-0,8), y muy buena (0,8-1)

10. DISCUSIÓN

El diagnóstico de LC es complejo, por la diversidad de signos clínicos, el amplio rango de alteraciones clinicopatológicas inespecíficas y las diferentes respuestas inmunitarias de los caninos frente a la infección (Solano Gallego y col., 2011). Sumado a esto último, hasta el momento no existe una prueba *gold* estándar que permita obtener un diagnóstico certero (Solano Gallego y col., 2009).

Para el presente trabajo se realizó el análisis diagnóstico de dos grupos de caninos pertenecientes a la provincia de Misiones (Argentina) teniendo en cuenta el origen, sexo, raza, edad y presencia de signos clínicos. De ellos, la mayoría perteneció a una población hacinada (“El Refugio”) y el resto a una población dispersa (Bonpland).

Desde una visión epidemiológica, y de acuerdo con lo descripto por Baneth y col. (2008), en nuestros hallazgos la punta de la pirámide estaría representada por los caninos con una citología de MO positiva (17,7%), siendo sintomáticos la mayoría de ellos. El 82,3 % restante (con citología negativa) se ubicó en los estratos inferiores siendo seropositivos o seronegativos y presentando alternativamente signos clínicos. Esta pirámide o “efecto *iceberg*” es parte de un punto importante que dificulta el

diagnóstico de LC en una población endémica ya que resulta menos probable identificar caninos infectados y asintomáticos o en apariencia “sanos” pero que también son potenciales reservorios para la transmisión de la enfermedad (Moreno y Alvar, 2002). En este estudio la población hacinada de “El Refugio” estaba compuesta principalmente por caninos abandonados, mestizos y en malas condiciones de salud donde la mayor parte de ellos eran sintomáticos y por tanto con menor dificultad para el diagnóstico de la infección.

Se observó una relación entre el cuadro clínico avanzado y los niveles de anticuerpos. En general, la mayor parte de los perros asintomáticos tenían títulos de anticuerpos bajos ($IFI=40$ u 80) y la mayoría de los sintomáticos poseían títulos de anticuerpos altos ($IFI \geq 160$).

En lo que respecta a las variables edad, sexo y raza no se apreció una asociación en relación a la susceptibilidad de adquirir la infección. Aunque se encontraron individuos enfermos de todas las edades (Dantas torres, 2009), se observó que los animales menores de 5 años y los mayores de 10 años fueron los más vulnerables, coincidiendo con el comportamiento etario bimodal descrito previamente (Alvar y col., 2004). Cuando se analizó la variable sexo, se observó un porcentaje ligeramente mayor de hembras con signos clínicos y resultados positivos (55,6 %); datos similares fueron previamente publicados por Amela y col. (1995). Respecto a la raza de caninos, hasta el momento el Podenco Ibicenco y los mestizos han demostrado ser las más resistentes a la enfermedad (Solano-Gallego y col., 2000). Sin embargo, esta variable no pudo evaluarse en el presente trabajo dado que 167 animales (98,8%) fueron mestizos y sólo 2 (1,2%) de raza.

Si bien en este estudio no fue valorado el estilo de vida, esta es una variable importante. Se ha descrito que la mayor densidad de caninos dentro de recintos pequeños y a la intemperie, haría que se encuentren más expuestos a la picadura de los flebótomos (Solano-Gallego y col., 2009; Alonso y col., 2010; Padilla y col., 2002), como sucede en los caninos de “El Refugio”. Aunque también otros autores consideran más importante la biología del vector (Whoolhouse y col., 1997).

En relación a las manifestaciones clínicas, las alteraciones dermatológicas fueron las más prevalentes, estando presentes en más del 97 % de los caninos afectados; la linfadenomegalia se encontró en el 87,6%, lo que se correlaciona con datos previamente publicados por Baneth y col. (2008) y Lima y col. (2004). La onicogriposis, los signos oculares y la mala condición corporal afectó al 55, 46 y 44 % de los caninos estudiados respectivamente (Koutinas y col., 2010; García-Alonso y col., 1996; Vamvakidis y col., 2000). Las frecuencias de los signos clínicos observados concuerdan con los mencionados por la bibliografía consultada. Si bien la pérdida de

peso es un signo muy prevalente en caninos con LC (Ciaramella y col., 1997), en “El Refugio” nos encontramos con la dificultad de no poder evaluar con precisión esta variable debido a la pérdida de peso por otras causas además de la LC.

En los resultados de las citologías de MO se identificaron amastigotes de *Leishmania* en 30 de 169 animales (17,7%), donde más del 90% de los animales muestreados presentaron al menos un signo clínico compatible con LC, confirmando que la especificidad fue alta y la sensibilidad variable según ciertos factores como la carga parasitaria, la calidad de la muestra y la experiencia del observador (Saridomichelakis y col., 2005). La cantidad de amastigotes observados en muestras de MO de animales sin sintomatología de LC generalmente es muy baja, por lo que se considera que en caninos con infección subclínica no es la técnica de elección (Otranto y col., 2009).

En lo referente al sitio de muestreo según ciertos autores como Moreira y col. (2007) sugieren que los LN son excelentes puntos de acceso a la obtención de muestras citológicas ya que en comparación con la MO resultan muestras menos invasivas, requieren mínima sujeción y se obtienen similares resultados. Un dato interesante hallado en el presente estudio fue que el 83,3 % (25/30) de los caninos positivos a MO presentó linfadenomegalia pudiendo sugerir que los LN (especialmente los LN poplíteos), podrían haber sido un sitio de muestreo alternativo adecuado para la obtención de muestras. En adhesión, otros investigadores hallaron una sensibilidad mayor en LN que en MO en caninos sintomáticos y 100% de especificidad para ambas técnicas (Saridomichelakis y col., 2005).

