

# CAPÍTULO 8

## *Leishmania infantum*

*Andrea Dellarupe, J. Octavio Estévez y Diego F. Eiras*

Las leishmaniasis pertenecen a un grupo de enfermedades parasitarias, causadas por diferentes especies de protozoos flagelados del género *Leishmania*, que son morfológicamente indistinguibles por observación directa (Cavalier-Smith, 1998; Alvar et al., 2004). El género *Leishmania* fue descrito simultáneamente por Charles Donovan y William Leishman a partir de biopsias viscerales y cutáneas en pacientes enfermos de la India, y en conmemoración se le otorga el nombre de *Leishmania donovani* al complejo de especies que conforman el género y Leishmaniosis Visceral (LV) o Kala-azar (del sánscrito: Kala “negra, impura” y azar “fiebre”) a la enfermedad. A nivel mundial, la principal especie implicada en producir Leishmaniosis canina (LC) y LV en el hombre es *Leishmania infantum* (*Syn. L. infantum chagasi*) (Ross, 1903; Alvar et al., 2004).

### Clasificación

**Phylum:** Sarcomastigophora

**Subphylum:** Mastigophora

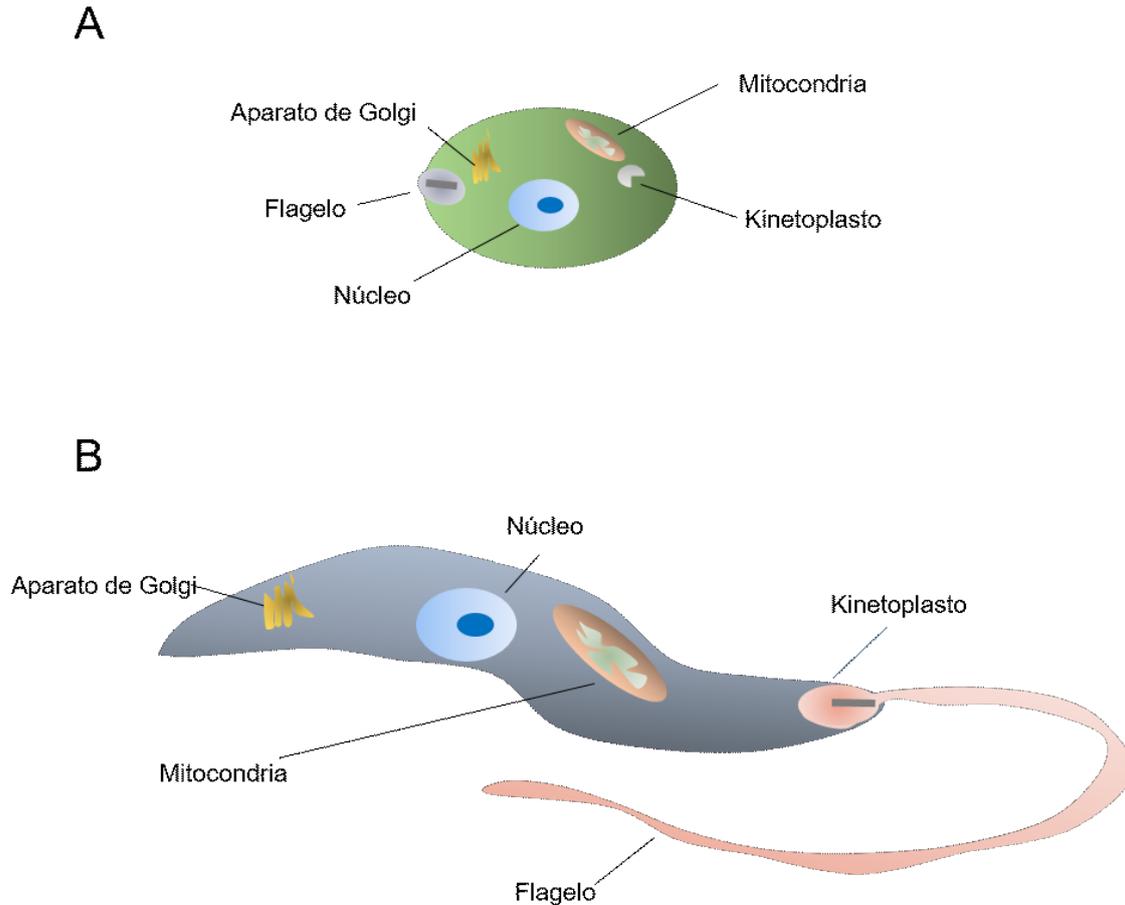
**Clase:** Zoomastigophora

**Orden:** Kinetoplastida

**Familia:** Trypanosomatidae

### Morfología

Los flagelados del género *Leishmania* presentan dos estadios diferentes: **amastigotes** y **promastigotes**. Los **amastigotes** son intracelulares y se corresponden con pequeñas formas ovoideas o esferoidales que miden entre 2,5-5  $\mu\text{m}$ , que no poseen flagelo y contienen un núcleo esférico excéntrico y voluminoso y un kinetoplasto próximo al núcleo de aspecto bacilar (Fig. 1 A). Las formas **promastigotas** son fusiformes entre 14-20  $\mu\text{m}$ , poseen un flagelo largo y libre en la región anterior que le permite movilidad, y contiene en su interior un núcleo ovalado situado en la región central y un kinetoplasto bastoniforme (Fig. 1 B).



