

UNIVERSIDAD
CIENTÍFICA
DEL SUR

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y VETERINARIAS
CARRERA PROFESIONAL DE MEDICINA VETERINARIA Y
ZOOTECNIA

“DETERMINACIÓN DE *Leishmania (Viannia)* spp. EN CANINOS
DOMÉSTICOS EN LOS DISTRITOS DE ECHARATI Y OCOBAMBA,
DE LA PROVINCIA DE LA CONVENCIÓN, DEPARTAMENTO DEL
CUSCO”

Tesis para optar el título profesional de
Médico Veterinario y Zootecnista

Presentado por:
ALEJANDRA ESTHER TRONCOS VILLANUEVA

LIMA - PERÚ
2019

Acta de Sustentación de Tesis

Siendo las 13:00 horas del 18 de Julio de 2019, en el Auditorio (Campus Villa I), bajo la presencia del jurado examinador nombrado por **Resolución Directoral Académica de Carrera N° 030-DACMVZ-DAFCVB-U. CIENTÍFICA-2019**, presidido por el M.V. Jesús Alberto Chanamé Parraguez, M.V. Eva Casas Astos, M.V. Juan Alberto Vargas Zuñiga y el Mg. Siever Miguel Morales Cauti como Director – Observador. Se procedió en acto público a la sustentación de la tesis titulada: **“DETERMINACIÓN DE *Leishmania (Viannia) spp.* EN CANINOS DOMÉSTICOS EN LOS DISTRITOS DE ECHARATI Y OCOBAMBA, DE LA PROVINCIA DE LA CONVENCION, DEPARTAMENTO DEL CUSCO”**.

El presidente concedió el uso de la palabra a la Bachiller en Medicina Veterinaria y Zootecnia **Troncos Villanueva Alejandra Esther**, para la sustentación de su tesis. Luego de la exposición, la bachiller absolvió las preguntas del Jurado y del público asistente.

El Jurado acordó otorgarle la nota de:

..... *Diecisecho* (18)

El presidente del Jurado dio por culminado el acto de sustentación y levantó la sesión a las 14:00hrs.

.....
M.V. Jesús Alberto Chanamé Parraguez
 Presidente

.....
M.V. Eva Casas Astos
 Miembro

.....
M.V. Juan Alberto Vargas Zuñiga
 Miembro

.....
Mg. Siever Miguel Morales Cauti
 Director - Observador

009-2019

DEDICATORIA

A mi familia, por su apoyo y paciencia;
y a los habitantes de La Convención, Cusco

AGRADECIMIENTOS

A Dios y a mis padres por su apoyo incondicional

A mis asesoras Elsa Aguilar y Rosa Pacheco por brindarme todo lo que estuvo a su alcance, por sus consejos, guía, ánimos e instrucción.

A mi director, Siever Morales, por su atención y orientación en la redacción de la tesis

Al Instituto Universitario de Enfermedades Tropicales y Biomedicina del Cusco y a sus miembros, con quienes compartí mi preparación y amistad.

A Yahanda Apaza, por su amistad, por capacitarme y ayudarme durante mi entrenamiento y el proceso de investigación.

A Maritza Quispe y familia, por su estadía y agradable calor familiar

A Daniel Rosas, por su orientación, amistad y apoyo en los viajes de muestreo.

Al personal de salud de Kiteni, Ivochote y Ocobamba, quienes me dieron las facilidades y permisos, y mostraron interés en la investigación.

A los propietarios de los perros que participaron en la investigación, por su colaboración, por orientarme en las zonas de estudio y por su preocupación.

A William Valderrama, por haberme motivado con la idea de la tesis y por darme la vocación por la salud pública veterinaria y mostrarme el enfoque de Una Salud

A todos los que creyeron en mí.

ÍNDICE GENERAL

INDICE DE FIGURAS	V
ÍNDICE DE TABLAS	VI
ÍNDICE DE ANEXOS	VII
RESUMEN	VIII
ABSTRACT	X
I. INTRODUCCIÓN	1
II. MARCO TEÓRICO	3
2.1. Leishmaniasis.....	3
2.1.1. Agente etiológico y taxonomía	4
2.1.2. Morfología.....	6
2.1.3. Ciclo biológico	8
2.2. Leishmaniasis Tegumentaria Americana Canina	14
2.2.1. Factores de riesgo.....	15
2.2.2. Hallazgos clínicos y microbiológicos	18
2.2.3. Epidemiología	19
2.2.4. Diagnóstico	22
2.2.5. Tratamiento	26
2.2.6. Control y Prevención.....	28
III. METODOLOGÍA.....	30
3.1. Localización.....	30
3.2. Población y muestra.....	33
3.3. Diseño de estudio.....	34
3.4. Recolección de muestras y procesamiento	35
IV. RESULTADOS	38
V. DISCUSIÓN	43
VI. CONCLUSIONES	48
VII. RECOMENDACIONES	49
VIII. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	51
IX. ANEXOS.....	76