La IFI ha sido la prueba de referencia recomendada por la OIE (Gradoni y Gramiccia, 2000) debido a su alta sensibilidad y especificidad. Es una prueba muy útil para estudios seroepidemiológicos, detección de casos clínicos y monitoreo terapéutico. El título de corte varía entre 40 y 360 según el laboratorio y la región (Solano Gallego y col., 2009). En Argentina, el Ministerio de Salud ha sugerido la dilución positiva 1/160 o mayor como indicativa de la presencia de altos niveles de anticuerpos. La realización de la técnica IFI presenta un nivel de dificultad moderado para el procesamiento de las muestras y la posterior lectura, ya que dependen de la capacitación y experiencia del operador. Además, se necesita infraestructura edilicia adecuada y contar con un microscopio de fluorescencia.

El diagnóstico serológico de LC por IFI se basa en la detección de anticuerpos específicos en suero. Se ha descrito que la intensidad de la respuesta inmune humoral se correlaciona positivamente con el cuadro clínico y la replicación activa de los parásitos en los tejidos (Reis y col., 2006; Rodríguez-Cortés y col., 2007). En este estudio la mayoría de los caninos positivos a IFI-160 presentó signos clínicos. Según

Solano-Gallego y col. (2009), un nivel elevado de anticuerpos junto con un cuadro clínico compatible suele ser suficiente para establecer el diagnóstico clínico de LC en primer término. Sin embargo, en este estudio los caninos fueron sintomáticos y asintomáticos en similares proporciones para los resultados positivos obtenidos en la IFI-80 y 40. Los caninos positivos a IFI-80 y 40 pueden definirse como sospechosos de infección subclínica o incipiente siendo necesario en ellos el monitoreo serológico periódico en busca de seroconversión o la realización de otras pruebas complementarias (Noli y Saridomichelakis, 2014).

De la aplicación de los métodos serológicos rápidos se destacaron las siguientes ventajas: sencillez, facilidad en el procesamiento y lectura. Estos atributos fueron valorados como los más importantes ya que un resultado rápido permite la actuación inmediata del médico veterinario (Bordeau y col., 2014). Los laboratorios han colocado en el mercado de la medicina veterinaria diferentes pruebas rápidas que varían en el antígeno y el reactivo que utilizan (Paltrinieri y col., 2010). Independientemente de la marca utilizada, en este estudio los tres kits comerciales obtuvieron buena concordancia con la IFI-160 como referente de control. Los test rápidos resultaron positivos en alrededor del 40 % de los casos cuando se evaluaron independientemente (*FASTest*® LEISH 42,6 %; *Kalazar Detect*™ 41,4 %; *SNAP Leishmania* 40,2 %), aunque mostraron grandes diferencias entre sí ya que solo reaccionaron de manera positiva simultáneamente las 3 marcas en 55 (32,5 %) de los 169 sueros. A pesar de que estudios previos indican que los test rápidos presentan una especificidad media-alta y una sensibilidad que oscila entre 70 al 96 % (Reittinger y col., 2002; Solano-Gallego y col., 2014; da Costa y col., 2003), son incapaces de detectar caninos con niveles bajos de anticuerpos, situación que se da en infecciones recientes o subclínicas. Esta limitante se observa en este estudio con la buena concordancia entre los test rápidos y la IFI-160 y no con títulos menores. Los resultados obtenidos para los test rápidos destacan que *Kalazar Detect*™ tuvo la mejor concordancia con IFI-160. Sin embargo, *FASTest*® LEISH y *SNAP Leishmania* con IFI-160 también tuvieron buena concordancia. Por otro lado, si bien hubo menor concordancia entre IFI-160 y citología de MO, el resultado positivo a una citología es concluyente de la infección y no requiere de otras pruebas confirmatorias.

11. CONCLUSIONES

En la población de perros estudiada en la zona endémica de Misiones se identificó una tasa de infección serológica que superó el 30 % utilizando diferentes técnicas serológicas (IFI y test rápidos).

De la aplicación de los métodos diagnósticos, la IFI (especialmente a títulos

bajos) resultó más sensible que la citología de MO y que los test rápidos utilizados. La positividad a títulos bajos de anticuerpos (IFI-40 y 80) puede ser de utilidad para la sospecha de infecciones asintomáticas o relacionarse con la presencia de reacciones cruzadas.

La citología de MO es una técnica con un método de muestreo invasivo y en ocasiones doloroso si no se lo practica adecuadamente o con un protocolo seguro para su realización. Si la muestra es de buena calidad y el operario tiene el entrenamiento adecuado, se pueden obtener datos confirmatorios de infección por *Leishmania*. De los resultados obtenidos puede inferirse que la combinación IFI-160 junto a la citología de MO es adecuada para arribar al diagnóstico de LC, especialmente en presencia de signos clínicos. Los resultados citológicos negativos no deben ser utilizados como único dato para confirmar o descartar la presencia del parásito. En este caso se requiere la utilización de técnicas serológicas que complementen la información clínico-patológica obtenida. Los test rápidos han mostrado ser sencillos y útiles y, en determinados lugares donde no se dispone de métodos moleculares o citológicos, el resultado positivo a una prueba rápida en un animal sospechoso es sugestivo de la presencia de *Leishmania*. Independientemente de la marca utilizada, las pruebas rápidas presentan una buena concordancia con la IFI-160, aunque los resultados positivos o negativos aislados deberían confirmarse con otra marca comercial de la misma metodología y mediante la realización de otras técnicas de diagnóstico diferentes.

Consideramos que futuros estudios serían beneficiosos para esclarecer las relaciones entre los resultados serológicos y otros métodos diagnósticos como así también estudios en diferentes regiones que permitan aumentar nuestros conocimientos sobre la precisión de los diferentes métodos para la detección de la infección por *Leishmania* en la Argentina.