**Figura 1.** Esquema morfológico de las formas evolutivas de *Leishmania infantum*. (A) amastigote. (B) promastigote.

## Ciclo biológico

El ciclo de *L. infantum* es asexual y heteroxeno ya que interviene un hospedador vertebrado (caninos, roedores, incluso el hombre, entre otros) y un vector (invertebrado), cambiando su morfología de acuerdo con el hospedador donde se encuentre. En los vertebrados se encuentran las formas amastigotes intracelulares y en los invertebrados los promastigotes extracelulares (Killick–Kendrick, 1990). El parásito es transmitido por hembras de alrededor de 93 especies de dípteros flebótomos del género *Lutzomyia* en América y del género *Phlebotomus* en África, Asia y Europa (WHO, 2010). En América Latina se ha descrito a *Lutzomyia longipalpis* como el principal vector para la transmisión de *L. infantum* (Salomon et al., 2001). *Lutzomyia longipalpis* se infecta durante su alimentación, al picar a un individuo parasitado, momento en el que ingiere células que contienen amastigotes en su interior. En el tubo digestivo del flebótomos ocurre la metaciclogénesis, proceso en el que los amastigotes se transforman en promastigotes procíclicos, se multiplican por fisión binaria y alcanzan la capacidad infectante en la proximidad de la probóscide como promastigotes metacíclicos, quedando así dispuestos para ser inoculados en la piel de otro hospedador. Una vez que los promastigotes metacíclicos

de *L. infantum* alcanzan los capilares cutáneos del nuevo hospedador, son fagocitados por macrófagos tisulares y células dendríticas, y alojados dentro de una vacuola parasitófora donde se transforman en amastigotes y se multiplican de manera intracelular en varios órganos y tejidos del hospedador vertebrado (Fig. 2).

