

UNIVERSIDAD NACIONAL DE RIO CUARTO
FACULTAD DE AGRONOMIA Y VETERINARIA



Trabajo final para acceder al título de Especialista en
Clínica Médica de Perros y Gatos

**ESTUDIO DE CASOS DE LEISHMANIOSIS CANINA EN RÍO
CUARTO, CÓRDOBA**

MV Aníbal Bessone
Directora: Esp. MV Corina Guendulain

Río Cuarto, marzo 2019

ESTUDIO DE CASOS DE LEISHMANIOSIS CANINA EN RÍO CUARTO, CÓRDOBA

Resumen

La leishmaniosis es una enfermedad zoonótica emergente y reemergente en el mundo que afecta a vertebrados silvestres y domésticos, entre ellos el perro, y a humanos, pudiendo producir un cuadro cutáneo o mucocutáneo o un cuadro visceral. El perro actúa como hospedador natural y reservorio principal. En Argentina es endémica en algunas regiones tropicales y subtropicales y es aún una enfermedad desatendida, asociada a varios factores, entre ellos la degradación del medio ambiente y el calentamiento global; estos factores participan en la epidemiología de esta enfermedad, modificando la ecología de los vectores y potenciando su transmisión en áreas no endémicas. La presencia de un gran número de perros sueltos en condición de calle y el aumento de la migración de personas desde regiones endémicas, junto a otras condiciones predisponentes podría generar la aparición de la enfermedad tanto en caninos como en humanos en la ciudad de Río Cuarto. El objetivo de este trabajo fue estudiar en un período de 3 años (2015- 2017) los casos de leishmaniosis canina no autóctonos atendidos en la UNRC, describiendo los signos clínicos guías para la presunción diagnóstica, las diferentes formas de presentación de la leishmaniosis y la metodología para llegar al diagnóstico de certeza. De los tres casos atendidos uno fue proveniente de España con presentación clínica de leishmaniosis cutánea y mucocutánea, otro caso fue de Brasil con la presentación clínica polisintomática de leishmaniosis visceral y el último de Italia con una forma clínica oligosintomática de leishmaniosis visceral.

Summary

Leishmaniosis is an emergent and reemerging zoonotic disease in the world that affects wild and domestic vertebrates, among them the dog, and humans, being able to produce a cutaneous, mucocutaneous or visceral picture. The dog acts as a natural host and main reservoir. In Argentina it is endemic in some tropical and subtropical regions and it is still an unattended disease, associated to several factors, among them the degradation of the environment and global warming; these factors participate in the epidemiology of this disease, modifying the ecology of the vectors and enhancing their transmission in non-endemic areas. The presence of a large number of loose dogs in street conditions and the increase in the migration of people from endemic regions, together with other predisposing conditions, could lead to the appearance of the disease in both canines and humans in the city of Rio Cuarto. The objective of this work is to study in a period of 3 years (2015-2017) the cases of non-native canine leishmaniosis seen in the UNRC. Of the three cases attended one came from Spain with clinical presentation of cutaneous and mucocutaneous leishmaniosis, another case was from Brazil with the polysymptomatic clinical presentation of visceral leishmaniosis and the last one from Italy was a clinical oligosymptomatic form of visceral leishmaniosis.

1. INTRODUCCIÓN

La leishmaniosis es una zoonosis emergente que se define como una histoparasitosis producida por parásitos protozoos del género *Leishmania*, de localización intracelular (macrófagos), transmitidas por la picadura de insectos vectores flebótomos del género *Lutzomyia* en el nuevo mundo. Es de distribución mundial, afecta a vertebrados silvestres y domésticos, entre ellos el perro, y a humanos, pudiendo producir un cuadro cutáneo, leishmaniosis cutánea (LC), mucocutáneo, leishmaniosis mucocutánea (LMC) o un cuadro visceral, leishmaniosis visceral (LV); dichas manifestaciones clínicas dependen tanto del estado inmunológico del hospedador como de la especie causante de la infección, con al menos 20 especies patógenas para el humano (Desjeux, 2004).

El riesgo de infección parasitaria se asocia no sólo con factores socio-ambientales tales como migraciones masivas de personas y perros desde regiones endémicas, urbanización, deforestación, calentamiento global, sino también se encuentran factores individuales como infecciones, desnutrición, genética, entre otros. Los perros domésticos han sido implicados como reservorios del parásito, pudiendo ser asintomáticos o sufrir la enfermedad, dependiendo de la respuesta inmunológica del animal (Salomon *et al.*, 2012).

La infección en los caninos es causada por parásitos del subgénero *Leishmania* y del subgénero *Viannia*. Varias especies de *Leishmania* han sido aisladas de perros en América del Sur y caracterizadas molecularmente, entre estas se incluyen: *L. tropica*, *L. major*, *L. braziliensis*, *L. peruviana*, *L. colombiensis*, *L. mexicana*, *L. panamensis*, *L. guyanensis*, *L. amazonensis*, *L. pifanoi* y *L. infantum* (Dantas-Torres., 2009; Dias *et al.*, 2011).

En Argentina esta parasitosis se transmite por medio de la picadura de las hembras de insectos vectores del género *Lutzomyia* (*Lu.*); *Lu. neivai*, *Lu. whitmani*, *Lu. cortelezzii* y *Lu. migonei* son las principales transmisoras de la LC y LMC, y *Lu. longipalpis* de la LV.

En nuestro país la LV que afecta a las personas y animales es producida por *L. infantum* y se transmite por el vector *Lu. longipalpis* y la LC y LMC que afecta al humano y al perro es producida por *L. braziliensis* y se transmite fundamentalmente por *Lu. neivai*, *Lu. whitmani*, *Lu. cortelezzii* y *Lu. migonei* (Salomón, 2010).

Las manifestaciones clínicas de leishmaniosis en el perro y el humano son muy variables, ya que puede presentarse desde una infección subclínica crónica hasta una enfermedad grave, que puede ser fatal para ambos.

La leishmaniosis canina (Lcan) es una nosología muy compleja desde el punto de vista de la clasificación taxonómica, la epidemiología, el diagnóstico, la inmunopatología y el control, y el perro constituye un excelente modelo de estudio de la enfermedad, ya que actúa como hospedador natural y reservorio principal. Además, sirve para estudiar la enfermedad en humanos debido a que presentan gran similitud en las alteraciones clínico-patológicas y respuestas inmunes al parásito (Campino *et al.*, 2000; Leandro *et al.*, 2001; Moreno y Alvar, 2002).

La LC, la LMC y la LV caninas están ampliamente distribuidas en América del Sur y son unas de las enfermedades caninas más relevantes de la región, principalmente debido a su importancia zoonótica (Dantas-Torres, 2009). Actualmente, la leishmaniosis constituye la tercera enfermedad humana más importante de las transmitidas por vectores y la novena enfermedad infecciosa más grave a nivel mundial (Alvar *et al.*, 2006). Para la Organización Mundial de la Salud (WHO, 2010) esta enfermedad es endémica en 98 países, la mayoría de ellos en vías de desarrollo y se estima que 350 millones de personas están en riesgo de contraerla (Dye, 1996).

En Argentina, en el año 2004 se registró por primera vez el vector *Lu. longipalpis* en la ciudad de Clorinda (Formosa), asociado al foco de Asunción del Paraguay y el primer caso autóctono de LV humana en nuestro país se notificó en el año 2006 en la ciudad de Posadas, Misiones, con presencia de *Lu. longipalpis* y de LV canina (Salomón y Orellano, 2005).

Debido a que el insecto vector de la LV no está presente en la provincia de Córdoba, pero sí en provincias del noroeste (NOA) y del noreste (NEA), en Santa Fe y Entre Ríos, se presume que en poco tiempo podría estar presente el vector en la ciudad. Por otra parte, la presentación de casos no autóctonos en la ciudad de Río Cuarto, genera preocupación en los profesionales médicos y médicos veterinarios, y la necesidad de conocer los signos de alerta que lleven a sospechar de esta enfermedad, y el camino a recorrer para llegar a su diagnóstico, tratamiento y prevención.

El objetivo de este trabajo fue estudiar los casos de leishmaniosis canina atendidos en el Hospital Escuela de la FAV en la ciudad de Río Cuarto presentados entre los años 2015 y 2017. Se describen los signos clínicos guías para su presunción diagnóstica, se exponen las diferentes formas de presentación de la leishmaniosis y se detalla la metodología para llegar al diagnóstico de certeza.

2. MARCO TEÓRICO

2.1. ETIOLOGÍA

2.1.1. El parásito

La leishmaniosis es producida por la infección de varias especies de *Leishmania* (*L.*), un parásito protozoario de la familia *Trypanosomatidae*.

William Leishman y Charles Donovan identificaron por primera vez en 1903, de forma independiente pero simultánea, este parásito en el bazo de humanos hindúes con signos clínicos semejantes a los producidos por la malaria (Awasthi *et al.*, 2004), al que se denominó *L. donovani*. Aproximadamente 30 especies han sido identificadas y al menos 20 de estos organismos son patogénicos para los mamíferos. El género *Leishmania* incluye dos subgéneros, *Leishmania* y *Viannia*, que se diferencian por el lugar en el que se multiplican dentro del tracto digestivo del insecto vector.

La leishmaniosis visceral (LV) humana es causada por *L. donovani* y *L. infantum*. *L. donovani* en Asia y África es antroponótica es decir se transmite principalmente entre personas, que actúan como reservorios. *L. infantum* es zoonótica, se transmite de animales reservorios al hombre (WHO, 2010). En Argentina la LV que afecta a las personas y animales es producida por *L. infantum* y se transmite por el vector *Lu. longipalpis* que se encuentra en dispersión activa, desde el norte de Argentina hasta el centro de la Provincia de Entre Ríos (Salomón, 2010). Hay documentados casos de coinfecciones por *L. infantum* y *L. braziliensis* en perros. En Brasil y Argentina la leishmaniosis cutánea (LC) en el perro y en el hombre es causada por *L. braziliensis* fundamentalmente. Es una enfermedad frecuentemente diagnosticada en caninos que viven en zonas rurales, donde la LC en los humanos también es endémica (Madeira *et al.*, 2006; Dantas-Torres, 2009).

2.1.2. El vector

Los flebótomos (Díptera: *Psychodidae*) hembras son los únicos insectos vectores capaces de transmitir las especies conocidas del género *Leishmania* (Killick-Kendrick, 1990).

La mayoría de las especies de flebótomos analizadas hasta el momento permiten que múltiples especies de *Leishmania* maduren en su intestino medio, denominándose por tanto “vectores permisivos” (Volf y Myskova, 2007). *Lu. longipalpis* puede ser infectado con diversas especies de *Leishmania* como *L. major*, *L. mexicana*, *L. braziliensis*, y

también podría estar implicado en la transmisión de *L. amazonensis*. *Lu. neivai* y *Lu. migonei* son las principales transmisoras de la LC y *Lu. longipalpis* de la LV (Tolezano *et al.*, 2007).

Las especies vectores de *L. infantum* en nuestro entorno son antropozóofilas, con una mayor preferencia por el ganado y por los perros que por los humanos (Miró y Molina, 2006). Estos insectos poseen fototropismo positivo (Killick-Kendrick, 1999; Sharma y Singh, 2008), lo que permite capturarlos fácilmente mediante trampas de luz. La supervivencia del parásito durante el invierno se mantiene principalmente en perros infectados, ya que no se ha demostrado la transmisión transovárica de *Leishmania* spp. en el vector (Bates, 2007).

La alimentación de los flebótomos, tanto machos como hembras, se basa en recursos naturales azucarados, procedentes de plantas e insectos que son su aporte energético. Tan sólo las hembras son hematófagas, obteniendo de la sangre las proteínas plasmáticas necesarias para desarrollar los huevos (Killick-Kendrick, 1999).