INDICE DE FIGURAS

<i>Figura 1.</i> Provincia de La Convención Cusco.. ..	31
<i>Figura 2.</i> Centro Poblado de Kiteni y comunidades. Mapa de riesgo de enfermedades metaxénicas 2015	32
<i>Figura 3.</i> Centro Poblado Ivochote	32
<i>Figura 4.</i> Centro Poblado Kquelccaybamba, distrito de Ocabamba	33
<i>Figura 5.</i> Flujograma de recolección y procesamiento de muestras.	37
<i>Figura 6.</i> Lesiones mucosas en nariz	40

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. <i>Nomenclatura simplificada de la sección Euleishmania</i>	5
Tabla 2. <i>Especies de Leishmania reportadas en perros en Sudamérica, causantes de la LTA</i>	22
Tabla 3. <i>Características de los caninos domésticos muestreados (n=46)</i>	35
Tabla 4. <i>Caninos domésticos de La Convención con lesiones sugerentes de LTA, positivos a Leishmania (Viannia) spp. según técnica diagnóstica (n=15)</i>	39
Tabla 5. <i>Factores asociados a la leishmaniasis tegumentaria americana canina mediante la técnica diagnóstica de frotis lesional (n=46)</i>	41
Tabla 6. <i>Factores asociados a la leishmaniasis tegumentaria americana canina mediante la técnica diagnóstica de frotis lesional (n=46). Variables asociadas</i>	41

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Ficha de consentimiento Informado	77
Anexo 2. Ficha clínica de leishmaniosis tegumentaria canina	78
Anexo 3. Toma de muestra posterior a la sedación	80
Anexo 4. Amastigotes observados mediante la técnica de frotis con tinción Giemsa de las lesiones.	81
Anexo 5. Perro con lesiones sugerentes de leishmaniasis en nariz y escroto	82
Anexo 6. Perro con lesión avanzada cicatrizada	83
Anexo 7. Descripción de las lesiones sugerentes de leishmaniasis en perros y diagnóstico por frotis.....	84

RESUMEN

El rol del perro en la transmisión de la Leishmaniasis Tegumentaria Americana continúa en discusión en la literatura. Por tanto, la determinación y reporte de especies leishmánicas en perros es el antecedente fundamental para realiza estudios epidemiológicos. Cusco es uno de los departamentos con mayor reporte de casos leishmaniasis humana, principalmente de la forma mucocutánea. La provincia de La Convención aporta con casi la totalidad de casos; y, la crianza de aves de producción y pequeños mamíferos (gallinas, patos, cuyes y perros) forma parte de su actividad productiva. El presente estudio transversal tiene como principal objetivo determinar la presencia de *Leishmania (Viannia) spp.* en caninos domésticos de la provincia de La Convención. Se muestrearon 46 caninos domésticos de zonas endémicas de los distritos de Echarati y Ocobamba, con o sin lesiones sugerentes de leishmaniasis, del 2015 al 2017 y se detectaron positivos a *Leishmania (Viannia) spp.* mediante tres técnicas de diagnóstico directo: frotis de lesiones activas sugerentes de leishmaniasis (raspado, biopsia y/o aspirado según el caso), cultivo en medio bifásico agar sangre y cultivo en

medio de *Drosophila* de Schneider. Se encontraron lesiones activas y cicatrices en el 32.6% (15/46) de caninos y se diagnosticaron positivos a *Leishmania (Viannia)* spp. al 19.6% (9/46) mediante la observación directa por frotis. Se analizaron los datos mediante la prueba de Chi cuadrado y la prueba exacta de Fisher de acuerdo a los supuestos estadísticos. Las variables evaluadas fueron: presencia de *Leishmania (Viannia)* spp. y presencia de lesión como variables de desenlace; y grupo etario, sexo, lugar que frecuenta y leishmaniasis humana como variables de exposición. Se encontró una asociación marginal entre la presencia de lesión y el lugar que frecuenta el animal ($p=0.051$), y una asociación con la leishmaniasis humana ($p=0.045$). No se determinó la asociación con las otras variables de estudio.

Palabras clave: leishmaniasis tegumentaria canina; *Leishmania (Viannia)*; diagnóstico.