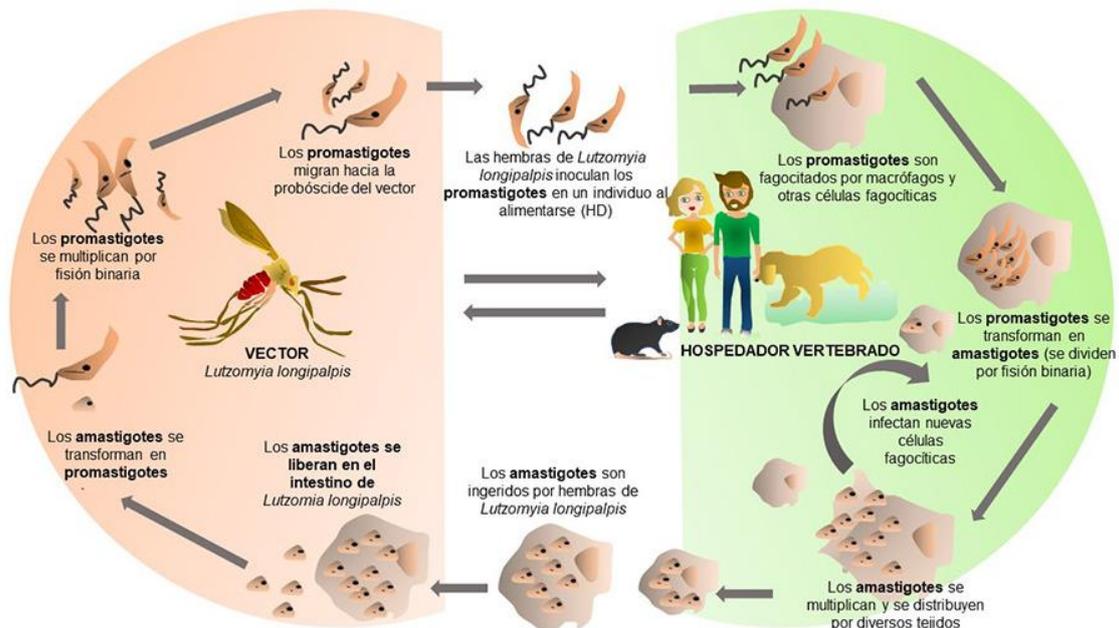


Figura 2. Ciclo de vida de *Leishmania infantum*.

## 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 et al., 2004). Existen factores como determinadas moléculas con propiedades vasodilatadoras, anti-coagulantes, inmunosupresoras y antiagregantes plaquetarias presentes en la saliva del vector (como el Maxadilan), que contribuyen a generar un escenario local en el sitio de la picadura propicio para favorecer la virulencia del parásito.

El parásito tiene la capacidad de evadir la respuesta inmune y multiplicarse activamente por fisión binaria en grandes grupos de amastigotes hasta que las células estallan, se liberan y adquieren la capacidad de infectar nuevas células alcanzado otros órganos del sistema linfo-hematopoyético como la médula ósea, linfonódulos, bazo e hígado entre otros (Antoine et al., 1990; Baneth et al., 2008).

La respuesta inmune puede ser muy variable al igual que las manifestaciones clínicas, que van desde la forma subclínica autolimitante hasta una enfermedad grave y mortal (Solano Gallego et al., 2009). La respuesta inmune innata comienza cuando el parásito ingresa a través de la epidermis mediante la picadura del flebótomo, momento en que se produce una respuesta

inflamatoria local que puede pasar desapercibida o provocar una intensa reacción cutánea granulomatosa o “chancro”, estimulando localmente la quimiotaxis celular de polimorfonucleares y monocitos y la activación del sistema del complemento, que intentarán neutralizar la infección durante las primeras horas (Teixeira et al., 2006). Cuando la respuesta inmune innata resulta exitosa puede eliminarse hasta el 80% de los promastigotes marcando la diferencia entre la resistencia y la diseminación parasitaria (Ferrer, 2002). Sin embargo, cuando la respuesta innata no ha sido suficiente, la infección se establece y los parásitos alcanzan la vía linfática y hematogena para llegar a los nódulos linfáticos, bazo, médula ósea y otros órganos (Molyneux & Ashford, 1983).

Por su parte la respuesta inmune adaptativa de tipo Th1 es la más adecuada y efectiva, donde los linfocitos T CD4+ sintetizan fundamentalmente Interferón- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) que activa a los macrófagos responsable de la muerte de los patógenos de vida endocelular obligada como en este caso. Además de la respuesta de tipo Th1, se activan también los Linfocitos T CD8+ o citotóxicos que pueden eliminar células infectadas. Si prevalece la respuesta inmune celular los caninos infectados pueden frenar el avance de la enfermedad clínica y permanecer asintomáticos por largos periodos de tiempo (Gonçalves et al., 2019).

Por otro lado la respuesta inmune humoral está mediada por citoquinas (IL-10, 4, 13 y 21) secretadas por los L Th2 y folicular, que intervienen en la regulación negativa y depresión de la respuesta celular Th1, y a su vez promueven la activación de los linfocitos B y la síntesis de anticuerpos específicos incapaces de actuar contra el parásito de ubicación intracelular, pero tienen un papel relevante como opsoninas o anticuerpos neutralizantes en los momentos que se encuentran fuera de las células. La sintomatología característica de LC se debe en gran parte al depósito de inmunocomplejos generados en exceso durante este tipo de respuesta inmune y a la inmunosupresión (Alvar et al., 2004; Koutinas & Koutinas, 2014).

## Patogenicidad y sintomatología

Los estudios poblacionales muestran que en la mayoría de los perros infectados no hay manifestaciones clínicas. Esto se debe a que, en general, hay una tasa de multiplicación de amastigotes muy baja debido al predominio de la respuesta inmune de tipo celular y con bajos niveles de anticuerpos circulantes. Se estima que alrededor del 90% de los caninos infectados son “asintomáticos” debido al desarrollo de respuestas inmunológicas adecuadas, manteniéndolos libres de enfermedad durante mucho tiempo e incluso por años (Solano-Gallego et al., 2011), por lo que infección no es sinónimo de enfermedad clínica, algo importante para tener en cuenta durante el proceso diagnóstico (Baneth et al., 2008).