El flebótomo adulto es de pequeño tamaño (2-3 mm), de color amarillento, con una densa pilosidad que recubre todo su cuerpo de aspecto giboso, incluso patas, alas y antenas. Posee patas largas y alas de aspecto lanceolado, que se insertan en el cuerpo con un ángulo de 45-60° con respecto al eje longitudinal (Munstermann, 2005; Miró y Molina, 2006). Tiene una probóscide corta y un aparato bucal picador-chupador con las piezas bucales completas sólo en las hembras (Foto 1).



Foto 1: *Lu. Longipalpis*

Las hembras grávidas realizan la ovoposición en lugares arenosos, en penumbra, con humedad relativa alta, temperatura constante y con abundante materia orgánica que

servirá de alimento para las futuras larvas (Sharma y Singh, 2008). Cada puesta consta de un promedio de 20-50 huevos, de aspecto fusiforme, con ambos extremos redondeados y una superficie ornamentada con crestas y entrantes (Munstermann, 2005). La actividad de los flebótomos adultos es crepuscular, comienza con la puesta del sol, prolongándose durante las primeras horas de la noche, desde el principio de la primavera hasta el final del otoño en la cuenca mediterránea (Mayo-Octubre) y durante todo el año en Sudamérica (Killick- Kendrick, 1999; Sharma y Singh, 2008).

2.1.3. Ciclo biológico de *Leishmania infantum*

El ciclo biológico de *Leishmania* spp. es asexual y heteroxeno, es decir, tiene lugar en dos hospedadores diferentes, uno intermedio que actúa como vector, y un hospedador definitivo. Se trata de un ciclo de vida digenético, con una forma de promastigote móvil y flagelada, localizada en el tubo digestivo del hospedador invertebrado (Killick-Kendrick, 1990) y una forma inmóvil y aflagelar o amastigote, que afecta al hospedador vertebrado, localizándose principalmente en los macrófagos.

Cuando la hembra de flebótomo infectada regurgita sangre en un hospedador vertebrado inocula junto con su saliva los promastigotes metacíclicos presentes en su proboscis (Foto 2). Una vez en los capilares cutáneos del punto de inoculación del vertebrado, los parásitos son fagocitados por los macrófagos, quedando incluidos en una vacuola parasitófora (Holzmuller *et al.*, 2006). En ella los parásitos evaden las reacciones inmunológicas inespecíficas del macrófago y 12-24 horas tras la inoculación se transforman en amastigotes (Sharma y Singh, 2008), los cuales se multiplican por sucesivas fisiones binarias (Antoine *et al.*, 1990) (Foto 3). Tras la multiplicación dentro de los macrófagos infectados, estos se lisan y permiten la liberación del parásito en forma de amastigotes, pudiendo ser fagocitados por macrófagos o neutrófilos próximos y alcanzar diversos órganos del sistema linfohematopoyético, como médula ósea (MO), linfonódulos (LN), bazo e hígado, entre otros.

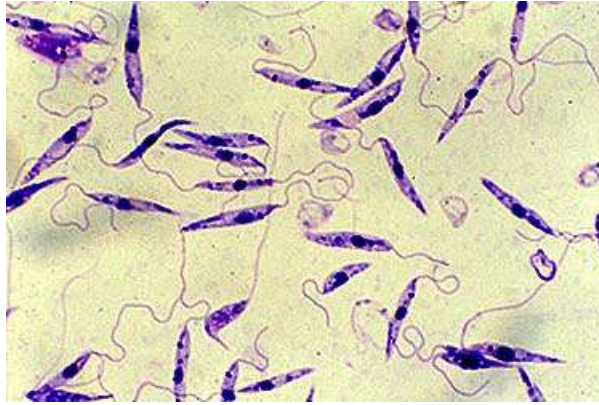


Foto 2: Promastigotes libres

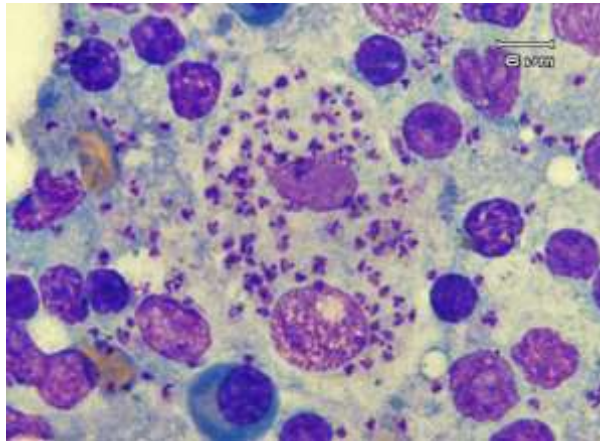


Foto 3: Amastigotes en macrófagos

2.2. EPIDEMIOLOGÍA

2.2.1. Relevancia mundial de la leishmaniosis

La leishmaniosis es una zoonosis de importancia mundial en salud pública y actualmente constituye la tercera enfermedad humana más importante de las transmitidas por vectores, tras la malaria y la filariosis, y la novena enfermedad infecciosa más grave a nivel mundial (Alvar *et al.*, 2006).

Para la Organización Mundial de la Salud (WHO, 2010) la leishmaniosis es endémica en 98 países, la mayoría de ellos en vías de desarrollo, y se estima que 350 millones de personas están en riesgo de contraerla. La incidencia mundial anual se calcula en 2 millones de casos, de los cuales 500.000 corresponden a LV y 1,5 millones a LC, aumentando la incidencia en áreas urbanas y periurbanas de los trópicos (Dye, 1996).

Se estima que la LV causa unas 50.000 muertes anuales (WHO, 2010); no obstante, la información epidemiológica sobre esta enfermedad es limitada, ya que muchos de los casos no son notificados (Alvar *et al.*, 2012).

En Europa la leishmaniosis, causada por *L. infantum*, es una zoonosis emergente, apareciendo 700 nuevos casos anuales (Hotez y Gurwith, 2011).

La LV antroponótica (*L. donovani* y *L. tropica*), en la cual el ser humano actúa como reservorio de la enfermedad, es de especial importancia, ya que causa epidemias frecuentes y mortales, fundamentalmente en regiones del Sudeste Asiático y en el este de África (Desjeux, 2004; Alvar *et al.*, 2012). Brasil posee la mayor tasa de incidencia de LV zoonótica (*L. infantum*) del mundo, con alrededor de 3.000 casos anuales (Andrade *et al.*, 2011).

En Argentina, en el año 2004 se registró por primera vez el vector en la ciudad de Clorinda (Formosa), asociado al foco de Asunción del Paraguay (Salomón y Orellano, 2005). El primer caso autóctono de LV humana en nuestro país se notificó en el año 2006 en la ciudad de Posadas, Misiones, con presencia de *Lu. longipalpis* y de LV canina.

La LV es una enfermedad de notificación obligatoria en la Argentina, que se efectúa a través del Sistema Nacional de Vigilancia de la Salud (SNVS) del Ministerio de Salud de la Nación. Desde mayo del 2006 hasta julio del 2011 fueron confirmados 81 casos humanos de LV (Salomón *et al.*, 2012).

La Lcan canina está ampliamente distribuida en América del Sur y es una de las enfermedades zoonóticas caninas más importantes de la región (Dantas-Torres, 2009).

A pesar de las elevadas prevalencias registradas por las distintas técnicas, el 90-95% de los perros infectados por *L. infantum* no desarrollan signos clínicos ni alteraciones clinicopatológicas, siendo la prevalencia de la enfermedad clínica inferior al 10% en regiones endémicas (Solano- Gallego *et al.*, 2009). De esta manera la Lcan solo representa la punta del iceberg en áreas endémicas, donde la mayor parte de la población está expuesta a la infección (Baneth *et al.*, 2008).

2.2.3. Vías de transmisión de la leishmaniosis canina

A excepción de Australia, los flebótomos son los únicos artrópodos adaptados para la transmisión biológica de la infección por *Leishmania* spp. (Gómez-Saladín *et al.*, 2005; Martín-Sánchez *et al.*, 2009). La transmisión es estacional y está condicionada tanto por la densidad de las poblaciones del vector como por la dinámica demográfica de los

hospedadores vertebrados, de manera que cuando coinciden estos factores en el tiempo, la infección se propaga rápida y ampliamente entre la población canina (Quinnell *et al.*, 1997; Oliva *et al.*, 2006).

La transmisión vertical (transplacentaria o lactogénica) se ha demostrado en perros con infección natural por *L. infantum* en regiones endémicas. Es posible la transmisión de la enfermedad en perros por vía venérea (Silva *et al.*, 2009; Naucke y Lorentz, 2012). La transmisión sexual en perros tiende a ser unidireccional, siendo más eficiente desde machos infectados a hembras susceptibles (Turchetti *et al.*, 2014).

La transfusión de sangre de animales infectados es otra vía de transmisión (Owens *et al.*, 2001). En humanos, también existe la transmisión mediante fómites, como en el caso del uso compartido de jeringas entre la población toxicómana usuaria de drogas parenterales (Cruz *et al.*, 2002; Molina *et al.*, 2003) y transplante de órganos (Antinori *et al.*, 2008).

2.2.4. Reservorios

El perro (*Canis familiaris*) es el principal reservorio peridoméstico de la infección por *L. infantum*, debido al elevado número de individuos presentes en el nicho ecológico y su estrecha relación con el vector (Alvar *et al.*, 2004).

Existen diversas especies de mamíferos en las que se ha identificado *Leishmania* spp. incluyendo primates (Malta *et al.*, 2010), marsupiales (Dougall *et al.*, 2009), roedores (Papadogiannakis *et al.*, 2010) y aves (Alexander *et al.*, 2002; Otranto *et al.*, 2010). En áreas endémicas se ha documentado la infección en otros animales domésticos, incluyendo gatos, caballos (Fernández-Bellon *et al.*, 2006), cerdos (Moraes-Silva *et al.*, 2006), vacas, ovejas y cabras (Lobsiger *et al.*, 2010), que actuarían como hospedadores paraténicos, aunque se desconoce su papel epidemiológico.

La creciente descripción de casos de leishmaniosis felina en la literatura hace pensar que los gatos pueden desempeñar un papel en la epidemiología de esta enfermedad, de forma que en áreas endémicas de Lcan, podría actuar como un reservorio secundario de la enfermedad (Martín- Sánchez *et al.*, 2009; Solano-Gallego *et al.*, 2007).

En Argentina el perro doméstico es considerado el reservorio principal de la LV urbana. Los animales afectados generalmente presentan una frondosa sintomatología clínica, pero en algunos casos son asintomáticos, lo cual genera marcadas dificultades diagnósticas (Salomón, 2010).

2.2.5. Factores de riesgo

El principal factor de riesgo que influye en el aumento de la incidencia de la leishmaniosis lo constituye la presencia de flebótomos infectados con *L. infantum* (Suárez *et al.*, 2012).

Existen una serie de factores asociados al vector que favorecen el riesgo de transmisión de la infección, entre los que se encuentran factores climáticos, abundancia de materia orgánica en descomposición, escombros en los alrededores de las viviendas y la presencia de reservorios (Sharma y Singh, 2008). Las actividades humanas que causen un impacto ambiental, como cambios demográficos y el calentamiento global de la Tierra, pueden incrementar la población de flebótomos (Arce *et al.*, 2013). Numerosos estudios epidemiológicos han descrito una serie de factores asociados al hospedador que predisponen al desarrollo de la enfermedad en los perros infectados, entre los que se encuentran la edad, el sexo, la raza, la predisposición genética, situaciones de inmunosupresión y el hábitat (Solano-Gallego *et al.*, 2009).