ABSTRACT

The role of the dog in the transmission of American Tegumentary Leishmaniasis is still under discussion in the literature. Therefore, the determination and reporting of Leishmanian species in dogs is the fundamental antecedent for conducting epidemiological studies. Cusco is one of the departments with the highest number of cases of human leishmaniasis, mainly of the mucocutaneous form. The province of La Convención contributes with almost all cases; and, the breeding of production birds and small mammals (chickens, ducks, guinea pigs and dogs) is part of their productive activity. The main objective of this cross-sectional study is to determine the presence of *Leishmania (Viannia)* spp. in domestic dogs in the province of La Convención. 46 domestic canines were sampled from endemic areas of the districts of Echarati and Ocobamba, with or without lesions suggestive of leishmaniasis, from 2015 to 2017 and were detected positive to *Leishmania (Viannia)* spp. through three direct diagnostic

techniques: smear of active lesions suggestive of leishmaniasis (scraping, biopsy and / or aspiration, depending on the case), culture in two-phase agar agar blood and culture in Schneider's *Drosophila* medium. Active lesions and scars were found in 32.6% (15/46) of canines and were diagnosed positive to *Leishmania (Viannia)* spp. to 19.6% (9/46) by direct observation by smear. The data were analyzed using the Chi square test and the Fisher exact test according to the statistical assumptions. The variables evaluated were: presence of *Leishmania (Viannia)* spp. and presence of injury as outcome variables; and age group, sex, place that frequents and human leishmaniasis as exposure variables. A marginal association was found between the presence of lesion and the place frequented by the animal ($p = 0.051$), and an association with human leishmaniasis ($p = 0.045$). The association with the other study variables was not determined.

Keywords: canine tegumentary leishmaniasis; *Leishmania (Viannia)*; diagnosis.

I. INTRODUCCIÓN

La leishmaniasis es una enfermedad que afecta a millones de personas en todo el mundo y se transmite por la picadura de insectos vectores. Es causada por la infección con especies del protozoario *Leishmania* y se manifiesta principalmente en tres formas clínicas: visceral, cutánea y mucocutánea. La importancia de los hospederos de la enfermedad está en su rol para el mantenimiento del patógeno en un área geográfica, que expone a grupos humanos y animales domésticos (Roque y Jansen, 2014). La transmisión puede ser zoonótica, antroponótica o ambas, dependiendo del vector (Akhoundi *et al.*, 2016; Steverding, 2017).

La leishmaniasis visceral es la manifestación más severa de la enfermedad y se considera al perro como el reservorio principal de *Leishmania infantum* (Palatnik-de-Sousa y Day, 2011). Sin embargo, este rol es aún incierto en las formas tegumentarias debido a diferencias en la adaptación de las especies de *Leishmania* (Dantas-Torres, 2007). Cada contexto epidemiológico difiere en el papel que desempeñan las especies hospederas

involucradas. Múltiples factores de riesgo como los ambientales, viajes a zonas endémicas, cambio climático y la leishmaniasis canina, incrementan la probabilidad de la enfermedad (Oryan y Akbari, 2016).

La Leishmaniasis Tegumentaria Americana (LTA) es endémica en el Perú y es producida por especies del subgénero *Viannia* y *Leishmania*. Afecta mayormente a zonas altoandinas y de la selva, las cuales están en constante urbanización de áreas naturales. Se ha reportado especies de *Leishmania* (*Viannia*) en perros de Huánuco y Ancash (Medina, Chávez, Minaya, Barbosa-Santos y Espinoza, 2002; Reithinger, Espinoza y Davies, 2003a), y se ha propuesto que la tenencia de perros pueda ser un factor de riesgo para la leishmaniasis humana (Reithinger, Espinoza, Llanos-Cuentas y Davies, 2003b). Un contexto similar se podría dar en Cusco, uno de los departamentos con mayor número de casos de leishmaniosis cutánea y el primero en reportes de mucocutánea; en donde se ha descrito que la crianza de animales menores contribuye con la economía de un sector de la población de la provincia de La Convención (Merma y Julca, 2012; Centro Nacional de Epidemiología, Prevención y Control de Enfermedades [CDC-Perú], 2018a).

Por ello, el objetivo del estudio es detectar la presencia de *Leishmania* (*Viannia*) spp. en caninos domésticos de la provincia de La Convención del departamento del Cusco. Asimismo, analizar posibles factores asociados a la leishmaniasis tegumentaria canina que puedan dar pie a nuevas propuestas en estudios de mayor escala en poblaciones similares.

II. MARCO TEÓRICO

2.1. Leishmaniasis

La leishmaniasis son un grupo de enfermedades metaxénicas que afectan a los humanos, animales domésticos y animales silvestres. Es considerada como un problema de salud pública, dentro de las denominadas "enfermedades tropicales desatendidas" (neglected tropical diseases), las cuales comprometen a poblaciones de escasos recursos, asociadas a la desnutrición, bajas condiciones de vida y a un débil sistema inmunológico de los que la padecen. Tiene una amplia distribución en más de 90 países de zonas del trópico, subtropical y del sur de Europa y su entorno ecológico varía desde selvas tropicales hasta desiertos. Se manifiesta principalmente en tres formas clínicas: visceral, cutánea y mucocutánea. No se conoce con precisión el número de casos nuevos por año, pero se estiman según el tipo clínico. Los casos estimados de leishmaniasis cutánea van de 0,7 millones a 1,2 millones, mientras que en la leishmaniasis visceral de 0,2 millones a 0,4 millones. Menos común es la forma mucocutánea y casi el 90% de casos se presentan

en Bolivia, Brasil y Perú (Center for Disease Control and Prevention [CDC], 2018; Organización Mundial de la Salud [OMS], 2018).