Los perros sintomáticos suelen tener elevados niveles de anticuerpos debido al predominio de respuesta inmune humoral sobre la respuesta celular. Los signos dermatológicos son muy frecuentes, entre ellos la principal manifestación es la dermatitis exfoliativa no pruriginosa con o sin alopecia, dermatitis nodulares, papulares, pustulosas y ulcerativas en uniones mucocutáneas

como ojos, nariz, labios y genitales (Baneth et al., 2008). Un signo clínico tardío y de carácter crónico es la onicogrifosis o excesivo crecimiento de las uñas promovido por la ubicación del parásito en la matriz ungueal (Koutinas et al., 2010).

La linfadenomegalia está presente en los caninos sintomáticos y es el segundo signo clínico más frecuente debido a la hipertrofia cortical y medular en respuesta a la infección (Baneth et al., 2008). También se pueden observar con frecuencia lesiones oculares y perioculares, como uveítis anterior, blefaritis, queratoconjuntivitis común o seca y en menor medida -de acuerdo con la progresión de la enfermedad- hemorragias retinianas, iridociclitis, coriorretinitis, uveítis posterior, glaucoma, desprendimiento de retina y ceguera (Baneth et al., 2008). La anemia y la palidez de las mucosas se presentan como consecuencia de la epistaxis, hematuria y diarrea hemorrágica, mientras que la caquexia, emaciación y atrofia muscular son comunes debido a la polimiositis crónica (Ciaramella et al., 2005). También son muy frecuentes los trastornos renales con insuficiencia renal crónica en estadios avanzados siendo la principal causa de muerte en los caninos (Cortadellas et al., 2006; Costa et al., 2013). La anemia que suele ser un hallazgo relativamente frecuente en esta enfermedad; puede ser debida tanto a problemas de pérdida de eritrocitos, por epistaxis, melena, hematoquecia, entre otros, así como a trastornos vinculados a la hemopoyesis como consecuencia de procesos inmunes responsables de mielosupresión o también (especialmente en procesos de larga data) a cuadros de insuficiencia renal crónica. En aquellos casos de anemias severas, siempre se debe tener en cuenta la posibilidad de comorbilidades que puedan contribuir a esta situación (e.g. ancylostomiasis, ehrlichiosis, entre otras).

Otras manifestaciones clínicas menos frecuentes pero que también se presentan en ocasiones como un verdadero desafío para el clínico, son los trastornos neurológicos (ataxia, paresia, parálisis, convulsiones) y osteoarticulares (artritis, sinovitis, osteomielitis) (Oliva, 2016).

## Epidemiología

Actualmente a nivel mundial la leishmaniasis se encuentra entre las 10 enfermedades tropicales desatendidas con más de 12 millones de personas infectadas y entre 20.000 y 30.000 muertes al año. Los países que concentran el mayor número de casos de LV son India, Sudán del Sur, Sudán, Brasil, Etiopía y Somalia.

**En el continente americano se** han identificado 15 de las 22 especies de *Leishmania* patógenas para el hombre y cerca de 54 especies diferentes de vectores que estarían potencialmente involucrados en la transmisión. La LC es endémica en 18 de países de América: Colombia, Costa Rica, Brasil, Argentina, Ecuador, Venezuela, Bolivia, Perú, Paraguay, El Salvador, Honduras, Nicaragua, Panamá, Guyana, Surinam, Guatemala, Guyana Francesa y México y la LV en 13 países: Argentina, Bolivia, Brasil, Colombia, Costa Rica, El Salvador, Guatemala, Honduras, México, Paraguay, Nicaragua, Venezuela y Uruguay (<https://iris.paho.org/handle/10665.2/53089>).

En nuestro país el agente de la leishmaniosis canina *L. infantum chagasi*, produce una zoonosis parasitaria de importancia especialmente en el noreste, considerada zona endémica que

se corresponde con la transmisión vectorial y actualmente en expansión (Marconde et al., 2019). Los primeros casos fueron diagnosticados en la ciudad de Posadas, Misiones, en el año 2006 (Salomon et al., 2008), pero actualmente se ha reportado en Misiones, Corrientes, Chaco, Entre Ríos, Santiago del Estero y Salta; y de forma aislada en Jujuy y Tucumán ([https://bancos.salud.gob.ar/sites/default/files/2021-01/leishmaniasis-visceral\\_diptico.pdf](https://bancos.salud.gob.ar/sites/default/files/2021-01/leishmaniasis-visceral_diptico.pdf)).