2.3 ALTERACIONES CLINICAS Y CLINICOPATOLOGICAS DE LA LEISHMANIOSIS CANINA

Existen tres formas clínicas de Lcan: cutánea, mucocutánea y visceral. La forma visceral es una enfermedad sistémica que puede afectar potencialmente a cualquier órgano, tejido o fluido biológico y presenta gran variedad de signos clínicos inespecíficos y niveles de gravedad, debido a la respuesta inmune individual del hospedador. El parásito tiene una extensa distribución por el organismo en la Lcan, al contrario de lo que ocurre en personas con infección por *L. infantum*, donde el parásito se limita a invadir el hígado, el bazo y la médula ósea (Alvar *et al.*, 2004).

En el pasado, y todavía en algunos estudios recientes los veterinarios e investigadores emplean una clasificación general subjetiva basada en tres categorías de perros: “asintomáticos”, “oligosintomáticos” y “polisintomáticos” (Mancianti *et al* 1988).

- Caninos asintomáticos (positivos serológicamente).
- Caninos oligosintomáticos (positivos serológicamente) presentan de 1 a 3 signos.
- Caninos polisintomáticos (positivos serológicamente y por punción de médula ósea o ganglios) con más de 3 signos (Solano-Gallego *et. al.*, 2009).

Los signos clínicos observados con más frecuencia incluyen lesiones cutáneas, linfadenomegalia generalizada, pérdida de peso, atrofia muscular, apatía, esplenomegalia, hepatomegalia, poliuria y polidipsia, lesiones oculares, epistaxis y onicogriposis. Otros signos menos frecuentes incluyen alteraciones digestivas, neurológicas y cardiorrespiratorias (Solano-Gallego *et al.*, 2009; Saridomichelakis y Koutinas, 2014) (Tabla 1).

Tabla 1. Porcentaje de aparición de signos clínicos en perros con leishmaniosis por *L. infantum* (Ciaramella *et al.*, 2005; Blavier *et al.*, 2001; Solano-Gallego *et al.*, 2011; Baneth *et al.*, 2008; Noli y Saridomichelakis, 2014).

Signos clínicos	Frecuencia (%)
Generales:	
• Linfadenomegalia generalizada	49-90
• Pérdida de peso	2-78
• Caquexia	3-48
• Astenia	8-33
• Palidez de membranas mucosas	10-58
• Esplenomegalia	10-56
• Poliuria y polidipsia	4-12
• Fiebre	4-36
• Vómitos	10
• Diarrea	13
Cutáneos:	
• Dermatitis exfoliativa no prurítica, con o sin alopecia	39,6-73,1
• Dermatitis erosiva-ulcerativa	15,3-40
• Dermatitis nodular	2-17
• Dermatitis papular	0-1,6
• Dermatitis pustular	2-13
• Hiperqueratosis nasal	0-27,5
• Hiperqueratosis plantar	0-31
• Onicogriposis	8-71,1
• Pioderma bacteriana	24
Oculares:	
• Blefaritis	12
• Queratoconjuntivitis (común o seca)	10-20
• Uveítis anterior	4-8
Epistaxis	6-10
Articulares	1-16
Atrofia muscular	25
Alteraciones vasculares (vasculitis, tromboembolismo arterial)	No cuantificado
Alteraciones neurológicas	No cuantificado

Existen diferencias en los cuadros clínicos observados en la Lcan entre las distintas especies de *Leishmania* (p.e. *L. braziliensis* causa cuadros cutáneos y mucocutáneos; *L. infantum* produce un cuadro clínico visceral generalizado con o sin signos cutáneos).

Desde la piel, los parásitos son transportados por sangre o linfa a los linfonódulos y el bazo y, posteriormente, a otros órganos como hígado y riñones.

Uno de los signos clínicos más característicos de Lcan es la linfadenomegalia periférica (Lima *et al.*, 2004; Giunchetti *et al.*, 2008) y la esplenomegalia es un hallazgo muy común. Aunque dichas alteraciones son más frecuentes en perros enfermos, también se observan en perros infectados clínicamente sanos. La hepatomegalia, causada por congestión pasiva y hepatitis crónica, es muy frecuente también (Giunchetti *et al.*, 2008).

Las manifestaciones clínicas cutáneas son muy comunes, estando presentes en aproximadamente el 80-90% de los casos de Lcan (Miró y Molina, 2006). La manifestación cutánea más frecuente es una forma queratoseborreica caracterizada por una dermatitis exfoliativa, con descamación y eritema, de distribución generalmente simétrica, localizada inicialmente en la cabeza y extremidades y que se va extendiendo por todo el cuerpo. Por lo general, la descamación no se acompaña de prurito y precede a la alopecia, que tiende a ser parcial, en lugar de generalizada (Papadogiannakis *et al.*, 2005; Miró y Molina, 2006). La dermatitis ulcerativa es otra manifestación cutánea observada en algunos perros, y se caracteriza por la aparición de úlceras crónicas (únicas o múltiples), que afectan comúnmente a los márgenes del pabellón auricular, los relieves óseos y las uniones mucocutáneas (Ordeix i Esteve y Fondati, 2013). Afecta principalmente a perros jóvenes y conlleva una diseminación parasitaria restringida y un pronóstico bueno (Lombardo *et al.*, 2014). Clínicamente se caracteriza por la presencia de un número variable de pápulas asimétricas y apruríticas, localizadas en zonas desprovistas de pelo (Ordeix i Esteve y Fondati, 2013). Otra presentación cutánea es la forma nodular, caracterizada por la aparición de nódulos indoloros, únicos o múltiples y a veces ulcerados (Blavier *et al.*, 2001) localizados en zonas cubiertas de pelo.

Las lesiones óseas y articulares son frecuentes en perros infectados. A nivel óseo, se ha descrito osteomielitis granulomatosa secundaria a la distribución hemática de los parásitos y osteólisis (Agut *et al.*, 2003). La patología articular es muy frecuente, produciendo cojeras y poliartritis que pueden ser bilaterales y simétricas, o tanto erosivas como no erosivas (Agut *et al.*, 2003; Santos *et al.*, 2006; Saridomichelakis, 2009).

La atrofia muscular progresiva está asociada a polimiositis crónica caracterizada por la presencia de infiltrados mononucleares con amastigotes de *Leishmania*, vasculitis neutrofílica e inmunocomplejos en el tejido muscular junto con la producción de anticuerpos frente a fibras musculares. La musculatura más afectada por la atrofia progresiva es la facial (músculos temporales y maseteros), aunque no afecta a la masticación. La polimiositis de músculos esqueléticos afecta fundamentalmente a la musculatura apendicular ocasionando debilidad muscular progresiva, cojera e intolerancia

al ejercicio. Dicha polimiositis suele ser subclínica, con tan sólo unos pocos casos descritos (Vamvakidis *et al.*, 2000).

El cuadro digestivo es poco frecuente y normalmente se manifiesta como diarreas de intestino grueso, con o sin melena, que se corresponden a una colitis ulcerativa granulomatosa (Ferrer *et al.*, 1991)

La onicogriposis es un signo clínico tardío y de carácter crónico que se caracteriza por la hipertrofia y curvatura anormal de las uñas (Koutinas *et al.*, 2010).

La epistaxis, hematuria y diarrea hemorrágica están asociadas con la ulceración de tejidos y alteraciones en la hemostasia primaria y secundaria (Baneth *et al.*, 2008). Los cambios hemostáticos incluyen alteraciones en la agregación plaquetaria, que conduce a una disfunción plaquetaria, trombocitopenia, reducción en la fibrinólisis y factores de coagulación, probablemente debidas a la hepatitis crónica y fibrinólisis (Ciaramella *et al.*, 2005).

La prevalencia de lesiones oculares y perioculares oscilan entre el 16 y 80,5%, pudiendo llegar a ser la única manifestación clínica en un 15% de los casos clínicos (Peña *et al.*, 2000; Baneth *et al.*, 2008; Koutinas y Koutinas, 2014). La manifestación ocular más frecuente es la uveítis anterior, caracterizada por edema, miosis, formación de fibrina en la cámara anterior y múltiples nódulos en el cuerpo del iris (García-Alonso *et al.*, 1996; Peña *et al.*, 2000). La uveítis posterior que suele acompañar a la uveítis anterior se diagnostica con menor frecuencia. Otras manifestaciones oculares incluyen conjuntivitis (nodular), blefaritis (exfoliativa, ulcerativa o nodular), queratitis, queratoconjuntivitis seca, endoftalmitis, coriorretinitis multifocal acompañada de desprendimiento de retina y hemorragias retinianas (García-Alonso *et al.*, 1996; Peña *et al.*, 2000; Baneth *et al.*, 2008; Solano-Gallego *et al.*, 2011).

Los trastornos renales son comunes, hasta el punto de que la insuficiencia renal crónica (IRC) está presente en el 50% de los perros con leishmaniosis (Cortadellas *et al.*, 2006), siendo ocasionalmente la única manifestación clínica presente. La glomerulonefritis, originada por el depósito de inmunocomplejos circulantes debido a una antigenemia constante, es uno de los mecanismos patogénicos más graves de la Lcan, pudiendo progresar desde una proteinuria leve a un síndrome nefrótico y/o enfermedad renal terminal irreversible (Aresu *et al.*, 2013). Está descrito que muchos perros pueden padecer enfermedades sistémicas como insuficiencia renal sin presentar lesiones cutáneas agudas ni signos clínicos evidentes (Miró y Molina; 2006).

A pesar de no haberse encontrado una relación clara entre la Lcan y la afección cardiorrespiratoria (Alves *et al.*, 2010; Koutinas y Koutinas, 2014), se han descrito alteraciones en el ritmo cardíaco, poliarteritis necrotizante, granulomas y miocarditis no supurativa (Torrent *et al.*, 2005; López-Peña *et al.*, 2009).

El cuadro neurológico es poco frecuente (Saridomichelakis, 2009; Solano-Gallego *et al.*, 2009).

El hemograma suele caracterizarse por la presencia de anemia normocítica, normocrómica y no regenerativa, leucocitosis o leucopenia y trombocitopenia (Saridomichelakis y Koutinas, 2014).

La anemia está presente en la mayoría de los perros con leishmaniosis debido a una insuficiencia renal crónica o reducción en la eritropoyesis, y en pocas ocasiones puede agravarse por pérdidas de sangre o la destrucción inmunomediada de glóbulos rojos (Koutinas *et al.*, 2010).

En una minoría de casos de Lcan se producen alteraciones en el perfil bioquímico hepato-renal, destacando la elevación de las enzimas hepáticas (como ALT o FA) y azotemia renal (elevación de urea y creatinina). Las alteraciones del proteinograma son muy comunes en la Lcan, y consisten en hiperproteinemia sérica con hiperglobulinemia e hipoalbuminemia, y por tanto inversión en el cociente albúmina/globulinas (A/G). Es frecuente observar gammapatía policlonal, mientras que la hiperglobulinemia beta policlonal es menos común (Solano-Gallego *et al.*, 2011).

En el urianálisis es frecuente hallar proteinuria glomerular persistente (cociente proteínas/creatinina urinaria (UPC \geq 0,5) considerada un factor de riesgo importante en el desarrollo de alteraciones renales (Saridomichelakis y Koutinas, 2014) (Tabla 2).