2.1.1. Agente etiológico y taxonomía

La leishmaniasis humana es causada por cerca de 21 de las 30 especies del protozoario del género *Leishmania* que infectan también a otros mamíferos (CDC, 2017). El parásito se clasifica en dos grupos principales; especies del Viejo Mundo que están distribuidas en Europa, Asia y África, y especies del Nuevo Mundo que se encuentran en América. Las principales especies del Viejo Mundo son *L. aethiopica*, *L. major*, que producen manifestaciones cutáneas localizadas o difusas; mientras que *L. donovani* y *L. infantum* generan leishmaniasis visceral, además de la forma cutánea localizada en esta última. En el Nuevo Mundo se reportan principalmente *L. infantum* (forma visceral), y *L. mexicana*, *L. amazonensis*, *L. peruviana* y *L. braziliensis* como responsables de manifestaciones cutáneas localizadas y también la forma mucocutánea en la última mencionada (Alemayehu y Alemayehu, 2017).

Taxonómicamente el género *Leishmania* (Ross, 1903), se clasifica en:

Dominio: Eukaryota (Cavalier-Smith, 1998)

Reino: Protozoa (Cavalier-Smith, 2002)

Infrareino: Excavata (Cavalier-Smith, 2003)

Phylum: Euglenozoa (Cavalier-Smith, 1993)

Clase: Kinetoplastida (Honigberg, 1963), o Kinetoplastea (Cavalier-Smith, 1981)

Orden: Trypanosomatida (Kent, 1880)

Familia: Trypanosomatidae (Doflein, 1901)

Lainson y Shaw (1987) clasificaron dos subgéneros *Leishmania* y *Viannia*, según el desarrollo del parásito en el intestino del flebótomo vector. Sin embargo, hasta el

momento no hay una clasificación universal de *Leishmania*, principalmente referidos a criterios de definición de especies, o a la metodología de clasificación filogenética.

La clasificación actual aceptada de *Leishmania* propone la división del género en dos linajes llamados “secciones”: Euleishmania y Paraleishmania (Cupolillo, Medina-Acosta, Noyes, Momen y Grimaldi, 2000). La primera incluye especies de los subgéneros *Leishmania*, *Viannia* y *Sauroleishmania* (Tabla 1). La otra sección llamada Paraleishmania comprende varias especies de *Leishmania* cuya clasificación anterior no era clara (Mauricio, 2018). Se han descrito al menos 39 especies en la literatura como parásitos adicionales, aún sin nombre o nombrados informalmente. A pesar de ello, muchas resultaron ser sinónimos, razón por la cual se ha defendido la simplificación taxonómica (Fraga, Montalvo, De Doncker, Dujardin, y Van der Auwera, 2010; Schönian, Mauricio, y Cupolillo, 2010).

Tabla 1.

Nomenclatura simplificada de la sección Euleishmania

Subgéneros	Especies	Otros nombres de especies asociadas
<i>L. (Leishmania)</i>	<i>L. donovani</i>	<i>L. archibaldi</i> <i>L. chagasi</i> <i>L. infantum</i>
	<i>L. major</i>	<i>L. arabica</i> <i>L. gerbilli</i> <i>L. turanica</i>
	<i>L. tropica</i>	<i>L. aethiopica</i> <i>L. killicki</i>
	<i>L. mexicana</i>	<i>L. amazonensis</i> <i>L. aristidesi</i> <i>L. garnhami</i> <i>L. forattinii</i> <i>L. pifanoi</i> <i>L. venezuelensis</i> <i>L. waltoni</i>

<i>L.</i> (<i>Sauroleishmania</i>) ^a	<i>L. tarentolae</i>	
	<i>L. adleri</i>	
	<i>L. gymnodactyli</i>	
	<i>L. hoogstraali</i>	
	<i>L. guliki</i> ^b	
	<i>L. zuckermani</i> ^c	
	<i>L. platycephala</i> ^c	
<i>L. (Viannia)</i>	<i>L. braziliensis</i>	<i>L. peruviana</i>
	<i>L. guyanensis</i>	<i>L. panamensis</i>
	<i>L. lindenbergi</i>	<i>L. shawi</i>
	<i>L. utingensis</i>	
	<i>L. lainsoni</i>	
	<i>L. naiffi</i>	
<i>L. (Endotripanum)</i>	<i>L. hertigi</i>	<i>L. deaneii</i>
	<i>L. monterogeii</i> ^a	<i>E. schaudinni</i>
		<i>E. sp</i>
		<i>L. colombensis</i>
		<i>L. equatoriensis</i>

Nota. Fuente: Schönian, G., Mauricio, I., y Cupolillo, E. (2010). Is it time to revise the nomenclature of *Leishmania*? *Trends in Parasitology*, 26(10), 466–469. doi:10.1016/j.pt.2010.06.013