Debido a la migración desde áreas endémicas y a los mecanismos de transmisión no vectorial que posee el parásito (vía genital, transfusional y transplacentaria), puede darse el diagnóstico de LC y también casos humanos en áreas no endémicas, aunque el 27% de los casos de LC se presentan en zonas fronterizas ([https://bancos.salud.gob.ar/sites/default/files/2021-01/leishmaniasis-visceral\\_diptico.pdf](https://bancos.salud.gob.ar/sites/default/files/2021-01/leishmaniasis-visceral_diptico.pdf)).

## Diagnóstico y observación

En el perro la obtención de un diagnóstico certero es complejo. Lo importante es tener presente cuál o cuáles son los animales sospechosos de infección. Un perro puede tener esta condición por varios motivos: presencia de manifestaciones clínicas y/o alteraciones clínico-patológicas compatibles, vivir en una región endémica, convivir con animales infectados o vivir en la calle, tener antecedentes de haber estado en zonas de transmisión vectorial, haber tenido contacto genital con un animal infectado, haber nacido de madre infectada o haber recibido sangre de origen dudoso. Una vez que un perro es considerado sospechoso de infección por uno o más de estos criterios, deberá ser evaluado cuidadosamente con métodos de detección directa (estudios parasitológicos), serológicos y/o moleculares a fin de establecer el diagnóstico acertado. Dentro de los métodos directos, la citología de médula ósea, nódulos linfáticos, piel o bazo es la técnica más frecuentemente utilizada para la detección de amastigotes intracelulares o libres, en los extendidos coloreados. Las técnicas serológicas para la detección de anticuerpos pueden ser cualitativas (técnicas de diagnóstico rápido por inmunocromatografía o DOT-ELISA) o cuantitativas (Inmunofluorescencia indirecta o ELISA).

## Métodos directos de diagnóstico

### Citología

La citología consiste en la identificación de los parásitos a partir de muestras citológicas, raspados e improntas de lesiones cutáneas, aspirados de linfonódulos o médula ósea, bazo y/o nódulos cutáneos. Lo que se observa al microscopio óptico en muestras positivas son los amastigotes libres o dentro de macrófagos con su morfología característica, ya que tienen afinidad por tinciones habituales como May-Grunwald Giemsa y Diff-Quick. Como ventajas de este método se puede mencionar el bajo costo, la simple y rápida obtención de la muestra, y la elevada es-

pecificidad cercana al 100%, ya que con la sola presencia de un amastigote se confirma la infección. Sin embargo, la sensibilidad varía de 17 a 83% siendo mayor en caninos que presentan sintomatología ya que suelen tener una mayor carga parasitaria (Moreira et al., 2007).

### **Histopatología e Inmunohistoquímica (HP e IHQ)**

La HP tiene como ventaja que permite descartar otros procesos patológicos o inferir la presencia de infección por *Leishmania* a través de infiltrados celulares característicos (Koutinas & Koutinas, 2014), y como desventaja que requiere de muestras obtenidas de manera invasiva.

La IHQ es una técnica 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 (Moreira et al., 2007).

### **Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)**

La técnica de PCR permite amplificar ADN de *Leishmania* spp. presente en diferentes tipos de muestras (médula ósea, linfonódulos, piel, sangre, hisopado conjuntival, oral, nasal, etc.). Esta técnica tiene una alta sensibilidad y especificidad, pudiendo detectar infección de manera precoz (Coura-Vital et al., 2011). La PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR) es utilizada principalmente para el diagnóstico y seguimiento post tratamiento ya que cuantifica la carga parasitaria en muestras de diferentes orígenes (Pennisi et al., 2005). Es importante destacar que hay una diferencia importante de sensibilidad en esta técnica de acuerdo con el material estudiado, siendo la piel, los tejidos linfáticos y la médula ósea los materiales más confiables comparados por ejemplo con muestras como sangre (de Almeida Ferreira et al., 2012; Hernández et al., 2015; Oliveira et al., 2015).