Tabla 2. Porcentaje de aparición de alteraciones clinicopatológicas en la Lcan (Ciaramella *et al.*, 2005; Blavier *et al.*, 2001; Solano-Gallego *et al.*, 2011; Baneth *et al.*, 2008; Noli y Saridomichelakis y Koutinas, 2014)

Alteración clinicopatológica	Frecuencia (%)
Anemia	22-73
Leucocitosis	24
Neutrofilia	24
Linfopenia	44
Trombocitopenia	22-44
Hiperproteinemia	49-73
Hipoalbuminemia	28-68
Hiperglobulinemia	30-71
Reducción ratio albúmina/globulinas	63-76
Azotemia	12-24
Incremento de enzimas hepáticas	16-26
Proteinuria	46-72

2.4. DIAGNÓSTICO

El diagnóstico de certeza de la infección por *L. infantum* es necesario para:

- 1) confirmar la enfermedad clínica y
- 2) detectar perros infectados clínicamente sanos que viven en zonas endémicas, para prevenir la transmisión de portadores subclínicos (Solano-Gallego *et al.*, 2011). El diagnóstico de infección no es sinónimo de diagnóstico de enfermedad, ya que la mayoría de los perros infectados no desarrollan la enfermedad (Baneth *et al.*, 2008; Paradies *et al.*, 2010; Solano-Gallego *et al.*, 2011; Paradies *et al.*, 2012) y los resultados obtenidos de los métodos diagnósticos difieren considerablemente entre perros infectados clínicamente sanos y enfermos (Noli y Saridomichelakis, 2014).

El diagnóstico de la Lcan es complejo, por la diversidad de signos clínicos, el amplio rango de alteraciones clinicopatológicas inespecíficas y las diferentes respuestas inmunitarias del perro frente a la infección (Solano-Gallego *et al.*, 2011). Por ello es necesario el uso integrado de todos los resultados que deben incluir: datos epidemiológicos, signos clínicos compatibles, alteraciones clinicopatológicas, diagnósticos diferenciales, así como el uso de más de una prueba diagnóstica específica para demostrar

la infección (cultivo, citología, histopatología, serología, inmunohistoquímica y técnicas moleculares) (Noli y Saridomichelakis, 2014).

Las técnicas serológicas incluyen la prueba de Inmunofluorescencia indirecta (IFI), Aglutinación directa (AD), Inmunoensayo ligado a enzimas (ELISA), Inmunodifusión, Western Blot (WB), la prueba de análisis por ensayos Falcon (FAST) y un ensayo inmunocromatográfico rápido (tira reactiva RK39). Esta técnica serológica con antígeno RK 39 es un análisis inmunocromatográfico cualitativo disponible en el mercado en la forma de tiras de papel de nitrocelulosa impregnadas del antígeno, con una sensibilidad de 80-97% (Otranto *et al.*, 2005). Dicho kit es fácil de usar y rápido, lo que permite una actuación inmediata del veterinario, siendo muy útil en estudios de campo.

La observación microscópica directa de amastigotes de *Leishmania* spp mediante citología es una prueba diagnóstica concluyente, simple y de bajo costo, que permite la rápida obtención de resultados con elevada especificidad, especialmente en perros con signos clínicos (Saridomichelakis *et al.*, 2009). La observación se puede realizar en extensiones de material aspirado, principalmente de MO (sensibilidad del 60-80%), de bazo (sensibilidad 50- 70%), LN (sensibilidad de 40-60%), o piel (sensibilidad 40%), teñidas mediante métodos metacromáticos convencionales (Giemsa, May-Grunwald, Diff-Quick). Los amastigotes se observan en el interior del citoplasma de monocitos, neutrófilos, macrófagos, como cuerpos ovalados de 2-4 micras de diámetro (Magill, 2015).

La detección del parásito por técnicas de biología molecular en MO, LN y muestras de piel es el método diagnóstico más fiable, la detección de ADN de *Leishmania* spp. en tejidos mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), permite un diagnóstico sensible y específico, detectando la infección antes que la seroconversión (Strauss-Ayali *et al.*, 2004; Coura-Vital *et al.*, 2011). Las muestras en las que se ha observado una mayor sensibilidad incluyen la MO y LN (Alvar *et al.*, 2004; Magill, 2015). La PCR de MO es la técnica de referencia en el diagnóstico parasitológico de *L. infantum*, debido a su elevada sensibilidad y especificidad y a que puede llevarse a cabo en animales sin LN palpables (Carvalho Ferreira *et al.*, 2014).

La citología de piel debe considerarse únicamente cuando haya lesiones cutáneas de las que puedan tomarse muestras (p.e. úlceras, nódulos y pápulas) (Michalsky *et al.*, 2007; Lombardo *et al.*, 2014), ya que el análisis microscópico de los raspados cutáneos superficiales se ve dificultado por la presencia de artefactos en la muestra (Gramiccia, 2011).

2.5 DIAGNOSTICO DIFERENCIAL

El diagnóstico diferencial debería establecerse en animales enfermos que presenten un cuadro clínico compatible con Lcan y, sin embargo, los resultados de las pruebas diagnósticas sean dudosos o negativos.

Entre las enfermedades con las que más frecuentemente hay que realizar el diagnóstico diferencial destacan todas aquellas que cursen con lesiones cutáneas (enfermedades autoinmunes, endocrinopatías, dermatosis parasitarias como demodicosis, sarna sarcóptica, dermatofitosis y dermatitis por picadura de pulgas), neoplasias y otras enfermedades vectoriales, como ehrlichiosis, hepatozoonosis, rickettsiosis, enfermedad de Lyme y babesiosis (Solano-Gallego *et al.*, 2011).

Muchas de estas enfermedades, a su vez, pueden presentarse como procesos concomitantes en perros con Lcan, asociados a la inmunosupresión o a la transmisión vectorial, pudiendo agravar el cuadro clínico del animal. La enfermedad más frecuentemente asociada con la Lcan es la ehrlichiosis, observándose un daño tisular mayor y un incremento en el número de amastigotes de *Leishmania* detectados en piel de los perros coinfectados (Solano-Gallego *et al.*, 2009; Solano-Gallego *et al.*, 2011).

2.6 PREVENCION E INMUNOLOGIA

En las últimas décadas se ha realizado un considerable esfuerzo para lograr estrategias de prevención y control. Para disminuir la leishmaniosis es importante el control del vector, fundamentalmente en la transmisión doméstica y peri doméstica, mediante el uso de mosquiteros y de insecticidas y repelentes, fumigando los ambientes de alta densidad de insectos, y pipetas y collares repelentes sobre los animales (Arce *et al.*, 2013). Los piretroides sintéticos son muy útiles para reducir el riesgo de la infección por *L. infantum* en los perros, al igual que el uso de collares impregnados con insecticidas (WHO, 2010). La prevención de la Lcan debe incluir, además, la aplicación de medidas de higiene ambiental tales como remoción de basura, hojas, etc.

La eutanasia de los perros infectados esta entre las medidas sugeridas, aunque se pone en duda la efectividad de este recurso, en casos en que el diagnóstico de la enfermedad no sea el apropiado (WHO, 2010). El hecho de que muchas formas de leishmaniosis sean asintomáticas o tengan periodos de incubación prolongados limita el efecto de esas medidas.

La respuesta inmune protectora a la visceralización por *Leishmania* spp. es mediada por células; se requiere, una respuesta mixta de linfocitos cooperadores T, Th1/Th2, con un perfil dominante Th1, para la protección. Específicamente en perros resistentes en forma natural, la activación del sistema adaptativo, se manifiesta por una linfoproliferación parásito-específica, hipersensibilidad de tipo retardada, producción de las citoquinas interferón- γ y del FNT- α y una mayor actividad leishmanicida por medio del óxido nítrico, condiciones que predominan cuando se establece un predominio Th1. Por lo tanto, una vacuna canina efectiva debería introducir una fuerte y perdurable inmunidad con predominio Th1 para controlar tanto la infección como la transmisibilidad del parásito por el vector (Gradoni, 2015).

Diversos estudios han sido realizados a fin de obtener vacunas efectivas, ya que la vacunación es considerada como la estrategia más promisoría para controlar Lcan. Hasta ahora solo dos vacunas han demostrado una significativa protección contra la enfermedad bajo condiciones naturales, registradas como vacunas caninas, Leishmune® en Brasil, y CaniLeish® en Europa, compuestas ambas, de fracciones de parásito purificadas con adyuvantes derivados de saponinas (Gradoni, 2015). El mismo autor cuestiona los aspectos metodológicos usados por considerar que el número de animales en las pruebas ha sido insuficiente. Otro inconveniente, que se menciona, está relacionado a la verificación de la efectividad de la vacuna, debido al tiempo prolongado necesario para evaluarla y a las técnicas invasivas que deben usarse.

En la actualidad no existen en humanos vacunas efectivas registradas para combatir la LV, en el mundo. Frente a la carencia de vacunas en humanos, la principal medida a tomar para el control de la enfermedad es la terapia química (Takur *et al.*, 2015).

2.7 TRATAMIENTO

Se han ensayado y utilizado una gran variedad de productos leishmanicidas y leishmaniostáticos que generalmente se deben administrar a largo plazo, por varios meses o inclusive de por vida, pero hasta el momento no existen principios activos totalmente eficaces frente a la Lcan. La mayoría de los fármacos mejoran el cuadro clínico de los perros tratados, pero son incapaces de eliminar completamente el parásito y no evitan las recidivas (Noli y Saridomichelakis, 2014).

Algunos productos leishmanicidas utilizados en el sur de Europa y varios países de América del Sur, son el antimoniato de N metil glucamina (Glucantime) considerada

tradicionalmente la droga de elección, la pauta de administración recomendada es 75-100 mg/kg por vía s.c., de forma que se reparte la dosis total diaria dos veces durante 4-6 semanas, considerándose la primera línea de tratamiento cuando se combina con Allopurinol (10 mg/kg v.o. dos veces al día durante 6-12 meses) (Solano-Gallego *et al.*, 2011). Otra droga más moderna y de uso oral es la Miltefosina a dosis de 2 mg/kg por 28 días. Ni la N metil glucamina (Glucantime), ni la Miltefosina se encuentran disponibles en nuestro país para su uso en medicina veterinaria por el potencial para promover resistencia en los parásitos. En la Argentina, la principal droga utilizada es el Allopurinol, que funciona como leishmanioestático y es sumamente eficaz en la mayor parte de los casos para la remisión de las manifestaciones clínicas. Otras alternativas complementarias utilizadas en determinadas situaciones son: la Anfotericina B, muy eficaz pero bastante tóxica, la Marbofloxacina, el Ketoconazol, la Aminosidina, la Pentamidina y otras combinaciones antibióticas (ej. Espiramicina+Metronidazol) todas con cierta acción sobre el parásito (Solano-Gallego *et al.*, 2011).

Estos medicamentos generalmente se acompañan de otras drogas inmunomoduladoras como Domperidona (1 mg/kg/12 horas v.o. durante varios meses). En perros con infección natural por *L. infantum* se observó una remisión clínica, una reducción en el título de anticuerpos y la activación de la inmunidad celular. También se utilizan Levamisol, las citoquinas y vitamínicos.

En algunas presentaciones clínicas producidas por depósito de inmunocomplejos se usan inmunosupresores, los más empleados son los glucocorticoides, principalmente la prednisona y la prednisolona. Estos fármacos actúan deprimiendo la inmunidad humoral, y, por tanto, disminuyen la producción de anticuerpos y la formación de inmunocomplejos, aunque también deprimen la inmunidad celular. Además, se necesitan dosis altas (1 a 2 mg/kg) para deprimir la inmunidad humoral, aumentando el riesgo de efectos adversos, por tanto, deben evitarse ya que pueden incrementar la replicación del parásito, y sólo se recomiendan cuando aparecen lesiones concomitantes por inmunocomplejos como uveítis, poliartritis, glomerulonefritis, etc. (Ciaramella *et al.*, 2005).