Enfatizamos que a causa de no existir una única prueba de fácil realización y 100% sensible y específica, es necesario un abordaje integrado para mejorar las posibilidades diagnósticas que incluya una detallada anamnesis, escenario epidemiológico, pruebas de laboratorio de rutina, métodos de diagnóstico directos e indirectos y otros complementarios.

De lo expuesto anteriormente concluimos que ningún método diagnóstico debería ser utilizado por sí solo en la toma de decisiones clínicas o sanitarias. En áreas endémicas, el impacto de LC exige obtener un diagnóstico precoz y de certeza para establecer un control eficaz que reduzca la prevalencia en las poblaciones caninas y a través de ella en los seres humanos sin apartar el sentido ético de la medicina veterinaria. Además, consideramos necesaria la investigación continua sobre

los métodos diagnósticos que permitan establecer procedimientos diagnósticos útiles para ser utilizados por los laboratorios veterinarios.

12. BIBLIOGRAFÍA

Acosta L. Epidemiología de la Leishmaniosis canina en la ciudad de Posadas, Misiones, Argentina. Tesis Doctoral. Facultad de Medicina. Universidad Miguel Hernández de Elche de Valencia, España. 2013.

Alvar J, Canavate C, Molina R, Moreno J, Nieto J. Canine leishmaniasis. *Adv Parasitol.* 2004; 57:1-88.

Amela C, Mendez I, Torcal JM, Medina G, Pachon I, Canavate C, Alvar J. Epidemiology of canine leishmaniasis in the Madrid region, Spain. *European journal of epidemiology.* 1995;11:157-61.

Antoine JC, Prina E, Jouanne C, Bongrand P. Parasitophorous vacuoles of *Leishmania amazonensis*-infected macrophages maintain an acidic pH. *Infection and immunity.* 1990;58:779-87.

Ashford RW. Leishmaniasis reservoirs and their significance in control. *Clin. Dermatol.* 1996; 14:523-532. Alonso F, Giménez Font P, Manchón M, Ruiz de Ybáñez R, Segovia M, Berriatua E. Geographical variation and factors associated to seroprevalence of canine leishmaniosis in an endemic Mediterranean area. *Zoonoses Public Health.* 2010; 57:318-328.

Baneth G, Koutinas AF, Solano-Gállego L, Bourdeau P, Ferrer L. Canine leishmaniosis new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. *Trends Parasitol.* 2008; 24:324-330.

Baneth G y Aroch I. Canine leishmaniasis: a diagnostic and clinical challenge. *Vet J.* 2008; 175:14-15.

Bates PA. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. *Int J Parasitol.* 2007; 37:1097-1106.

Bensoussan E, Nasereddin AM, Jonas F, Schnur LF, Jaffe CL. Comparison of PCR assays for diagnosis of cutaneous leishmaniosis. *J. Clin. Microbiol.* 2006; 44:1435-1439.

Boggiatto PM, Gibson-Corley KN, Metz K, Gallup JM, Hostetter JM, Mullin K, Petersen CA. Transmisión transplacentaria de *Leishmania infantum* como medio para la incidencia continua de la enfermedad en América del Norte. *PLoS Negl Trop Dis.* 2011; 5:1019.

Bourdeau P, Groulade P. Results of an inquiry into leishmaniasis. *Prat Med Chirur Anim Comp.* 1988; 23:5-10.

Bourdeau, P, Saridomichelakis, MN, Oliveira A, Oliva G, Kotnik T, Gálvez R, Foglia Manzillo V, Koutinas AF, Pereira da Fonseca I, Miró G. Management of canine leishmaniasis in endemic SW European regions: a questionnaire-based multinational survey. *Parasit Vectors.* 2014; 7:110.

Brandonisio O, Carelli G, Ceci L, Consenti B, Fasanella A, Puccini V. Canine leishmaniasis in the Gargano promontory (Apulia, South Italy). *Eur J Epidemiol.* 1992; 8:273-276.

Cardoso L, Schallig HD, Neto F, Kroon N y Rodrigues M. Serological survey of *Leishmania* infection in dogs from the municipality of Peso da Regua (Alto Douro, Portugal) using the direct agglutination test (DAT) and fast agglutination screening test (FAST). *Acta Trop.* 2004; 91:95-100.

Cavalier-Smith T. A revised six-kingdom system of life. *Biol Rev Camb Philos Soc.* 1998; 73:203-266.

Chang PCH. The ultrastructure of *Leishmania donovani*. *J Parasitol.* 1956; 42:126-136.

Ciaramella P, Oliva G, Luna RD, Gradoni L, Ambrosio R, Cortese L, Scalone A, Persechino A. A retrospective clinical study of canine leishmaniasis in 150 dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. *Vet Rec.* 1997; 141:539-543.

Ciaramella P, Pelagalli A, Cortese L, Pero ME, Corona M, Lombardi P, Avallone L, Persechino A. Altered platelet aggregation and coagulation disorders related to clinical findings in 30 dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. *Vet J.* 2005; 169:465-467.

Cortadellas O, del Palacio MJ, Bayón A, Albert A, Talavera J. Systemic hypertension in dogs with leishmaniasis: prevalence and clinical consequences. *J Vet Intern Med.* 2006; 20:941-947.

Cortese L, Pelagalli A, Piantedosi D, Mastellone V, Manco A, Lombardi P, Ciaramella P, Avallone L. Platelet aggregation and haemostatic response in dogs naturally co-infected by *Leishmania infantum* and *Ehrlichia canis*. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med.* 2006; 53:546-548.

Costa CHN. Characterization and speculations on the urbanization of visceral leishmaniasis in Brazil. *Cad. Saúde Pública.* 2008; 24:2959-2963.