### **Aislamiento y cultivo**

El cultivo en líneas celulares de *Leishmania* spp. tiene una especificidad cercana al 100%, mientras que la sensibilidad varía según la carga parasitaria de las muestras procesadas. Sin embargo, no es un método utilizado de rutina ya que se necesitan instalaciones especiales y requieren de períodos prolongados para determinar que la muestra es negativa, por lo que se utiliza principalmente con fines de investigación (Maia & Campino, 2008).

## **Métodos indirectos de diagnóstico**

### **Enzimoimmunoensayo (ELISA)**

El ELISA es una técnica serológica cuantitativa que utiliza diferentes antígenos como: promastigotes o amastigotes completos o extractos solubles, proteínas recombinantes (rK39) o proteínas purificadas (Solano-Gallego et al., 2014). La sensibilidad oscila entre 80%-99,5% y la especificidad 81%-100 % (Marcondes et al., 2011). Existen diferentes tipos de ELISAs y tienen como ventaja que se pueden procesar varios sueros de manera simultánea.

### 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 títulos de anticuerpos anti-*Leishmania* presentes en el suero y es la técnica serológica más aplicada en países endémicos para todos los tipos de leishmaniasis (Solano-Gallego et al., 2014).

Como ventajas de esta técnica se destaca su capacidad de cuantificar títulos altos, intermedios o bajos de anticuerpos anti-*Leishmania* tanto en individuos sanos como enfermos (Alvar et al., 2004).

Como desventaja de la IFI se puede mencionar la posible reacción cruzada con otros protozoos, razón por la cual se deben considerar positivos los títulos de anticuerpos moderados a elevados en áreas donde coexisten más de una especie de *Leishmania* u otros parásitos relacionados como *Trypanosoma* spp. (Eiras et al., 2014). La otra desventaja está asociada al equipamiento necesario para el desarrollo de esta técnica y a la necesidad de contar con personal capacitado para la interpretación del resultado (Gradoni, 2002).

### Test serológicos rápidos

Los métodos rápidos son técnicas serológicas cualitativas para la detección de anticuerpos anti-*Leishmania*. Se ha determinado una sensibilidad que varía entre el 30%-70 % (Solano-Gallego et al., 2014). Como ventajas podemos mencionar que son muy prácticos de utilizar en la clínica veterinaria ya que permiten obtener resultados en el momento y son de fácil realización (Gradoni, 2002). Sin embargo, como desventaja se puede mencionar que no permite conocer el título de anticuerpos. Se sabe también que es poco probable detectar anticuerpos en caninos asintomáticos con títulos bajos, obteniendo entonces muchas veces resultados falsos negativos, por lo que no deberían ser utilizados como único método de diagnóstico. Como en otras pruebas para *Leishmania*, también pueden observarse reacciones cruzadas con otros microorganismos como *Trypanosoma cruzi*, *Ehrlichia canis*, *Babesia canis*, *Toxoplasma gondii* y *Neospora caninum* lo que disminuye la especificidad de la prueba (Zanette et al., 2013).

## Referencias

- Alvar, J., Cañavate, C., Molina, R., Moreno, J. & Nieto, J. (2004). Canine Leishmaniasis. *Advances in Parasitology*, 57, 1-88. [https://doi.org/10.1016/S0065-308X\(04\)57001-X](https://doi.org/10.1016/S0065-308X(04)57001-X).
- Antoine, J.C., Prina, E., Jouanne, C., & Bongrand, P. (1990). Parasitophorous vacuoles of *Leishmania amazonensis*-infected macrophages maintain an acidic pH. *Infection and immunity*, 58, 779-87. <https://doi.org/10.1128/iai.58.3.779-787.1990>.
- Baneth, G., Koutinas, A.F., Solano-Gállego, L., Bourdeau, P., & Ferrer, L. (2008). Canine leishmaniasis new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. *Trends Parasitology*, 24, 324-330. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2008.04.001>.