La finalidad del tratamiento no es sólo incrementar la esperanza y calidad de vida, restaurar una respuesta inmune eficaz y evitar recidivas clínicas, sino también disminuir la carga parasitaria, reduciendo de esta manera su poder infectante para los flebótomos (Dantas-Torres, 2009).

3. METODOLOGIA

Este trabajo comprendió el estudio retrospectivo de 3 casos no autóctonos de leishmaniosis canina diagnosticados durante el periodo 2015-2017 atendidos en el Hospital Escuela de la Facultad de Agronomía y Veterinaria de la UNRC (Río Cuarto, Córdoba).

Se realizó el registro de cada animal en fichas confeccionadas al efecto donde figuran datos de reseña como raza, sexo, edad, peso y condición corporal, y datos de anamnesis, examen físico, signos clínicos, evolución, diagnóstico, pronóstico, tratamiento y seguimiento.

a) En cada caso se analizaron los resultados de:

- hemograma completo
- determinaciones bioquímicas: albúmina, proteínas totales, enzimas hepáticas (ALT, AST, FA y GGT), urea y creatinina
- urianálisis y proteína/creatinina (P/C) en orina
- test serológico (Uranotest con una sensibilidad del 96,7 % y una especificidad de 98,8 %). Este es un test cromatográfico de origen español que determina Ac. de *Leishmania infantum* en sangre entera, suero o plasma de perro de forma cualitativa (www.uranovet.com).

b) Se enviaron muestras de sangre con anticoagulante, de suero, de piel, nódulo linfático y médula ósea al **Instituto Nacional de Parasitología “Dr. Mario Fatala Chaben”** para la realización de:

- pruebas serológicas de test rápido inmunocromatográfico RK39
- pruebas parasitológicas de observación microscópica del parásito en muestras de médula ósea, nódulo linfático y piel.
- prueba molecular PCR

Las muestras se remitieron dentro de las 24 hs. de obtenidas, refrigeradas y en rigurosas condiciones de seguridad, en envase plástico irrompible y rotuladas.

Diagnóstico serológico:

Para la realización de la serología (LV) se enviaron 2 cc de suero en tubo seco, con tapa a rosca de seguridad refrigerado a 2-8 °C.

Diagnóstico parasitológico:

Para la observación microscópica del parásito se realizó punción-aspiración con aguja fina de ganglio y de médula ósea, impronta de piel y biopsia de piel. Con las tres primeras muestras se realizaron extendidos que se secaron al aire y se fijaron con metanol por 5 minutos, y la biopsia de piel se sumergió en solución de formol-buffer al 10% para la realización de histopatología (Solano-Gallego *et al.*, 2011, Lombardo *et al.*, 2014).

Para la realización de cultivo para aislamiento del agente se tomaron biopsias de piel, las cuales se sumergieron en frasco estéril con 2-3 cc de solución fisiológica más ATB, en una concentración final de 100U de Penicilina y 100µg de Estreptomicina por ml.

Diagnóstico molecular:

Para la realización de la PCR se tomaron muestras de sangre con EDTA, y de médula ósea, ganglio y piel mediante punción aspiración con aguja fina.

c) En cada animal se evaluaron los hallazgos ecográficos del abdomen, bazo, hígado y en especial riñones.

El estudio de casos comprendió un análisis y una descripción integral de los antecedentes de cada uno, del cuadro clínico y de los procedimientos de diagnóstico.

4. RESULTADOS

CASO 1: LUA

RESEÑA:

Canino, hembra, de 7 años de edad, 25,50 Kg. de peso, de raza Castro Laboreiro.

ANAMNESIS:

Esta perra nació y vivió aproximadamente 3 años en Barcelona (España), 2 años en Salvador de Bahía y San Pablo (Brasil), 1 año en Buenos Aires y luego en San Francisco del Monte, un pueblo de la provincia de San Luis (Argentina).

En su estancia en Buenos Aires, le aparecieron lesiones en los dos ollares y en las manos, por lo que fue tratada por piodermias con antibióticos y corticoides.

Al momento de la consulta en el Hospital Escuela de la UNRC tenía buen apetito y buen estado general. Sólo presentaba lesiones en piel. Tenía el plan de vacunación y tratamiento antiparasitarios en regla. Vivía dentro de la casa y en el patio, sin salida a la calle.

SIGNOS CLINICOS:

Temperatura 38,1 °C, frecuencia cardíaca 108 l/p y frecuencia respiratoria 30 r/m

Buen estado general

Hidratación: normal

Mucosas: rosa pálida

Ganglios: normales

Aparatos digestivo, respiratorio, circulatorio, urogenital, locomotor y nervioso: sin particularidades

Piel: presento lesión mucocutánea bilateral en los dos ollares y úlceras en distal de ambos miembros anteriores (Fotos 4, 5 y 6).



Foto 4: Lua, perra de raza Castro laboreiro con lesiones mucocutáneas nasales



Foto 5: Se observan lesiones mucocutáneas en la zona nasal



Foto 6: Se observan úlceras en los miembros anteriores

LABORATORIO Y EXÁMENES COMPLEMENTARIOS:

Se realizó hemograma, algunas determinaciones de la bioquímica sérica y urianálisis, obteniendo los siguientes resultados (Tabla 3, 4 y 5).

Tabla 3: HEMOGRAMA

Eritrocitos	4.730.000	/ μ l	Leucocitos	4.700	/ μ l
Hemoglobina	14,9	g/dl	Baciliformes	0%	0
Hematocrito	43	%	Neutrófilos segmentados	74%	3.478
VCM	69	fl	Linfocitos	4%	188
HCM	31,5	pg	Monocitos	16%	752
CHCM	34	%	Eosinófilos	6%	282
Proteínas plasmáticas	6,9	g/dl	Basófilos	0%	0
Fibrinógeno	200	mg/dl	Otros		
Observaciones: Abundante cantidad de plaquetas, algunas reactivas. Moderada formación de rouleaux.					

Tabla 4: BIOQUÍMICA SANGUÍNEA

AST	36	UI/L
ALT	15,9	UI/L
GGT	4	UI/L
FAS	413,2	UI/L
Proteína sérica	6,6	gr/dl
Albúmina	2,5	gr/dl
Globulina	4,1	gr/dl
Triglicéridos	41,5	mg/dl
Colesterol	114	mg/dl
Glucemia	65	mg/dl
Urea	29	mg/dl
Creatinina	1,2	mg/dl

Tabla 5: URIANÁLISIS

Examen físico y químico		Estudio del sedimento	
Aspecto	ligeramente turbio	Leucocitos	-
Densidad	1050	Piocitos	-
Color	Ámbar	Eritrocitos	-
Reacción ph	6	Células descamativas	-
Proteínas	-	Células de transición	-
Sangre oculta	-	Células renales	-
Glucosa	-	Células uretrales	-
Pigmentos biliares	-	Cristales	-
Urobilinógeno		Cilindros	-
Cuerpos cetónicos	-	Otros	
Nitritos	-		
Leucocitos	-		
Ácido ascórbico			

CITOLOGÍA

Médula ósea de esternón y costilla: las muestras remitidas presentan citologías compatibles con médula ósea. No se observaron inclusiones compatibles con *Leishmania*.spp

Bazo: Abundante cantidad de glóbulos rojos y escasos leucocitos.

Miembro anterior: Fondo de aspecto granular proteináceo, abundantes neutrófilos (+++++) y abundantes bacterias cocoides libres e intracelulares. Escasos macrófagos. Compatible con proceso supurativo infeccioso.

Nariz: Fondo de aspecto granular proteináceo, abundantes neutrófilos (+++++) y abundantes bacterias con pleomorfismo, cocos y bacilos libres e intracelulares. Escasos macrófagos, muy escasas células epiteliales redondas. Compatible con proceso supurativo infeccioso.

Impronta úlcera de nariz: Marcada citólisis, células de la inflamación PMN (+++++), linfocitos (+), microorganismos (+), GR escasos y células epiteliales de tipo descamativas escasas sin atipias.

BIOPSIA

En la biopsia de médula ósea (costilla y esternón) y de bazo no se observaron inclusiones compatibles con *Leishmania* spp.

ECOGRAFÍA

En la ecografía de bazo, hígado y riñones no se observaron alteraciones.

SEROLOGÍA

La prueba serológica rápida realizada en Río Cuarto por el método de Inmunocromatografía para el diagnóstico de *Leishmania infantum* dio resultado negativo.

La serología RK 39 realizada en el Instituto Nacional de Parasitología “Dr. Mario Fatala Chaben” dio resultado negativo.

PARASITOLÓGICO

El frotis de piel y mucosa fue positivo a la presencia de estructuras compatibles con *Leishmania* spp. (Instituto Nacional de Parasitología “Dr. Mario Fatala Chaben”).

PCR:

En la PCR realizada a partir de muestras de piel se detectó banda específica de *Leishmania* spp. (Instituto Nacional de Parasitología “Dr. Mario Fatala Chaben”).

DIAGNÓSTICO: Leishmaniosis mucocutánea

EVOLUCIÓN:

A pesar de que se le aclaró al propietario que la perra no representaba peligro de zoonosis, decidió realizarle eutanasia por temor.

CASO 2: GURI

RESEÑA:

Canino, macho entero, de 7 años de edad, 39 kilos de peso, de raza Dogo argentino (Foto 7).

ANAMNESIS:

El perro nació y vivió en Brasil varios años en la zona de Uruguayana. Según el relato de la propietaria, allí en un programa de detección de LV fue positivo a serología RK 39 y al

examen parasitológico por punción de ganglio poplíteo, estando clínicamente normal por entonces. Allí le recomendaron eutanasia, pero la dueña no aceptó y se comprometió a realizar tratamiento con repelentes para el flebótomo y al perro con drogas que no se usaran en humanos. Sin embargo, utilizó Miltefosina por 28 días y luego, durante 3 años Allopurinol y Domperidona. Asimismo, le recomendaron la castración, pero no accedió a ello y lo utilizó como reproductor. Le realizó serología para brucelosis y dio resultado negativo.

Al año de resultar positivo serológica y parasitológicamente en Uruguayana y en Pasos de los Libres comenzó a presentar signos clínicos compatibles con leishmaniosis. La propietaria notó disminución progresiva del peso corporal.

Luego se trasladó a Río Cuarto donde tuvo cuadros de diarrea crónica intermitentes con examen parasitológico normal y palidez de mucosas. Al año de su estadía en dicha ciudad, fue atendido en la Universidad Nacional de Río Cuarto.

SIGNOS CLÍNICOS:

Temperatura 38,7 °C, frecuencia cardíaca 90 l/p y frecuencia respiratoria 25 r/m

Condición corporal: regular

Hidratación: normal

Mucosas: pálidas

Ganglios: inguinales y poplíteos aumentados de tamaño

Esplenomegalia

Aparatos digestivo, respiratorio, circulatorio, urogenital, locomotor y nervioso: sin particularidades

Piel: presentó dos pequeñas lesiones en piel, una alrededor del ojo derecho, y otra en uno de los testículos de 2 cm de diámetro (Fotos 8 y 9).



Foto 7: Gurí en consulta



Foto 8: Lesión de piel en testículo



Foto 9: Leve lesión periocular

LABORATORIO Y EXÁMENES COMPLEMENTARIOS:

Se realizó hemograma, algunas determinaciones de la bioquímica sérica y urianálisis, obteniendo los siguientes resultados (Tabla 6, 7 y 8).