Costa D.J, Carvalho RM, Abbehusen M, Teixeira C, Pitombo M, Trigo J, Nascimento F, Amorim L, Abreu-Silva AL, do Socorro Pires Cruz M, Miranda JC, Fukutani K, de Oliveira CI, Barral A, Barral-Netto M, Brodskyn C. Experimental infection of dogs with *Leishmania* and saliva as a model to study Canine Visceral Leishmaniasis. *PLoS One.* 2013; 8:e60535.

Coura-Vital W, Marques MJ, Veloso VM, Roatt BM, Aguiar-Soares RD, Reis LE, Braga SL, Morais MH, Reis AB, Carneiro M. Prevalence and factors associated with *Leishmania infantum* infection of dogs from an urban area of Brazil as identified by molecular methods. PLoS Negl Trop Dis. 2011; 5:1291.

Da Costa RT, França JC, Mayrink W, Nascimento E, Genaro O, Campos-Neto A. Standardization of a rapid immunochromatographic test with the recombinant antigens rK39 and K26 for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2003; 97:678-682.

Da Silva SM, Ribeiro VM, Ribeiro RR, Tafuri WL, Melo MN y Michalick MSM. First report of vertical transmission of *Leishmania infantum* in a naturally infected bitch from Brazil. Vet Parasitol. 2009; 166:159-162.

Dantas-Torres F. Canine leishmaniosis in South America. Parasit Vectors. 2009; 26:S1.

Dantas-Torres F, Solano-Gallego L, Baneth G, Ribeiro VM, de Paiva-Cavalcanti M, Otranto D. Canine leishmaniosis in the Old and New Worlds: unveiled similarities and differences. Trends Parasitol. 2012; 28:531-538.

Dantas-Torres F, Tarallo VD, Latrofa MS, Falchi A, Lia RP, Otranto D. Ecology of phlebotomine sand flies and *Leishmania infantum* infection in a rural area of southern Italy. Acta Trop. 2014; 137:67-73.

De Freitas E, Melo MN, da Costa-Val AP, Michalick MS. Transmisión de *Leishmania Infantum* por transfusión de sangre en perros: potencial de infección e importancia de los factores clínicos. Vet Parasitol. 2006; 137:159 – 167.

Deplazes P, Smith NC, Arnold P, Lutz H y Eckert J. Specific IgG1 and IgG2 antibody responses of dogs to *Leishmania infantum* and other parasites. Parasite Immunol. 1995; 17:451-458.

Eiras DF, Dellarupe A, Estévez JO, Nevot MC, Russo PD, López G, Desimone M, Olaya Martínez EJ, Castillo PJ, Moré GA. Detección de anticuerpos anti-*Leishmania* y anti-*Trypanosoma* y comparación de técnicas diagnósticas en caninos de Argentina. Memorias de la XX Reunión científico técnica, Asociación Argentina de Veterinarios de Laboratorio, Tucumán 2014.

Fraga J, Montalvo AM, De Doncker S, Dujardin JC, Van der Auwera G. Phylogeny of *Leishmania* species based on the heat-shock protein 70 gene. Infect Genet Evol. 2010; 10:238-45.

Fainboim L, Geffner J. Introducción a la Inmunología humana. 6ª Ed. Editorial Médica

Panamericana, 2011.

Ferrer L. The pathology of canine leishmaniasis. En: Killick-Kendrick Red. Canine Leishmaniasis: Moving towards a Solution. Proceedings of the 2nd International Canine Leishmaniasis Forum Intervet, Sevilla, Spain, 2002; 21-24.

Fraga J, Montalvo AM, Vander Auwera G, Maes I, Dujardin JC, Requena JM. Evolution and species discrimination according to the *Leishmania* heat-shock protein 20 gene. Infect Genet Evol. 2013; 18:229-37.

Franca-Silva JC, Da Costa RT, Siquiera AM, Machado-Cohelo GL, Mayrink W, Vieira EP, Costa JS, Genaro O, Nascimento E. Epidemiology of canine visceral leishmaniasis in the endemic area of Montes Claros Municipality, Minas Gerais State, Brazil. Vet Parasitol. 2003; 111:161-73.

Galati EAB. Morfología, terminología de adultos e identificación taxonómica de América. En: Rangel EF, Lainson R. Flebotomíneos do Brasil. Fiocruz, Rio de Janeiro. 2003; 53-175.

García-Alonso M, Nieto CG, Blanco A, Requena JM, Alonso C y Navarrete I. Presence of antibodies in the aqueous humour and cerebrospinal fluid during *Leishmania* infections in dogs. Pathological features at the central nervous system. Parasite Immunol. 1996; 18:539-546.

Gradoni L, Gramiccia M. Leishmaniasis. En: OIE manual of standards for diagnostic tests and vaccine. 4th ed. Office International des Epizootis, Paris. 2000; 803-812.

Gradoni L. The diagnosis of canine leishmaniasis. En: Killick-Kendrick Red. Canine Leishmaniasis: Moving towards a Solution. Proceedings of the 2nd International Canine Leishmaniasis Forum. Intervet International BV. Sevilla, Spain. 2002; 7-14.

Gramiccia M y Gradoni L. The current status of zoonotic leishmaniasis and approaches to disease control. Int J Parasitol. 2005; 35:1169-1180.

Gómez-Bravo A, German A, Abril M, Scavuzzo M y Salomón O.D. Spatial population dynamics and temporal analysis of the distribution of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) in the city of Clorinda, Formosa, Argentina. Parasites & Vectors. 2017; 10: 352.

Gomez N, Guida N. Enfermedades infecciosas de los caninos y felinos. 1^a ed. Buenos Aires, Argentina. Ed Inter-Médica, 2010. cap 37.