^aA confirmación

^bEspecie con una secuencia mitocondrial disponible, con mayor similitud con *L. tarentolae*

^cDescripción de la especie, sin datos moleculares

2.1.2. Morfología

El parásito presenta un ciclo de vida digenético (alterna entre dos hospederos) que se desarrolla en el mamífero y en el vector. Manifiesta diferentes morfologías y tipos celulares que se adaptan al vertebrado o al vector según las condiciones ambientales celulares (Bates, 1994; Dostálová y Volf, 2012; Seraphim, Ramos, y Borges, 2014). Aunque *Leishmania* presenta dos principales morfologías, promastigote (en el flebotomino) y amastigote (en el mamífero), la arquitectura celular básica se conserva entre ambas y está definida por microtúbulos de corset subpelicular reticulados. Esta matriz se preserva durante todo el ciclo, de tal manera que la división celular se basa en la inserción y el alargamiento de los microtúbulos en la matriz existente. El protozoario presenta un núcleo y un conjunto de orgánulos de una sola copia. En el extremo anterior

al núcleo se encuentra el kinetoplasto, una masa de ADN mitocondrial, que está conectado al cuerpo basal desde el cual se extiende el flagelo (Rudzinska, D'Alesandro, y Trager, 1964; Aleman, 1969; Ogbadoyi, Robinson, y Gull, 2003; Wheeler, Sunter, y Gull, 2016). En la base del flagelo hay una invaginación de la membrana celular que forma una estructura llamada bolsa flagelar, es importante por ser el único sitio de endocitosis y exocitosis y, por lo tanto, es una interfaz crítica entre el parásito y su entorno (Lacomble *et al.*, 2009).

Básicamente, el tipo celular está conformado por un núcleo, cuerpo basal, kinetoplasto, aparato de Golgi, bolsillo flagelar y flagelo (Ogbadoyi *et al.*, 2003). Estas unidades modulares se colocan entre sí dando diferentes morfologías (Hayes *et al.*, 2014; Sunter y Gull, 2016). De esta manera, para definir la forma dinámica y la forma de este parásito es necesario comprender la morfogénesis de las distintas estructuras individuales y su posición entre ellas (Sunter y Gull, 2017).

La morfología celular es definida por la forma de la célula, la longitud del flagelo, la posición entre el kinetoplasto y el núcleo, y las características ultraestructurales; por tanto, es lo que se ha utilizado tradicionalmente para definir las formas celulares observadas. Actualmente hay pocos marcadores moleculares para ayudar a definir las formas del ciclo biológico de manera más precisa y, por ende, es necesario tener cuidado y precaución al definir los tipos de células únicamente sobre la base de la morfología celular (Sunter y Gull, 2017).

Pese a los niveles de complejidades y diferencias de las especies de *Leishmania*, la morfología se conserva a medida que avanza en su ciclo de vida. Las células con una morfología de amastigote o promastigote se ven muy diferentes, pero mantienen la distribución celular básica con el kinetoplasto anterior al núcleo y un flagelo que se

extiende desde el cuerpo basal (Rudzinska, D'Alesandro, y Trager, 1964; Aleman, 1969). La morfología del amastigote se caracteriza por un cuerpo celular más pequeño y esférico, con un flagelo inmóvil corto que escasamente emerge del bolsillo flagelar y se centra en las funciones sensoriales (Gluenz *et al.*, 2010; Wheeler, Gluenz, y Gull, 2015). Por el contrario, el promastigote es un cuerpo celular de forma ovoide alargado con un flagelo móvil largo (se extiende fuera del bolsillo flagelar) responsable de facilitar la motilidad a través del tracto digestivo del flebotomino (Cuvillier, Miranda, Ambit, Barral, y Merlin, 2003).

2.1.3. Ciclo biológico

Cuando un flebotomino hembra infectado con *Leishmania* se alimenta de la sangre de un mamífero susceptible, deposita junto con su contenido salival los promastigotes metacíclicos en el lugar de la picadura. Durante la ingestión de sangre, la piel del mamífero es dañada por la probóscide y se inoculan proteínas segregadas por las glándulas salivales del vector, esta lesión y las sustancias liberadas producen quimiotaxis para diferentes células inmunitarias, que modifican los procesos inflamatorios en el sitio de alimentación. Muchos tipos de células como los monocitos y las células dendríticas, interactúan con los parásitos en el lugar de la lesión, pero los macrófagos son las principales células infectadas las cuales permiten la persistencia de *Leishmania* (Anjili *et al.*, 1995; de Almeida., Vilhena, Barral, y Barral-Netto, 2003; Arango-Duque. y Descoteaux, 2015; de Menezes, Saraiva, y da Rocha-Azevedo, 2016). Sin embargo, la evidencia que demuestra dónde se produce la interacción entre *Leishmania* y los macrófagos en el hospedero es mínima. Los promastigotes metacíclicos son altamente móviles y facultan la migración a través de una matriz de colágeno (Petropolis *et al.*, 2014). Por lo tanto, es posible que la fagocitosis del protozoario pueda ocurrir en lugares alejados del sitio de la picadura y que el espectro de la enfermedad de cutánea a visceral

se diferencie en la capacidad del parásito para invadir al hospedero más allá del sitio de la picadura, ya sea directamente o mediante el movimiento de macrófagos infectados (Sunter y Gull, 2017).