Tabla 6: HEMOGRAMA COMPLETO

Eritrocitos	2.470.000	/ μ l	Leucocitos	8.000	/ μ l
Hemoglobina	8,41	g/dl	Baciliformes	0 %	0
Hematocrito	20	%	Neutrófilos segmentados	89%	7.120
VCM	80,97	Fl	Linfocitos	04%	320
HCM	34,05	Pg	Monocitos	03%	240
CHCM	42,05	%	Eosinófilos	04%	320
Proteínas plasmáticas	>12	g/dl	Basófilos		
Fibrinógeno	100	mg/dl	Otros		
Observaciones: Escasa cantidad de plaquetas. Leve toxicidad celular.					

Tabla 7: BIOQUÍMICA SANGUÍNEA

AST	39,47	UI/L
ALT	34,61	UI/L
GGT	4	UI/L
FAS	102,98	UI/L
Proteína sérica	12,57	gr/dl
Albumina	1,37	gr/dl
Globulina	11,20	gr/dl
Triglicéridos	150	mg/dl
Colesterol	132,64	mg/dl
Glucemia	86	mg/dl
Urea	111,97	mg/dl
Creatinina	2,00	mg/dl

Tabla 8: URIANÁLISIS

Examen físico y químico		Estudio del sedimento	
Aspecto	Límpido	Leucocitos	+
Densidad	1015	Piocytes	
Color	Ámbar	Eritrocitos	escasos
Reacción ph	6	Células descamativas	
Proteínas	+++	Células de transición	++
Sangre oculta		Células de la pelvis	+
Glucosa		Células uretrales	
Pigmentos biliares		Cristales	
Urobilinógeno		Cilindroides	escasos
Cuerpos cetónicos		Otros	
Nitritos			
Leucocitos			
Ácido ascórbico			

Se realizaron varios análisis, los cuales dieron resultados similares, en los hemogramas se encontró siempre anemia, fluctuando los valores de hematocrito entre 18 y 27%, leucopenia sin desvío a la izquierda, respecto a la bioquímica sanguínea la hiperproteïnemia fluctuó entre 9,70 y 13,83 gr/dl, a base de globulinas, hipoalbuminemia entre 1,31 y 1,70 gr/dl, uremia aumentada entre 82,60 y 142 mg/dl y creatininemia elevada

entre 2 y 3 mg/dl. Enzimas hepáticas AST, ALT y Fosfatasa alcalina dentro de valores normales.

En el urianálisis la densidad siempre fue 1015, proteinuria e inflamación del tracto urinario con presencia de microorganismos (cistitis y pielonefritis).

ECOGRAFÍA:

Se observó esplenomegalia, con presencia de una pequeña masa en bazo, ambos riñones hiperecogénicos y los ganglios sublumbares aumentados de tamaño (Fotos 10, 11 y 12).



Foto 10: Se observa la corteza renal con ecogenicidad aumentada respecto al hígado

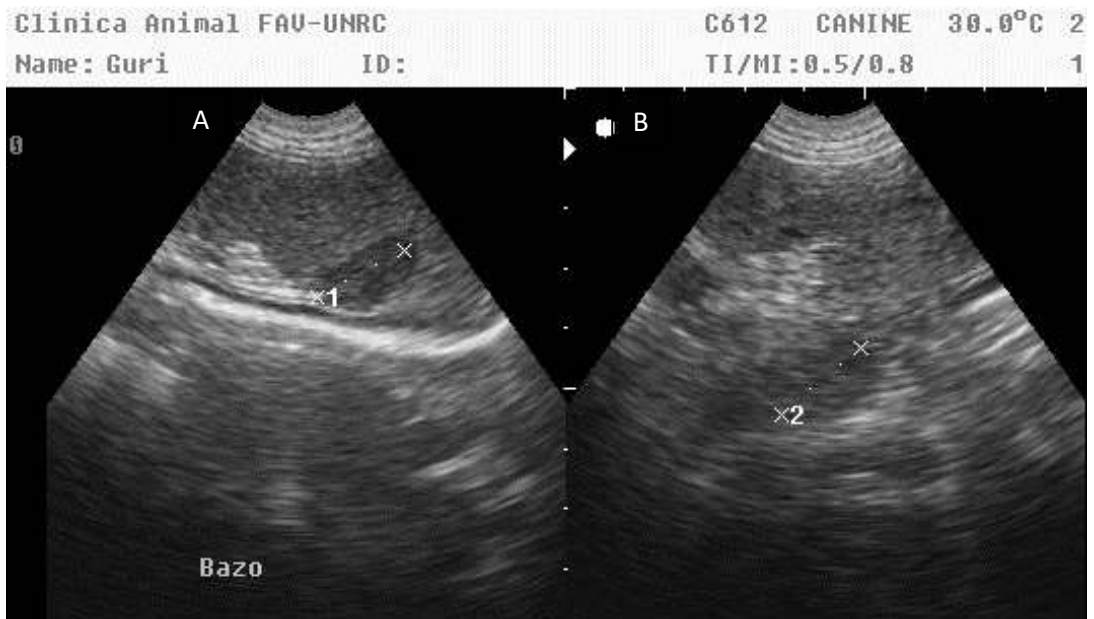


Foto 11: A) Se observa una estructura anecogénica en el interior del parénquima del bazo
 B) Ganglios esplénicos agrandados de tamaño próximos a la vena esplénica



Foto 12: Se observan los ganglios sublumbares aumentados de tamaño e hipocogénicos

SEROLOGÍA: positivo a anticuerpos de *Leishmania infantum* con Uranotest.

Los resultados de las muestras de piel de testículo, medula ósea, ganglio poplíteo, suero y sangre recibidos del Instituto Nacional de Parasitología “Dr. Mario Fatala Chaben” fueron:

Serología positiva a RK 39

Parasitológico de médula ósea, ganglio y piel positivo

PCR de médula ósea, ganglio y piel positivo

DIAGNÓSTICO: Leishmaniosis visceral

EVOLUCIÓN:

Es de hacer notar que se le sugirió dentro del marco legal ley 15465, Decreto 3460/64 la eutanasia, pero la dueña se negó a realizarla.

Se informó a SENASA Río Cuarto y al Ministerio de Salud Provincial para que realizaran las acciones pertinentes. Finalmente, al actuar estos organismos la propietaria decidió hacer la eutanasia.

CASO 3: ETORE

RESEÑA:

Canino, macho de raza Lagotto Romagnolo de 3 años de edad, peso 13 Kg,

ANAMNESIS:

Este perro hacía 6 meses que había ingresado a Argentina proveniente de la región central de Italia. Consumía alimento balanceado y tenía el plan de vacunas colocados correctamente. En Italia concurría a una veterinaria a acompañar a su dueña que es peluquera canina. Nunca presento ningún signo clínico. Ya aquí en Argentina a los 5 meses de llegar presento anorexia por lo cual fue a la consulta.

SIGNOS CLÍNICOS:

Temperatura 38,7 °C, frecuencia cardíaca 90 l/p y frecuencia respiratoria 24 r/m

Estado general: leve pérdida de peso

Hidratación: normal

Mucosas: normales (Foto 13)

Ganglios: normales

Aparatos respiratorio, circulatorio, urogenital, locomotor y nervioso: sin particularidades

Piel: no presenta lesiones (Foto 14).

Aparato digestivo: leve anorexia y diarrea intermitentes.



Foto 13: Mucosas normales



Foto 14: Etore sin lesiones de piel

LABORATORIO Y EXÁMENES COMPLEMENTARIOS:

Se realizó hemograma, algunas determinaciones de la bioquímica sérica y urianálisis, obteniendo los siguientes resultados (Tabla 9, 10 y 11).

Tabla 9: HEMOGRAMA

Eritrocitos	2.170.000	/ μ l	Leucocitos	13.800	/ μ l
Hemoglobina	9,9	g/dl	Baciliformes		
Hematocrito	18	%	Neutrófilos segmentados	83%	11.454
VCM	82,94	fl	Linfocitos	9%	1.242
HCM	45,62	pg	Monocitos	8%	1.104
CHCM	55,00	%	Eosinófilos	0%	0
Proteínas plasmáticas	7,8	g/dl	Basófilos		
Fibrinógeno	600	mg/dl	Otros		
Observaciones:					

Tabla 10: BIOQUÍMICA SANGUÍNEA

AST	15,07	UI/L
ALT	7,47	UI/L
GGT	1,5	UI/L
FAS	178,2	UI/L
Proteína sérica	6,53	gr/dl
Albúmina	1,77	gr/dl
Globulina	4,76	gr/dl
Alb/glob	0,37	
Triglicéridos	226	mg/dl
Colesterol	280	mg/dl
Glucemia	76	mg/dl
Urea	123,48	mg/dl
Creatinina	3,6	mg/dl

Tabla 11: URIANÁLISIS

Examen físico y químico		Estudio del sedimento	
Aspecto	ligeramente turbio	Leucocitos	-
Densidad	1028	Piocytes	-
Color	Ámbar claro	Eritrocitos	-
Reacción ph	6	Células descamativas	-
Proteínas	+++	Células de transición	-
Sangre oculta	Trazas	Células renales	-
Glucosa		Células uretrales	-
Pigmentos biliares		Células de la pelvis	-
Urobilinógeno		Células epiteliales	-
Cuerpos cetónicos		Cristales	-
Nitritos		Cilindros hialinos	++
Leucocitos		Microorganismos	
Ácido ascórbico			

Relación proteína/creatinina urinaria: 4

Se realizaron otros hemogramas completos, urianálisis, bioquímica sanguínea dando resultados similares, observándose anemia, fluctuando entre 21 y 18 de hematocrito, leucocitos dentro de valores normales sin desvío a la izquierda. Plaquetas normales. Leve hiperproteinemia 9 gr/dl, a base de globulinas, la albuminemia baja 1,77 gr/dl, uremia 123 mg/dl y creatinemia elevada 3.60 mg/dl. Enzimas hepáticas AST, ALT y Fosfatasa alcalina dentro de valores normales.

ECOGRAFÍA (Foto 15):

Bazo e hígado: sin particularidades

Riñón: ambos riñones con dimensiones normales, tanto la corteza como la médula en ambos riñones están poco diferenciadas y muy ecogénicas. La corteza presenta una imagen finamente granular e hiperecoica. Conclusión: imagen típica de esclerosis renal (Foto 16).



Foto 15: Ecografía Etores



Foto 16: Se observa la corteza del riñón derecho hiperecogénica respecto al hígado

SEROLOGÍA:

Positivo a anticuerpos de *Leishmania infantum* con Uranotest.

Los resultados de las muestras de suero, sangre, PAF de médula ósea y ganglio poplíteo, recibidos del Instituto Nacional de Parasitología “Dr. Mario Fatała Chaben” fueron:

Serología positiva a RK 39

Parasitológico de médula ósea y ganglio positivo

PCR de médula ósea y ganglio positivo

DIAGNÓSTICO:

Leishmaniosis Visceral oligosintomática

EVOLUCIÓN:

Se informó a SENASA Río Cuarto y al Ministerio de Salud Provincial para que realicen las acciones pertinentes.

Pese a la resistencia inicial la propietaria realiza la eutanasia del animal.

5. DISCUSIÓN

El caso número 1 (L. mucocutánea) resultó negativo por serología (Rk39) y positivo por PCR y por examen parasitológico de piel. Presentó manifestaciones clinicopatológicas que sólo asentaban en piel y mucosas. No se observaron alteraciones en bazo, hígado ni riñón y tampoco hubo alteraciones en el hemograma, en el urianálisis, ni en la bioquímica sanguínea, en coincidencia con la bibliografía descripta referente a esta presentación (Michalsky, 2007).