- Cavalier-Smith, T. (1998). A revised six-kingdom system of life. *Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society*, 73, 203-266. <https://doi.org/10.1017/s0006323198005167>.
- Ciaramella, P., Pelagalli, A., Cortese, L., Pero, M.E., Corona, M., Lombardi, P., Avallone, L., & Persechino, A. (2005). Altered platelet aggregation and coagulation disorders related to clinical findings in 30 dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. *The Veterinary Journal*, 169, 465-467. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2004.03.009>.
- Cortadellas, O., del Palacio, M. J., Bayón, A., Albert, A., & Talavera, J. (2006). Systemic hypertension in dogs with leishmaniasis: prevalence and clinical consequences. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 20, 941-947. [https://doi.org/10.1892/0891-6640\(2006\)20\[941:shidwl\]2.0.co;2](https://doi.org/10.1892/0891-6640(2006)20[941:shidwl]2.0.co;2).
- Costa, D. J., Carvalho, R. M., Abbehusen, M., Teixeira, C., Pitombo, M., Trigo, J., Nascimento, F., Amorim, L., Abreu-Silva, A. L., do Socorro Pires Cruz, M., Miranda, J. C., Fukutani, K., de Oliveira, C.I., Barral, A., Barral-Netto, M., & Brodskyn, C. (2013). Experimental infection of dogs with *Leishmania* and saliva as a model to study Canine Visceral Leishmaniasis. *PLoS One*, 8(4), 605-35. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0060535>.
- Coura-Vital, W., Marques, M. J., Veloso, V. M., Roatt, B. M., Aguiar-Soares, R. D., Reis, L. E., Braga, S. L., Morais, M. H., Reis, A. B., & Carneiro, M. (2011). Prevalence and factors associated with *Leishmania infantum* infection of dogs from an urban area of Brazil as identified by molecular methods. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 5, 1291. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001291>.
- de Almeida Ferreira, S., Leite, R. S., Ituassu, L. T., Almeida, G. G., Souza, D. M., Fujiwara, R. T., de Andrade, A. S., & Melo, M. N. (2012). Canine skin and conjunctival swab samples for the detection and quantification of *Leishmania infantum* DNA in an endemic urban area in Brazil. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 6(4), e 1596. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001596>.
- Eiras, D. F., Dellarupe, A., Estévez, J. O., Nevot, M. C., Russo, P. D., López, G., Desimone, M., Olaya Martínez, E. J., Castillo, P. J., & Moré, G. A. (2014). 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.
- Fainboim, L., & Geffner, J. (2011). Introducción a la Inmunología humana. 6ª Ed. Editorial Médica Panamericana.
- Gonçalves, A. A. M., Leite, J. C., Resende, L. A., Mariano, R. M. D. S., Silveira, P., Melo-Júnior, O. A. O., Ribeiro, H. S., de Oliveira, D. S., Soares, D. F., Santos, T. A. P., Marques, A. F., Galdino, A. S., Martins-Filho, O. A., Dutra, W. O., da Silveira-Lemos, D., & Giunchetti, R. C. (2019). An Overview of Immunotherapeutic Approaches Against Canine Visceral Leishmaniasis: What Has Been Tested on Dogs and a New Perspective on Improving Treatment Efficacy. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 9, 427. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00427>.

- Gradoni, L. (2002). 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; 7-14.
- Hernández, L., Montoya, A., Checa, R., Dado, D., Gálvez, R., Otranto, D., Latrofa, M. S., Baneth, G., & Miró, G. (2015). Course of experimental infection of canine leishmaniasis: follow-up and utility of noninvasive diagnostic techniques. *Veterinary Parasitology*, 207(1-2), 149-55. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.10.035>.
- Killick-Kendrick, R. (1990). Phlebotomine vectors of the leishmaniasis: a review. *Medical and Veterinary Entomology*, 4, 1-24. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2915.1990.tb00255.x>.
- Koutinas, A. F., Carlotti, D. N., Koutinas, C., Papadogiannakis, E. I., Spanakos, G. K. & Saridomichelakis, M. N. (2010). Claw histopathology and parasitic load in natural cases of canine leishmaniasis associated with *Leishmania infantum*. *Veterinary Dermatology*, 21(6), 572-577. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3164.2009.00863.x>.
- Leishmaniasis. Informe Epidemiológico de las Américas, diciembre 2020. <https://iris.paho.org/handle/10665.2/53089>.
- Koutinas, A. F., & Koutinas, C. K. (2014). Pathologic mechanisms underlying the clinical findings in canine leishmaniasis due to *Leishmania infantum* / *chagasi*. *Veterinary Pathology*, 51, 527-538. <https://doi.org/10.1177/0300985814521248>.
- Maia, C., & Campino, L. (2008). Methods for diagnosis of canine leishmaniasis and immune response to infection. *Veterinary Parasitology*, 158, 274-287. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2008.07.028>.
- Marcondes, M., & Day, M. J. (2019). Current status and management of canine leishmaniasis in Latin America. *Research in Veterinary Science*, 123, 261-272. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2019.01.022>.
- Marcondes, M., Biondo, A. W., Gomes, A. A., Silva, A. R., Vieira, R. F., Camacho, A. A., Quinn, J., & Chandrashekar, R. (2011). Validation of a *Leishmania infantum* ELISA rapid test for serological diagnosis of *Leishmania chagasi* in dogs. *Veterinary Parasitology*, 175, 15-19. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.09.036>.
- Molyneux, D. H., & Ashford, R. W. (1983). *Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 77 (5), 698. [https://doi.org/10.1016/0035-9203\(83\)90208-0](https://doi.org/10.1016/0035-9203(83)90208-0).
- Moreira, M. A., Luvizotto, M. C., Garcia, J. F., Corbett, C. E., & Laurenti, M. D. (2007). Comparison of parasitological, immunological and molecular methods for the diagnosis of leishmaniasis in dogs with different clinical signs. *Veterinary Parasitology*, 145, 245-252. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.12.012>.
- Oliva, G. (2016). Capítulo 1.3. Sintomatología (I). La Leishmaniosis canina: aspectos clínicos. La leishmaniosis Canina, una visión práctica. Ediciones, Barcelona.
- Oliveira, T. M., Pereira, V. F., Benvenha, G. U., Martin, M. F., Benassi, J. C., da Silva, D. T., & Starke-Buzetti, W. A. (2015). Conjunctival swab PCR to detect *Leishmania* spp. in cats. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 24, 220-2. <https://doi.org/10.1590/S1984-29612015016>.