Lo reportado en la literatura sobre la polaridad de la interacción y la captación entre *Leishmania* y el macrófago no concuerda; algunos sugieren que se produce primero a través del flagelo (punta y/o base del flagelo), mientras otros describen que ocurre principalmente a través del cuerpo celular o desde ambos extremos (Rittig *et al.*, 1998; Courret *et al.*, 2002; Forestier, MacHu, Loussert, Pescher, y Späth, 2011).

En *Trypanosoma brucei*, un tripanosomátido con cercana relación, la punta del flagelo posee proteínas que incluyen receptores que se localizan exclusivamente en esa zona (Saada *et al.*, 2014; Varga, Moreira-Leite, Portman, y Gull, 2017). De esta manera, es probable que un dominio de membrana diferenciado en la punta del flagelo se cebe para la unión con el macrófago, iniciándose así una secuencia de señalización que llevarían a la captación y diferenciación del parásito. Pero cualquiera que sea la orientación de la *Leishmania*, termina con su flagelo apuntando hacia la periferia del macrófago (Courret *et al.*, 2002; Forestier *et al.*, 2011). El movimiento continuo del flagelo dentro del macrófago ocasiona daño y falta de integridad a la membrana plasmática que promueve la exocitosis lisosomal que altera la composición de la vacuola parasitófora, lo cual aumenta las posibilidades de que el protozooario infecte exitosamente al macrófago (Forestier *et al.*, 2011).

Una vez dentro del macrófago, el promastigote caracterizado por ser móvil, de forma alargada y con un flagelo largo, se diferencia a una forma de amastigote que es esférico, de flagelo corto con una pequeña punta bulbosa que se extiende más allá de su cuerpo celular. Este es un cambio drástico en la forma de la célula y resulta en una relación

de superficie celular- volumen minimizada, de esta manera se reduce el área en donde la célula está expuesta al ambiente desfavorable de la vacuola parasitófora, y es probable que se re programe el uso de flagelo (Antoine *et al.*, 1990; Antoine *et al.*, 1998; Gull, 2009).

Hay dos tipos distintos de vacuolas parasitóforas que se desarrollan en los macrófagos infectados según las especies de *Leishmania*. La infección con algunas especies como *Leishmania major* producen vacuolas parasitóforas pequeñas, llamadas vacuolas tipo I, que rodean a un solo amastigote; mientras que otras especies como *L. amazonensis* produce vacuolas parasitóforas grandes de ocupación múltiple (vacuolas tipo II) que contienen múltiples amastigotes (Chang, y Dwyer, 1978; Real, Mortara, y Rabinovitch, 2010). Las coinfecciones con *L. amazonensis* y *L. major* en un solo macrófago evidenciaron que no se produjo la fusión de los dos tipos de vacuola parasitóforas, ya sea con amastigotes de *L. amazonensis* grandes o con amastigote de *L. major*. Este hallazgo propone que la vacuola parasitófora se modifica según los requisitos específicos de cada especie, lo que incapacita la fusión eficaz de las vacuolas parasitóforas distintas (Real *et al.*, 2010).

A pesar de las diferencias en los tipos de vacuolas parasitófora, las características estructurales de los amastigotes de diferentes especies se conservan (Castro, 2006). Sin embargo, se han reportado algunas diferencias entre los amastigotes de diferentes especies, tales como un diámetro medio de los amastigotes de *L. mexicana* 50% mayor que los de *L. braziliensis* y *L. donovani* (Gardener, Shchory, y Chance, 1977). Si bien es posible que las diferencias entre promastigote y amastigote sean significativas para las relaciones hospedero-vector, la semejanza morfológica del amastigote entre las diferentes especies alude la carencia de un vínculo entre la morfología y la patología de la enfermedad. Por otro lado, la expresión de varios factores de virulencia propios en las

especies, como la proteína A2, pueden tener una mayor importancia para el espectro de la enfermedad (Zhang *et al.*, 2003; McCall y Matlashewski, 2010).

Cuando el promastigote se diferencia en amastigote dentro de la vacuola parasitófora, se multiplica por fisión binaria que conlleva a la lisis del macrófago para liberar los amastigotes que infectarán a nuevas células fagocíticas mononucleares (CDC, 2017). De esta manera, los parásitos tienen que evadir al sistema inmune del hospedero durante todo el proceso para conseguir el desarrollo de la enfermedad. Las fases tempranas de la infección son afectadas por el doble rol del sistema de complemento, por un lado, la lisis mediada por el complemento elimina los parásitos, mientras que la opsonización promueve la captación de parásitos por los fagocitos, que favorece la infección. El recubrimiento de *Leishmania* con una capa de lipofosfoglicano (LPG) lo protege de la lisis mediada por el complemento y a su vez induce la activación del complemento, promoviendo la fagocitosis (Franco, Beverley, y Zamboni, 2012).