Los casos número 2 y 3 en que se diagnosticó L. visceral por serología (Rk39), parasitología y PCR de médula ósea y ganglio, presentaron disminución de peso, anemia no regenerativa, hipoalbuminemia e hiperproteïnemia debida a gammaglobulinemia y a una inversión del cociente A/G. Además, tenían urea y creatinina aumentada y proteinuria, en coincidencia con lo descripto por la bibliografía (Alvar *et al.*, 2012; Solano-Gallego *et al.*, 2011).

La anemia no regenerativa es la alteración hemática más frecuente en la Lcan (Saridomichelakis, 2009) lo que indica la importante implicancia de la médula ósea, tejido muy parasitado en individuos enfermos. La hiperproteïnemia con incremento de las proteínas totales es causada por una hipergammaglobulinemia debido a una mayor

producción de anticuerpos (Koutinas *et al.*, 2010). Teniendo en cuenta que los dos perros eran alimentados con una dieta balanceada de calidad, sin una reducción importante en la ingesta diaria de proteínas y calorías, se presume que la causa más probable de hipoalbuminemia en ambos casos fue la pérdida renal de albúmina, ya que los dos tenían alteraciones renales.

El caso número 3 la densidad urinaria de 1028, proteinuria de tres cruces, relación proteína/creatinina urinaria 4, sumado a la proteinuria, presencia de cilindros hialinos e hipoalbuminemia, hipercolesterolemia e hipertrigliceridemia fue indicativo de glomerulonefritis.

Sólo el caso 2 presentó linfadenopatía y esplenomegalia como expresa la bibliografía (Saridomichelakis, 2009), no así el caso 3, probablemente por el menor tiempo de evolución de la enfermedad en este caso.

El caso 2 sólo tenía 2 lesiones pequeñas en piel y en el caso 3 no hubo presentación cutánea, lo cual no coincide con la bibliografía ya que en el 80% de los casos de los perros con *L. visceral* hay variada signología cutánea (Saridomichelakis y Koutinas, 2014).

6. CONCLUSIONES

- Los signos clínicos de los 3 casos estudiados fueron muy distintos.
- La detección de ADN de *Leishmania* spp. en piel mediante PCR y el examen parasitológico de piel es el método más confiable de diagnóstico en la *L. cutánea-mucocutánea*.
- La detección de ADN de *Leishmania infantum* mediante PCR en médula ósea y ganglio resulto ser el método más efectivo de diagnóstico en la *L. visceral*.
- En los perros con *L. visceral* es importante evaluar si hay una enfermedad renal asociada, mediante la determinación de urea y creatinina, urianálisis, relación proteína/ creatinina urinaria y ecografía renal.
- Los tres perros nacieron en países extranjeros donde la *L.* es endémica.

- Existió una falta de control en la frontera argentina que permitió el ingreso de animales enfermos de L. que se observó en los 3 casos de estudio, por lo que es necesario generar en nuestro país una legislación al respecto.
- En la prevención de esta enfermedad, el profesional veterinario tiene un papel central en educar al propietario para evitar esta zoonosis, por ser el perro el principal reservorio de esta enfermedad.
- Se observó en los tres casos un fuerte efecto emocional de los propietarios por la eutanasia, por lo que sería deseable encontrar medios alternativos de comunicación sobre esta temática y soluciones factibles y sostenibles que involucren a los dueños afectados y a los sectores públicos y privados.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Agut A, Corzo N, Murciano J, Laredo FG, Soler M. (2003). Clinical and radiographic study of bone and joint lesions in 26 dogs with leishmaniasis. *Vet Rec*, 153, 648-652.
- Alexander B, de Carvalho RL, McCallum H, Pereira MH. (2002). Role of the domestic chicken (*Gallus gallus*) in the epidemiology of urban visceral leishmaniasis in Brazil. *Emerg Infect Dis*, 8, 1480-1485.
- Alvar J, Cañavate C, Molina R, Moreno J, Nieto J. (2004). Canine leishmaniasis. *Adv Parasitol*, 57, 1-88.
- Alvar J, Yactayo S, Bern C. (2006). Leishmaniasis and poverty. *Trends Parasitol*, 22, 552-557.
- Alvar J, Vélez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, Jannin J, den Boer M, Team WLC. (2012). Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS One*, 7, e35671.

- Alves GB, Pinho FA, Silva SM, Cruz MS, Costa FA. (2010). Cardiac and pulmonary alterations in symptomatic and asymptomatic dogs infected naturally with *Leishmania (Leishmania) chagasi*. *Braz J Med Biol Res*, 43, 310-315.
- Andrade HM, Toledo VP, Pinheiro MB, Guimarães TM, Oliveira NC, Castro JA, Silva RN, Amorim AC, Brandão RM, Yoko M, Silva AS, Dumont K, Ribeiro ML, Bartchewsky W, Monte SJ. (2011). Evaluation of miltefosine for the treatment of dogs naturally infected with *L. infantum* (= *L. chagasi*) in Brazil. *Vet Parasitol*, 181, 83-90.
- Antinori S, Cascio A, Parravicini C, Bianchi R, Corbellino M. (2008). Leishmaniasis among organ transplant recipients. *Lancet Infect Dis*, 8, 191-199.
- Antoine JC, Prina E, Jouanne C, Bongrand P. (1990). Parasitophorous vacuoles of *Leishmania amazonensis*-infected macrophages maintain an acidic pH. *Infect Immun*, 58, 779-787.
- Arce A, Estirado A, Ordobas M, Sevilla S, García N, Moratilla L, de la Fuente S, Martínez AM, Pérez AM, Aránguez E, Iriso A, Sevillano O, Bernal J, Vilas F. (2013). Re-emergence of leishmaniasis in Spain: community outbreak in Madrid, Spain, 2009 to 2012. *Euro Surveill*, 18, 205-246.
- Aresu L, Benali S, Ferro S, Vittone V, Gallo E, Brovida C, Castagnaro M. (2013). Light and electron microscopic analysis of consecutive renal biopsy specimens from *Leishmania*-seropositive dogs. *Vet Pathol*, 50, 753-760.
- Awasthi A, Mathur RK, Saha B. (2004). Immune response to *Leishmania* infection. *Indian J Med Res*, 119, 238-258.
- Baneth G, Koutinas AF, Solano-Gallego L, Bourdeau P, Ferrer L. (2008). Canine leishmaniosis - new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. *Trends Parasitol*, 24, 324-330.
- Bates PA (2007). Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. *Int J Parasitol*, 37, 1097-1106.

- Blavier A, Keroack S, Denerolle P, Goy-Thollot I, Chabanne L, Cadoré JL, Bourdoiseau G. (2001). Atypical forms of canine leishmaniosis. *Vet J*, 162, 108-120.
- Campino L, Santos-Gomes G, Riça Capela MJ, Cortes S, Abranches P. (2000). Infectivity of promastigotes and amastigotes of *Leishmania infantum* in a canine model for leishmaniosis. *Vet Parasitol*, 92, 269-275.
- Carvalho Ferreira AL, Carregal VM, de Almeida Ferreira S, Leite RS, de Andrade AS, (2014). Detection of *Leishmania infantum* in 4 different dog samples by real-time PCR and ITS-1 nested PCR. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 78, 418-421.
- Ciaramella P, Pelagalli A, Cortese L, Pero ME, 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*. *Vet J*, 169, 465-467.
- Cortadellas O, del Palacio MJ, Bayón A, Albert A, Talavera J. (2006). Systemic hypertension in dogs with leishmaniasis: prevalence and clinical consequences. *J Vet Intern Med*, 20, 941-947.
- Coura-Vital W, Marques MJ, Veloso VM, Roatt BM, Aguiar-Soares RD, Reis LE, Braga SL, Morais MH, Reis AB, 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 Negl Trop Dis*, 5, e1291.
- Cruz I, Morales MA, Noguer I, Rodríguez A, Alvar J. (2002). *Leishmania* in discarded syringes from intravenous drug users. *Lancet*, 359, 1124-1125.
- Dantas-Torres F. (2009). Canine leishmaniosis in South America. *Parasit Vectors*, 2, Suppl 1, S1.
- Desjeux P. (2004). Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, 27, 305-318.

- Dias ES, Regina-Silva S, França-Silva JC, Paz GF, Michalsky EM, Araujo SC. (2011). Eco-epidemiology of visceral leishmaniasis in the urban area of Paracatu, state of Minas Gerais, Brazil. *Vet. Parasitol*, 176 (2-3):101-111.
- Dougall A, Shilton C, Low Choy J, Alexander B, Walton S. (2009). New reports of Australian cutaneous leishmaniasis in Northern Australian macropods. *Epidemiol Infect*, 137, 1516-1520.
- Dye C. (1996). The logic of visceral leishmaniasis control. *Am J Trop Med Hyg*, 55, 125-130.
- Fernández-Bellón H, Solano-Gallego L, Bardagí M, Alberola J, Ramis A, Ferrer L. (2006). Immune response to *Leishmania infantum* in healthy horses in Spain. *Vet Parasitol*, 135, 181-185.
- Ferrer L, Juanola B, Ramos JA, Ramis A. (1991). Chronic colitis due to *Leishmania* infection in two dogs. *Vet Pathol*, 28, 342-343.
- García-Alonso M, Nieto CG, Blanco A, Requena JM, Alonso C, Navarrete I. (1996). Presence of antibodies in the aqueous humour and cerebrospinal fluid during *Leishmania* infections in dogs. Pathological features at the central nervous system. *Parasite Immunol*, 18, 539-546.
- Giunchetti RC, Mayrink W, Carneiro CM, Corrêa-Oliveira R, Martins-Filho OA, Marques MJ, Tafuri WL, Reis AB. (2008). Histopathological and immunohistochemical investigations of the hepatic compartment associated with parasitism and serum biochemical changes in canine visceral leishmaniasis. *Res Vet Sci*, 84, 269-277.
- Gómez-Saladín E, Doud CW, Maroli M. (2005). Short report: surveillance of *Leishmania* sp. among sand flies in Sicily (Italy) using a fluorogenic real-time polymerase chain reaction. *Am J Trop Med Hyg*, 72, 138-141.

- Gradoni, L. (2015). *Canine Leishmania vaccines: Still a long way to go. Veterinary Pathology*: 208: 94–100.
- Gramiccia M. (2011). Recent advances in leishmaniosis in pet animals: epidemiology, diagnostics and anti-vectorial prophylaxis. *Vet Parasitol*, 181, 23-30.
- Holzmuller P, Hide M, Sereno D, Lemesre JL. (2006). *Leishmania infantum* amastigotes resistant to nitric oxide cytotoxicity: Impact on in vitro parasite developmental cycle and metabolic enzyme activities. *Infect Genet Evol*, 6, 187-197.
- Hotez PJ and Gurwith M. (2011). Europe's neglected infections of poverty. *Int J Infect Dis*, 15, e611-619.
- Killick-Kendrick R. (1990). Phlebotomine vectors of the leishmaniasis: a review. *Med Vet Entomol*, 4, 1-24.
- Killick-Kendrick R. (1999). The biology and control of phlebotomine sand flies. *Clin Dermatol*, 17, 279-289.
- Koutinas AF, Carlotti DN, Koutinas C, Papadogiannakis EI, Spanakos GK, Saridomichelakis, MN (2010). Claw histopathology and parasitic load in natural cases of canine leishmaniosis associated with *Leishmania infantum*. *Vet Dermatol*, 21, 572-577.
- Koutinas AF and Koutinas CK. (2014). Pathologic mechanisms underlying the clinical findings in canine leishmaniasis due to *Leishmania infantum/chagasi*. *Vet Pathol*, 51, 527-538.
- Leandro C, Santos-Gomes GM, Campino L, Romão P, Cortes S, Rolão N, Gomes-Pereira S, Riça Capela MJ, Abranches P. (2001). Cell mediated immunity and specific IgG1 and IgG2 antibody response in natural and experimental canine leishmaniosis. *Vet Immunol Immunopathol*, 79, 273-284.
- Lima WG, Michalick MS, de Melo MN, Luiz Tafuri W. (2004). Canine visceral leishmaniasis: a histopathological study of lymph nodes. *Acta Trop*, 92, 43-53.