Guitierrez M. Tendencias en la seroprevalencia de la leishmaniasis canina en la ciudad de Posadas – Misiones - Argentina. (Online) http://www.vetcomunicaciones.com.ar/uploadsarchivos/seroprevalencia_leishmaniosis_canina._febr_13.pdf. Acceso: junio de 2019.

Holzmueller P, Hide M, Sereno D, Lemesre JL. *Leishmania infantum* amastigotes resistant to nitric oxide cytotoxicity: Impact on in vitro parasite developmental cycle and metabolic enzyme activities. *Infect Genet Evol.* 2006; 6:187-197.

Kaye P, Scott P. Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. *Nat Rev Microbiol.* 2011; 9: 604-615.

Killick-Kendrick R. Phlebotomine vectors of the leishmaniasis: a review. *Med Vet Entomol.* 1990; 4:1-24.

Killick-Kendrick R. The biology and control of phlebotomine sand flies. *Clin Dermatol.* 1999; 7:279-289.

Koutinas AF, Carlotti DN, Koutinas C, Papadogiannakis EI, Spanakos GK, Saridomichelakis MN. Claw histopathology and parasitic load in natural cases of canine leishmaniasis associated with *Leishmania infantum*. *Vet Dermatol.* 2010; 21:572-577.

Koutinas AF, Koutinas CK. Pathologic mechanisms underlying the clinical findings in canine leishmaniasis due to *Leishmania infantum* / *chagasi*. *Vet Pathol.* 2014; 51:527-538.

Kumar R, Nylén S. Immunobiology of visceral leishmaniasis. *Front Immunol.* 2012; 3:251.

Lainson R, Rangel EF. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil: a review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.* 2005; 100:811–827.

Landis JR, Koch GG. The Measurement of Observer Agreement for Categorical Data. *Biometrics.* 1977; 33:159-174.

Lima WG, Michalick MS, de Melo MN, Luiz Tafuri W. Canine visceral Leishmaniasis: a histopathological study of lymph nodes. *Acta trop.* 2004; 92:43-53.

Lewis DH, Peters W. The resistance of intracellular *Leishmania* parasites to digestion by lysosomal enzymes. *Ann Trop Med Parasitol.* 1977; 71:295-312.

Lombardo G, Pennisi MG, Lupo T, Chicharro C, Solano-Gallego L. Papular dermatitis due to *Leishmania infantum* infection in seventeen dogs: diagnostic features, extent of the infection and treatment outcome. *Parasit Vectors.* 2014; 7:120.

Maia C, Campino L. Methods for diagnosis of canine leishmaniasis and immune response to infection. *Vet Parasitol.* 2008; 158:274-287.

Marcondes M, Biondo AW, Gomes AA, Silva AR, Vieira RF, Camacho AA, Quinn J, Chandrashekar R. Validation of a *Leishmania infantum* ELISA rapid test for serological diagnosis of *Leishmania chagasi* in dogs. *Vet Parasitol.* 2011; 175:15-19.

Mettler M, Grimm F, Capelli G, Camp H, Deplazes P. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assays, an immunofluorescent-antibody test, and two rapid tests (immunochromatographic-dipstick and gel tests) for serological diagnosis of symptomatic and asymptomatic *Leishmania* infections in dogs. *J Clin Microbiol.* 2005; 43:5515-5519.

Ministerio de Salud. Normativa de notificación de enfermedades de denuncia obligatoria en veterinaria en pequeños animales. Provincia de Buenos Aires, Argentina. 2016; 29-33.

Miro G, Cardoso L, Pennisi MG, Oliva G, Baneth G. Leishmaniosis canina: nuevos conceptos e ideas sobre una zoonosis en expansión: parte dos. *Tendencias del parasitol.* 2008; 24:371-377.

Molina R, Amela C, Nieto J, San Andres M, Gonzalez F, Castillo JA, Lucientes J, Alvar J. Infectivity of dogs naturally infected with *Leishmania infantum* to colonized *Phlebotomus perniciosus*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 1994; 88:491-493.

Molyneux DH, Ashford RW. The biology of *Trypanosoma* and *Leishmania*, parasites of man and domestic animals. International Publications Service (Edit). 1983. New York, 294 págs.

Molyneux, Killick-Kendrick, R. The leishmaniasis in biology and medicine. Peters W, Killick-Kendrick R (Eds). Academic Press: London. 1987; 121-176.

Moreira, MA, Luvizotto MC, Garcia JF, Corbett CE, Laurenti MD. Comparison of parasitological, immunological and molecular methods for the diagnosis of leishmaniasis in dogs with different clinical signs. *Vet Parasitol.* 2007; 145:245-252.

Moreno J, Alvar J. Canine leishmaniasis: epidemiological risk and the experimental model. *Trends Parasitol.* 2002; 18:399-405.

Munstermann L. Phlebotomine Sand Flies, the Psychodidae. In: Marquardt WC (Ed.) *Biology of disease vectors*. Dana Dreibelbis, San Diego, California, USA. 2005; 141-151.

Noli C, Saridomichelakis MN. An update on the diagnosis and treatment of canine leishmaniosis caused by *Leishmania infantum* (syn. *L. chagasi*). *Vet J.* 2014; 202: 425-435.

Ordeix L, Dalmau A, Osso M, Llull J, Montserrat-Sangrà S, Solano-Gallego L. Histological and parasitological distinctive findings in clinically-lesioned and normal-looking skin of dogs with different clinical stages of leishmaniasis. *Parasit Vectors*. 2017; 10:121.

Oliva G, Scalone A, Foglia Manzillo V, Gramiccia M, Pagano A, Di Muccio T, Gradoni L. Incidence and time course of *Leishmania infantum* infections examined by parasitological, serologic, and nested-PCR techniques in a cohort of naive dogs exposed to three consecutive transmission seasons. *J Clin Microbiol*. 2006; 44:1318-1322.