Además, el GLP leishmanial retrasa la formación de fago-lisosomas y permite que los parásitos *Leishmania* se diferencien en su forma intracelular, el amastigote (Vinet, Fukuda, Turco y Descoteaux, 2009). La respuesta más efectiva de los macrófagos contra el parásito es la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y especies reactivas de nitrógeno (RNS), que traza la eliminación de cualquier patógeno sin dañar la célula hospedera (Iles y Forman, 2002; Fang, 2004). Finalmente, frente al estrés oxidativo, los parásitos tienen la capacidad de vencer la respuesta del macrófago desde su entrada inicial hasta su supervivencia dentro del mismo.

La acción de los neutrófilos también es importante. Éstos son reclutados inmediatamente en el lugar de la infección, donde producen trampas extracelulares de neutrófilos (NET), que son una red de fibrillas extracelulares compuestas de ADN

asociado con proteínas antimicrobianas como la elastasa, histonas y gránulos tóxicos. Aunque su tiempo de vida es muy corto, su eficacia se expande durante la inflamación. Probablemente el impacto de los neutrófilos en la progresión de la enfermedad es específico de cada especie (Hurrell, Regli, y Tacchini-Cottier, 2016). Se ha observado que los parásitos de *L. amazonensis* son eliminados eficazmente por las NET, pero *L. donovani* y *L. infantum* son resistentes y pueden beneficiarse de la formación de las NET (Gabriel, McMaster, Girard, y Descoteaux, 2010). En *L. mexicana* se reportó que el rápido reclutamiento de neutrófilos durante la infección contribuye a la progresión de la enfermedad y la cronicidad (Hurrell *et al.*, 2015). Estos hallazgos proponen una relación entre los neutrófilos y las diferentes especies de *Leishmania*, pero aún se requieren estudios.

Se ha demostrado que los monocitos inflamatorios, reclutados a por activación plaquetaria en el sitio de la infección, pueden infectarse, siendo el caso observado en *L. major*. El reclutamiento de monocitos inflamatorios está correlacionado con una mayor resistencia a la infección (Goncalves, Zhang, Cohen, Debrabant, y Mosser, 2011). Además, son necesarios para controlar la reinfección de ratones resistentes con *L. major*, ya que eliminan los parásitos mediante la producción de ROS y RNS como el óxido nítrico sintasa inducible (ONSi) al activar las células T CD4 + de memoria (Glennie, Volk, y Scott, 2017; Romano *et al.*, 2017). Sin embargo, este fenotipo es específico por especie, como tal es el caso de la infección con *L. amazonensis*, en donde el reclutamiento de monocitos inflamatorios se asoció con una mayor carga y patología del parásito (Xin *et al.*, 2010). De manera similar, la infección de monocitos humanos por diferentes especies de *Leishmania* altera su adherencia a los tejidos conectivos y podría favorecer la diseminación de la infección (Figueira *et al.*, 2015).

La fase inicial posterior a la infección por *Leishmania* es crucial para determinar el resultado de la enfermedad. Como se mencionó anteriormente, cuando el parásito ingresa al hospedero y es fagocitado, las células inmunes innatas reaccionan produciendo citoquinas que dan lugar al desarrollo de la inmunidad adaptativa, generando así un tipo de respuesta protectora o perjudicial. Y, aunque son indispensables para la eliminación total de la infección e para implementar una respuesta de memoria duradera contra la reinfección, también se ha demostrado que las células inmunitarias adaptativas participan en la patogenia de la leishmaniasis, provocando la destrucción de tejidos e induciendo recaída de la enfermedad. Las células involucradas que han sido estudiadas son las T CD4, T CD8 y células B (Rossi y Fasel, 2017).

Así como los flebotominos infectan a los mamíferos al alimentarse de su sangre, del mismo modo consiguen infectarse. Ingieren los amastigotes del hospedero infectado y éstos se transforman en promastigotes. Se desarrollan en el intestino (en el intestino posterior para los organismos del subgénero *Viannia* y en el intestino medio para los del subgénero de *Leishmania*), y migran hacia la probóscide (CDC, 2017).

Recientemente, en un estudio revelaron cómo las infecciones en el intestino del vector se amplifican masivamente después de las sucesivas alimentaciones de sangre e identificaron una nueva etapa en el ciclo de vida que es responsable de esta amplificación. Además de aportar con una visión clave del ciclo de vida del patógeno, estas observaciones son importantes para controlar la enfermedad mediante la detección de vectores con el fin de comprender la epidemiología más ampliamente. Los hallazgos clave reportados afirman que los promastigotes metacíclicos son capaces de diferenciarse en el flebotomino, aumentando el crecimiento de la población de parásitos en una segunda ingestión de sangre y dando al vector un potencial mucho mayor para transmitir la enfermedad después de la primera ingestión de sangre infectada (Serafim *et al.*, 2018).