- Organización Panamericana de la Salud y Organización Mundial de la Salud. (2019). Manual de procedimientos para vigilancia y control de las leishmaniasis en las Américas. Washington, D.C.
- Pennisi, M. G., Reale, S., Giudice, S. L., Masucci, M., Caracappa, S., Vitale, M., & Vitale, F. (2005). Real-time PCR in dogs treated for leishmaniasis with allopurinol. *Veterinary Research Communications*, 29, 301-303. <https://doi.org/10.1007/s11259-005-0067-4>.
- Ross, R. (1903). Further Notes On Leishman's Bodies. *British Medical Journal*, 28, 2(2239):1401. <https://doi.org/10.1136/bmj.2.2239.1401>.
- Salomon, O. D., Sosa Estani, S., Rossi, G. C., & Spinelli, G. R. (2001). Presencia de *Lutzomyia longipalpis* y situación de la leishmaniasis visceral en Argentina. *Medicina (Buenos Aires)*, 61, 174-178.
- Salomon, O., Sinagra, A., Nevot, M., Barberian, G., Paulin, P., Estevez, J., Riarte, A., & Estevez, J. (2008). First visceral leishmaniasis focus in Argentina. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 103(1), 109-11. <https://doi.org/10.1590/s0074-02762008000100018>.
- Solano-Gallego, L., Koutinas, A., Miró, G., Cardoso, L., Pennisi, M. G., Ferrer, L., Bourdeau Oliva, G., & Baneth, G. (2009). Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniasis. *Veterinary Parasitology*, 165, 1-18. <https://doi.org/10.1016/j.vet-par.2009.05.022>.
- Solano-Gallego, L., Miró, G., Koutinas, A., Cardoso, L., Pennisi, M. G., Ferrer, L., Bourdeau, P., Oliva, G., & Baneth, G. (2011). The LeishVet Group. LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniosis. *Parasitology Vectors*, 20, 4-86. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-4-86>.
- Solano-Gallego, L., Villanueva-Saz, S., Carbonell, M., Trotta, M., Furlanello, T., & Natale, A. (2014). 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. *Parasitology Vectors*, 7, 111. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-7-111>.
- Teixeira, M. J., Teixeira, C. R., Andrade, B. B., Barral-Netto, M., & Barral, A. (2006). Chemokines in host-parasite interactions in leishmaniasis. *Trends in Parasitology*, 22, 32-40. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2005.11.010>.
- WHO Expert Committee on the Control of the Leishmaniasis & World Health Organization, (2010). Control of the leishmaniasis: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis, Geneva, 22-26 March 2010. World Health Organization. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/44412>.
- Zanette, M. F., Felix de Lima, V. M., Laurenti, M. D., Nazaretian Rossi C., Peloi Vides, J, da Costa Vieira, R. F., Welker Biondo, A., & Marcondes, M. (2014). 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 Tropical*, 47, 105-7. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-1723-2013>.