Organización Panamericana de la Salud. Leishmaniasis, informe epidemiológico de las Américas. Informe Leishmaniasis N° 1. Washington, D.C: OPS. 2013.

Otranto D, Paradies P, de Caprariis D, Stanneck D, Testini G, Grimm F, Deplazes P, Capelli G. Toward diagnosing *Leishmania infantum* infection in asymptomatic dogs in an area where leishmaniasis is endemic. *Clin Vaccine Immunol*. 2009; 16:337-343.

Padilla AM, Marco JD, Diosque P, Segura MA, Mora MC, Fernández MM, Malchiodi EL, Basombrío MA. Canine infection and the possible role of dogs in the transmission of American tegumentary leishmaniasis in Salta, Argentina. *Vet Parasitol*. 2002; 110:1-10.

Palatnik-de-Sousa CB, Day MJ. One Health: the Global Challenge of Epidemic and Endemic Leishmaniasis. *Parasites & Vectors*. 2011; 4:197.

Paltrinieri S, Solano-Gallego L, Fondati A, Lubas G, Gradoni L, Castagnaro M, Crotti A, Maroli M, Oliva G, Roura X, Zatelli A, Zini E. Canine Leishmaniasis Working Group, Italian Society of Veterinarians of Companion Animals. Guidelines for diagnosis and clinical classification of leishmaniasis in dogs. *J Am Vet Med Assoc*. 2010; 236:1184-1191.

Pennisi MG, Reale S, Giudice SL, Masucci M, Caracappa S, Vitale M y Vitale F. Real-time PCR in dogs treated for leishmaniasis with allopurinol. *Vet Res Commun*. 2005; 29:301-303.

Persechino A y Oliva G. Autoimmunity associated with leishmaniasis in dogs. *Acta Med Vet*. 1986; 75:247-249.

Petters N y Sacks D. Privilegio inmune en sitios de infección crónica: *Leishmania* y células T reguladoras. *Immunol Rev*. 2006; 213:159-179.

Pinelli, E, Killick-Kendrick R, Wagenaar J, Bernadina W, del Real G. y Ruitenberg, J. Cellular and humoral immune responses in dogs experimentally and naturally infected with *Leishmania infantum*. *Infect Immun*. 1994; 62:229-235.

Queiroz MF, Varjão JR, Moraes SC & Salcedo GE. Analysis of sandflies (Diptera: Psychodidae) in Barra do Garças, state of Mato Grosso, Brazil and the influence of environmental variables on the vector density of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912). *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2012; 45:313–317.

Reis A, Teixeira-Carvalho A, Vale A, Marques M, Giunchetti R, Mayrink W, Guerra L, Andrade R, Correia-Oliveira R, Martins-Filho O. Isotype patterns of immunoglobulins: hallmarks for clinical status and tissue parasite density in Brazilian dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi*. *Vet Immunol Immunopathol*. 2006; 112:102-111.

Reithinger R, Quinnell RJ, Alexander B and Davies CR. Rapid detection of *Leishmania infantum* infection in dogs: comparative study using immunochromatographic dipstick test, enzyme-linked immunosorbent assay, and PCR. *J Clin Microbiol*. 2002; 40:2352-2356.

Rioux JA, Killick-Kendrick R, Leaney AJ, Young CJ, Turner DP, Lanotte G, Bailly M. Ecology of leishmaniasis in the south of France. Canine leishmaniasis: successful experimental transmission from dog to dog by the bite of *Phlebotomus ariasi* Tonnoir, 1921. *Ann Parasitol Hum Comp*. 1979; 54:401-407.

Rodrigues V, Cordeiro-da-Silva A, Laforge M, Silvestre R, Estaquier J. Regulation of immunity during visceral *Leishmania* infection. *Parasit Vectors*. 2016; 9:118.

Rodríguez-Cortés A, Ojeda A, López-Fuertes L, Timón, M, Altet L, Solano-Gallego L, Sánchez-Robert E, Francino O, Alberola J. A long term experimental study of canine visceral leishmaniasis. *Int Journal Parasitol*. 37; 683-693.

Ross R. Note on the bodies recently described by Leishman y Donovan. *Br Med J*. 1903; 2:1261-1262.

Salomón OD, Sosa Estani S, Rossi GC, Spinelli GR. Presencia de *Lutzomyia longipalpis* y situación de la leishmaniasis visceral en Argentina. *Medicina (Buenos Aires)*. 2001; 61:174-178. Salomón OD, Sinagra A, Nevot MC, Barberian G, Paulin P, Estevez J, Riarte A, Estevez J. First visceral leishmaniasis focus in Argentina. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2008; 103:109-11.

Saporito L, Giammanco GM, De Grazia S, Colomba C. Visceral leishmaniasis: host-parasite interactions and clinical presentation in the immunocompetent and in the immunocompromised host. *Int J Infect Dis*. 2013; 17:572-576.

Saridomichelakis MN, Mylonakis ME, Leontides LS, Koutinas AF, Billinis C, Kontos VI. Evaluation of lymph node and bone marrow cytology in the diagnosis of canine leishmaniasis

(*Leishmania infantum*) in symptomatic and asymptomatic dogs. Am J Trop Med Hyg. 2005; 73:82-86.

Saridomichelakis MN. Advances in the pathogenesis of canine leishmaniosis: epidemiologic and diagnostic implications. Vet Dermatol. 2009; 20:471-489.

Solano-Gallego L, Lull J, Ramos G, Riera C, Arboix M, Alberola J, Ferrer L. The Ibizan hound presents a predominantly cellular immune response against natural *Leishmania* infection. Vet Parasitol. 2000; 90:37-45.