- Lobsiger L, Müller N, Schweizer T, Frey CF, Wiederkehr D, Zumkehr B, Gottstein B. (2010). An autochthonous case of cutaneous bovine leishmaniasis in Switzerland. *Vet Parasitol*, 169, 408-414.
- Lombardo G, Pennisi MG, Lupo T, Chicharro C, Solano-Gallego L. (2014). Papular dermatitis due to *Leishmania infantum* infection in seventeen dogs: diagnostic features, extent of the infection and treatment outcome. *Parasit Vectors*, 7, 120.
- López-Peña M, Alemañ N, Muñoz F, Fondevila D, Suárez ML, Goicoa A, Nieto JM. (2009). Visceral leishmaniasis with cardiac involvement in a dog: a case report. *Acta Vet Scand*, 51, 20.
- Madeira MF, Schubach AO, Schubach TM, Pacheco RS, Oliveira FS, Pereira SA, Figueiredo FB, Baptista C, Marzochi MC. (2006). Mixed infection with *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Leishmania) chagasi* in a naturally infected dog from Rio de Janeiro, Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 100, 442-445.
- Magill, A. (2015). - *Leishmania* Species: Visceral (Kala-Azar), Cutaneous, and Mucosal Leishmaniasis. *Principles and practice of infectious disease*. Mandell, Douglas, and Bennett's (Eighth Edition): 277(2), 3091-3107.
- Malta MC, Tinoco HP, Xavier MN, Vieira AL, Costa EA, Santos RL. (2010). Naturally acquired visceral leishmaniasis in non-human primates in Brazil. *Vet Parasitol*, 169, 193-197.
- Mancianti F, Gramiccia M, Gradoni L, Pieri S. (1988). Studies on canine leishmaniasis control. 1. Evolution of infection of different clinical forms of canine leishmaniasis following antimonial treatment. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 82(4), 566-567.
- Martín-Sánchez J, Morales-Yuste M, Acedo-Sánchez C, Barón S, Díaz V, Morillas-Márquez F. (2009). Canine leishmaniasis in southeastern Spain. *Emerg Infect Dis*, 15, 795-798.

- Michalsky EM, Rocha, MF, da Rocha Lima AC, França-Silva JC, Pires MQ, Oliveira FS, Pacheco RS, dos Santos SL, Barata RA, Romanha AJ, Fortes-Dias, CL, Dias ES. (2007). Infectivity of seropositive dogs, showing different clinical forms of leishmaniasis, to *Lutzomyia longipalpis* phlebotomine sand flies. *Vet Parasitol*, 147, 67-76.
- Miró G, y Molina R. (2006). Leishmaniosis canina: Manejo clínico y situación actual en España. *Bayer HealthCare Edition*. 114 p.
- Molina R, Gradoni L, Alvar J. (2003). The transmission of *Leishmania*. *Ann Trop Med Parasitol*, 97 Suppl 1, 29-45.
- Moraes-Silva E., Antunes FR, Rodrigues MS, da Silva Julião F, Dias-Lima AG, Lemos-de-Sousa V, de Alcantara AC, Reis EA, Nakatani M, Badaró R, Reis MG, Pontes-de-Carvalho L, Franke CR. (2006). Domestic swine in a visceral leishmaniasis endemic area produce antibodies against multiple *Leishmania infantum* antigens but apparently resist to *L. infantum* infection. *Acta Trop*, 98, 176- 182.
- Moreno J and Alvar J. (2002). Canine leishmaniasis: epidemiological risk and the experimental model. *Trends Parasitol*, 18, 399-405.
- Munstermann L. (2005). Phlebotomine Sand Flies, the Psychodidae. In: Marquardt, W.C. (Ed.) *Biology of disease vectors*. Dana Dreibelbis, San Diego, California, USA, 141-151. San Diego, California, USA.
- Naucke TJ and Lorentz S. (2012). First report of venereal and vertical transmission of canine leishmaniosis from naturally infected dogs in Germany. *Parasit Vectors*, 5, 67
- Noli C and Saridomichelakis MN. (2014). An update on the diagnosis and treatment of canine leishmaniosis caused by *Leishmania infantum* (syn. *L. chagasi*). *Vet J*, 202, 425-435.
- Oliva G, Scalone A, Foglia Manzillo V, Gramiccia M, Pagano A, Di Muccio T, Gradoni L. (2006). 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*, 44, 1318-1322.

-Ordeix i Esteve L, Fondati A. (2013). Manifestaciones clínicas cutáneas. En: *Leishmaniosis. Una revisión actualizada* (ed. Servet), 69-95.

-Otranto D, Paradies P, Sasanelli M, Leone N, de Caprariis D, Chirico J, Spinelli R, Capelli G, Brandonisio O. (2005). Recombinant K39 dipstick immunochromatographic test: a new tool for the serodiagnosis of canine leishmaniasis. *J Vet Diagn Invest*, 17, 32-37.

-Otranto D, Testini G, Buonavoglia C, Parisi A, Brandonisio O, Circella E, Dantas-Torres F, Camarda A. (2010). Experimental and field investigations on the role of birds as hosts of *Leishmania infantum*, with emphasis on the domestic chicken. *Acta Trop*, 113, 80-83.

-Owens SD, Oakley DA, Marryott K, Hatchett W, Walton R, Nolan TJ, Newton A, Steurer F, Schantz P, Giger U. (2001). Transmission of visceral leishmaniasis through blood transfusions from infected English foxhounds to anemic dogs. *J Am Vet Med Assoc*, 219, 1076-1083.

-Papadogiannakis EI, Koutinas AF, Saridomichelakis MN, Vlemmas J, Lekkas S, Karameris A, Fytianou A. (2005). Cellular immunophenotyping of exfoliative dermatitis in canine leishmaniosis (*Leishmania infantum*). *Vet Immunol Immunopathol*, 104, 227-237.

-Papadogiannakis E, Spanakos G, Kontos V, Menounos PG, Tegos N, Vakalis N. (2010). Molecular detection of *Leishmania infantum* in wild rodents (*Rattus norvegicus*) in Greece. *Zoonoses Public Health*, 57, e23-25.

-Paradies P, Sasanelli M, de Caprariis D, Testini G, Traversa D, Lia RP, Dantas-Torres F, Otranto D. (2010). Clinical and laboratory monitoring of dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. *Vet J*, 186, 370-373.

-Paradies P, Sasanelli M, Amato ME, Greco B, De Palo P, Lubas G. (2012). Monitoring the reverse to normal of clinico-pathological findings and the disease free interval time

using four different treatment protocols for canine leishmaniosis in an endemic area. *Res Vet Sci*, 93, 843-847.

-Peña MT, Roura X, Davidson MG. (2000). Ocular and periocular manifestations of leishmaniasis in dogs: 105 cases (1993-1998). *Vet Ophthalmol*, 3, 35-41.

-Quinnell RJ, Courtenay O, Garcez L, Dye C. (1997). The epidemiology of canine leishmaniasis: transmission rates estimated from a cohort study in Amazonian Brazil. *Parasitology*, 115 (Pt 2), 143-156.

-Salomón OD, Orellano PW. (2005). *Lutzomyia longipalpis* in Clorinda, Formosa province, an area of potential visceral leishmaniasis transmission in Argentina. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 100: 475-6.

-Salomón OD, Sinagra A, Nevot MC. (2008). First visceral leishmaniasis focus in Argentina. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 103: 109-111.

-Salomón OD. (2010). Mapa de riesgo de leishmaniasis visceral en áreas vulnerables de Argentina y Uruguay, Publ. Programa Nacional de Leishmaniasis, Secretaría de Programas de Salud de la Nación Argentina, Buenos Aires, 144 p.

-Salomón, O. D., Quintana, M.G., Mastrangelo, A.V. y Fernández, M.S. (2012). Leishmaniasis and Climate Change-Case Study: Argentina. *J. of Tropical Medicine*. Article ID 601242, 11 pp.

-Santos M, Marcos R, Assunção M, Matos AJ. (2006). Polyarthritis associated with visceral leishmaniasis in a juvenile dog. *Vet Parasitol*, 141, 340-344.

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

-Saridomichelakis MN, Koutinas AF. (2014). Cutaneous involvement in canine leishmaniosis due to *Leishmania infantum* (syn. *L. chagasi*). *Vet Dermatol*, 25, 61-71, e22.

- Sharma U and Singh S. (2008). Insect vectors of *Leishmania*: distribution, physiology and their control. *J Vector Borne Dis*, 45, 255-272.
- Silva FL, Oliveira RG, Silva TM, Xavier MN, Nascimento EF, Santos RL. (2009). Venereal transmission of canine visceral leishmaniasis. *Vet Parasitol*, 160, 55-59.
- Solano-Gallego L, Rodríguez-Cortés A, Iniesta L, Quintana J, Pastor J, Espada Y, Portús M, Alberola J. (2007). Cross-sectional serosurvey of feline leishmaniasis in ecoregions around the Northwestern Mediterranean. *Am J Trop Med Hyg*, 76, 676-680.
- Solano-Gallego L, Koutinas A, Miró G, Cardoso L, Pennisi MG, Ferrer L, Bourdeau P, Oliva G, Baneth G. (2009). Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniosis. *Vet Parasitol*, 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 (2011). LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniosis. *Parasit Vectors*, 4, 86.
- Strauss-Ayali D, Jaffe CL, Burshtain O, Gonen L, Baneth G. (2004). Polymerase chain reaction using noninvasively obtained samples, for the detection of *Leishmania infantum* DNA in dogs. *J Infect Dis*, 189, 1729-1733.
- Suárez B, Isidoro B, Santos S, Sierra MJ, Molina R, Astray J, Amela C. (2012). Situación epidemiológica y de los factores de riesgo de transmisión de *Leishmania infantum* en España. *Rev Esp Salud Pública*, 6, 555-564.
- Thakur, A., Kaur, H. y Kaur, S. (2015). Evaluation of the immunoprophylactic potential of a killed vaccine candidate in combination with different adjuvants against murine visceral leishmaniasis. *Parasitology Internacional*: 64(1): 70-78.
- Tolezano JE, Uliana SR, Taniguchi HH, Araújo MF, Barbosa JA, Barbosa JE, Floeter-Winter LM, Shaw JJ. (2007). The first records of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in dogs (*Canis familiaris*) diagnosed clinically as having canine visceral leishmaniasis from Araçatuba County, São Paulo State, Brazil. *Vet Parasitol*, 149, 280-284.

- Torrent E, Leiva M, Segalés J, Franch J, Peña T, Cabrera B, Pastor J. (2005). Myocarditis and generalised vasculitis associated with leishmaniosis in a dog. *J Small Anim Pract*, 46, 549-552.
- Turchetti AP, Souza TD, Paixão TA, Santos RL. (2014). Sexual and vertical transmission of visceral leishmaniasis. *J Infect Dev Ctries*, 8, 403-407.
- Vamvakidis CD, Koutinas AF, Kanakoudis G, Georgiadis G, Saridomichelakis M. (2000). Masticatory and skeletal muscle myositis in canine leishmaniasis (*Leishmania infantum*). *Vet Rec*, 146, 698-703.
- Volf P and Myskova J. (2007). Sand flies and *Leishmania*: specific versus permissive vectors. *Trends Parasitol*, 23, 91-92.
- World Health Organization (WHO) (2010). Report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniases. Geneva.