Solano-Gallego L, Morell P, Arboix M, Alberola J, Ferrer L. Prevalence of *Leishmania infantum*: Infection in Dogs Living in an Area of Canine Leishmaniasis Endemicity Using PCR on Several Tissues and Serology. J.Clin.Microbiol. February 2001; 39:560-563.

Solano-Gallego L, Fernandez-Bellon H, Morell P, Fondevila D, Alberola J, Ramis A, Ferrer L. Histological and immunohistochemical study of clinically normal skin of *Leishmania infantum*-infected dogs. J Comp Pathol. 2004; 130:7-12.

Solano-Gallego L, Koutinas A, Miró G, Cardoso L, Pennisi MG, Ferrer L, Bourdeau Oliva G, Baneth G. Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniasis. Vet Parasitol. 2009; 165:1-18.

Solano-Gallego L, Miró G, Koutinas A, Cardoso L, Pennisi MG, Ferrer L, Bourdeau P, Oliva G, Baneth G. The LeishVet Group. LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniosis. Parasit Vectors. 2011; 4:86.

Solano-Gallego L, Villanueva-Saz S, Carbonell M, Trotta M, Furlanello T, Natale A. Serological diagnosis of canine leishmaniosis: comparison of three commercial ELISA tests (Leiscan, ID Screen and *Leishmania* 96), a rapid test (Speed Leish K) and an in-house IFAT. Parasit Vectors. 2014; 7:111.

Teixeira MJ, Teixeira CR, Andrade BB, Barral-Netto M, Barral A. Chemokines in host-parasite interactions in leishmaniasis. Trends Parasitol. 2006; 22:3240.

Vamvakidis CD, Koutinas AF, Kanakoudis G, Georgiadis G, Saridomichelakis M. Masticatory and skeletal muscle myositis in canine leishmaniasis (*Leishmania infantum*). Vet Rec. 2000; 146:698-703.

WHO (World Health Organization). Control of the leishmaniasis: report of a meeting of the Expert Committee on the Control of Leishmaniasis. Technical report series, WHO (Edit.).

Ginebra, Suiza. 2010; 949.

Woolhouse M, Dye C, Etard J. Heterogeneities in the transmission of infectious agents: implications for the design of control programs. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1997; 94:338–342.

Zanette MF, Felix de Lima VM, Laurenti MD, Claudio Nazaretian Rossi CN, Pelloi Vides.J, da Costa Vieira. R.F., Welker Biondo.A., Marcondes.M. Serological cross-reactivity of *Trypanosoma cruzi*, *Ehrlichia canis*, *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* and *Babesia canis* to *Leishmania infantum-chagasi* tests in dogs. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropica*. 2014; 47:105-7.

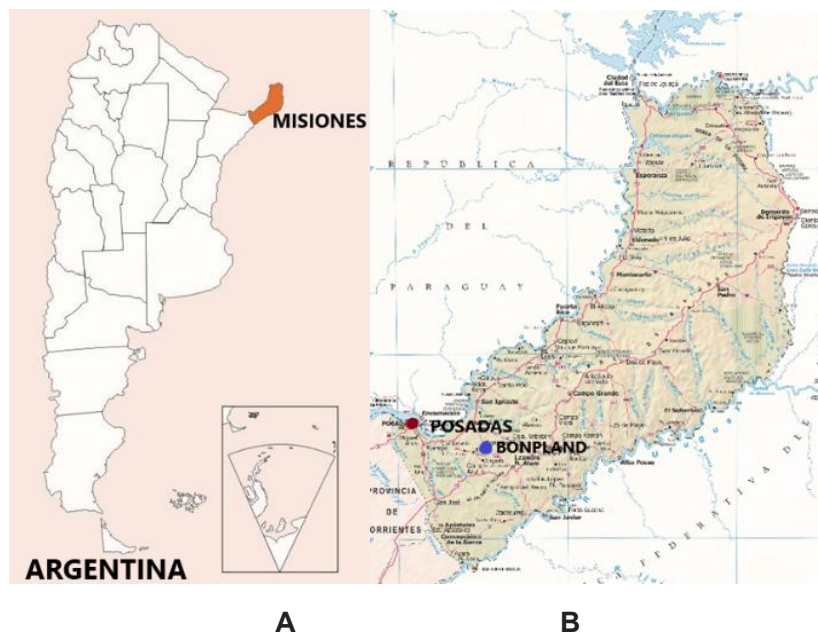
13.ANEXOS

ANEXO I. ÁREAS DE ESTUDIO EXPERIMENTAL A CAMPO

La provincia de Misiones (26°55'S 54°31'O) abarca un amplio territorio donde LC es endémica. Ocupa una superficie de 29 801 km², cuenta con un total de 1.101.593 habitantes (INDEC, 2010) entre la población urbana y rural donde el 25,7% pertenece al sector más pobre (INDEC, 2017). El clima de Misiones es tropical húmedo sin estación seca, por lo cual es la provincia más húmeda del país. Parte de la selva misionera ha sido transformada por el hombre para cultivos o ganadería.

En total se recolectaron muestras de 169 caninos provenientes de la provincia de Misiones. El 92,4% (156/169) pertenecía a “El Refugio”, una asociación protectora sin fines de lucro que adopta caninos abandonados que se encuentra ubicado en el barrio Itambé Miní, Posadas. El 7,6% (13/169) restante estaban domiciliados en el departamento de Bonpland, Misiones.

MAPAS DEL ÁREA DE ESTUDIO



A) Mapa de Argentina con referencia coloreada en naranja para Misiones. **B)** Mapa de Misiones físico y político de Misiones con referencia en los puntos de muestreo: Ciudad de Posadas en rojo y departamento de Bonpland en azul. Imágenes extraídas de la biblioteca de mapas de la subsecretaría de ordenamiento territorial de la provincia de Misiones.



A)-Mapa satelital de la ciudad de Bonpland (Misiones) con referencia en rojo en el punto de muestreo (Municipalidad). **B)**-Mapa satelital de la ciudad de Posadas, Misiones con ubicación en el punto de muestreo. Imágenes satelitales.

ANEXO II. PROCEDIMIENTOS E INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS POR MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO.

Citología de médula ósea

Los extendidos de MO se colorearon según la técnica May Grünwald-Giemsa de acuerdo con el siguiente procedimiento:

1. Colocar la solución de May Grünwald pura sobre la superficie de los frotis durante 3 minutos.
2. Agregar agua destilada dejando caer casi todo el colorante y dejar actuar durante 5 minutos.
3. Lavar bien con agua corriente.
4. Agregar Giemsa diluido y dejarlo actuar durante 20 minutos. La solución de uso se prepara diluyendo en una proporción de 2 gotas de Giemsa puro cada 1 ml de agua destilada.
5. Lavar bien con agua corriente.
6. Dejar secar y observar bajo microscopio óptico.
7. Interpretación de los Resultados.

Resultado Positivo: Fueron consideradas positivas aquellas muestras de MO en las que se visualizó al menos un amastigote de *Leishmania* (intracelular o extracelular) con las características morfológicas clásicas y visibles para el género (forma, tamaño, núcleo y kinetoplasto color púrpura). En total se aplicaron dos observaciones por muestra realizadas por la misma persona y una tercera por personas calificadas como control externo y validación.

Resultado Negativo: Ningún amastigote encontrado durante la observación de 300 campos a 100x.

Inmunofluorescencia indirecta.

En la parte superior de la policubeta marcar las diluciones (1/40 1/80 y 1/160) y del otro el número asignado a la muestra problema.

- 1- Con una pipeta multicanal se colocar PBS 1% (Buffer) en tres columnas diferentes 195 µl, 100 µl y 100 µl en el costado superior donde se identificaron las diluciones respectivamente.
- 2- Luego se agregar 5 µl de suero en la primera fila y homogeneizar.
- 3- Con una pipeta multicanal graduada, levantar 100 µl del buffer más el suero de la primera columna y llevarla la segunda. Luego se repite la operación hasta la tercera columna correspondiente a la última dilución 1/160.
- 4- Sacar los *slides* del freezer.
- 5- Colocar 12 µl de suero control (positivo y negativo) en los *wells* de los *slides*. Ante la dificultad de obtener resultados “verdaderos negativos” como control negativo, se incorporaron sueros obtenidos de perros de área no endémica (Gran Buenos Aires), previamente testeados con las mismas técnicas serológicas.
- 6- Identificar el *slide* con los números de protocolo de la muestra y la dilución realizada en cada *well*.
- 7- Cargar 12 µl de las diferentes diluciones en los *wells*.
- 8- Llevar los vidrios a una cámara húmeda para incubar a 37°C durante 30 minutos.
- 9- Realizar 2 lavados de 10 minutos con PBS y dejar secar.
- 10- Agregar 12 µl del conjugado de Anticuerpos anti-IgG de canino marcados con Fluoresceina (FICT-Sigma) en cada *well*.
- 11- Incubar en cámara húmeda por 30 minutos y realizar dos lavados adicionales con PBS 1%.
- 12- Por último, colocar dos gotas de solución de montaje y un cubreobjetos para su observación a 40x en Microscopio de Fluorescencia (Leica, 2000).

Interpretación de los resultados de Inmunofluorescencia Indirecta

Resultado positivo: Se consideraron sueros positivos a cualquier dilución en los que se observó fluorescencia homogénea en toda la morfología del promastigote.

Resultado negativo: Se observan fondo negro con sombras oscuras de promastigotes.

Test serológicos rápidos

A. Kalazar *Detect*[™] (Inbios, USA)

- 1- Abrir el envase y sacar la tira.
- 2- Colocar en un eppendorf o cubeta 3 gotas de la solución provista por el Kit de diagnóstico.
- 3- Se agrega a la cubeta agregaron 20ul de sangre o suero problema.
- 4- Se introduce la tira en la cubeta con el suero más el buffer de manera vertical.
- 5- Se espera que por capilaridad se produzca una adecuada migración de la solución.
- 6- La lectura del resultado final se realiza a los 10- 15 minutos siguientes.

B. *FASTest*[®] LEISH (Megacor, Austria)

- 1- Abrir el kit.
- 2- Se colocan 50 µl de suero problema en el pocillo del dispositivo
- 3- Se agregan 5 gotas del buffer provisto por el Kit.
- 4- La lectura se realiza a los 15 minutos posteriores.

Interpretación de los Resultados Kalazar *Detect*[™] y *FASTest*[®] LEISH

- 1- **Positivo:** se observan dos bandas color rojo.
- 2- **Negativo:** se observa una sola banda roja (banda control).
- 3- **Dudoso / Inválido:** No se visualiza la banda control o banda positiva sin banda control.

B. *SNAP Leishmania* (Idexx, USA).

- 1- Abrir el kit.
- 2- Colocar en el eppendorf provisto 4 gotas de la solución.
- 3- Agregar 3 gotas de suero.
- 4- Verter el contenido de la mezcla en el pocillo del snap.
- 5- Cuando se observe migración debe presionarse el botón del snap.
- 6- La lectura se realiza a los 6 minutos posteriores.

Interpretación de los Resultados *SNAP Leishmania*.

- 1- **Positivo:** color celeste en el punto de control y en el de muestra.
- 2- **Negativo:** color celeste sólo en el punto de control.
- 3- **Dudoso / Inválido:** No desarrolla color celeste en el control. Un sólo punto celeste en el positivo sin color en el control. No ocurre migración luego de presionar el botón del Snap.