Anteriormente, los promastigotes metacíclicos se consideraban capaces de realizar un solo proceso: si se inoculaban en un hospedador vertebrado, serían atrapados por las células fagocíticas en la piel, tales como neutrófilos y macrófagos, y se transformaban en la etapa amastigote, que luego se replica como un parásito intracelular obligado del sistema fagolisosómico (Murray, Berman, Davies, y Saravia, 2005). Aunque se refiere a la reproducción del parásito como asexual, es frecuente que en algunos linajes (posiblemente en la mayoría) haya una recombinación sexual (Rougeron, De Meeûs, y Bañuls, 2015).

En síntesis, para el mantenimiento del ciclo biológico es necesaria la participación de reservorios silvestres y, dependiendo de la adaptación ecológica, la presencia de reservorios domésticos. Los tripanozomátidos tienen ciclos de transmisión complejos con características epidemiológicas específicas de la región (Roque y Jansen, 2014). Para comprender el rol de las diferentes especies en la transmisión de la enfermedad, se requiere de una investigación epidemiológica con una muestra representativa de las posibles especies hospederas y poblaciones de mamíferos en el área de estudio, simultáneo al seguimiento de la infección (Rotureau, 2006).

2.2. Leishmaniasis Tegumentaria Americana Canina

La LTA abarca dos principales formas de la enfermedad, cutánea y mucocutánea, y es producida por especies del Nuevo Mundo. Además de los humanos, los animales domésticos tales como équidos, gatos y perros pueden ser afectados (Brandão-Filho *et al.*, 2003; Schubach *et al.*, 2004). El perro es el animal de compañía más común y de mayor contacto con el hombre y aunque la LTA también se ha reportado en gatos, ha sido estudiado principalmente en perros debido a que se reporta como el reservorio principal de la leishmaniasis visceral por *L. infantum* (Rivas *et al.*, 2018).

2.2.1. Factores de riesgo

Algunas conductas y condiciones de riesgo de la leishmaniasis canina (e infección asintomática por *Leishmania*) son similares a las reportadas en la enfermedad humana, y aunque se han estudiado factores propios de los perros en el Viejo y Nuevo Mundo, los hallazgos no son del todo similares, debido probablemente a la naturaleza local de la enfermedad (Dantas-Torres, 2009). Entre las condiciones de riesgo estudiadas comunes al hombre están relacionadas con el ambiente (Santaella *et al.*, 2011; Carvalho *et al.*, 2015; Oliveira *et al.*, 2016), mientras que las particulares de los perros se centran en sus características biológicas y etología. La dinámica de la enfermedad transmitida entre la población humana y canina alude que se ven afectados mutuamente y que posiblemente ambos son perjudicados de igual medida por el vector (Cardenas *et al.*, 2006).

En un estudio realizado en zonas endémicas de leishmaniasis visceral y cutánea en Brasil, se reportó que los caninos que vivían en zonas rurales tenían 3,39 veces más probabilidades de infectarse de leishmaniasis en comparación con los que vivían en entornos urbanos (Oliveira *et al.*, 2016). Asimismo, en regiones menos rurales, los perros de las zonas periurbanas tenían más probabilidades de haber tenido contacto con el protozoario y eran 1.56 veces más propensos a infectarse (Carvalho *et al.*, 2015). Otros factores de riesgo evaluados comunes a la enfermedad en el hombre han sido la presencia del vector en la casa, antecedentes de leishmaniasis humana en el hogar, distancia de la casa al bosque y viaje a otra ciudad, sin embargo, no se encontraron diferencias significativas (Santaella *et al.*, 2011).

En la leishmaniasis humana, la edad y el sexo han mostrado asociación a la enfermedad y se han considerado factores de riesgo (Jirmanus *et al.*, 2012; Eid *et al.*, 2018). Este patrón se ve en contextos selváticos en el que los varones en edad laboral suelen tener mayor exposición debido a ocupaciones como la agricultura y silvicultura

(Weigle, Santrich, Martínez, Valderrama, y Saravia, 1993; Eid *et al.*, 2018). En Portugal, la seroprevalencia en perros muestra una distribución bimodal, con mayor titulación de anticuerpos en perros menores de 3 años y mayores de 8 años (Abranches, Silva-Pereira., Conceicao-Silva, Santos-Gomes, y Janz, 1991; Cardoso *et al.*, 2004), similar a ello, en Irán los perros mayores de 2 años presentaban una significativa tasa de infección mayor a la de los más jóvenes (Mahshid *et al.*, 2013; Sabzevari, Razmi, Naghibi, y Khoshnegah, 2016). Además, en Croacia se reportaron como factores de riesgo al sexo (macho) y a la edad, en donde los dos grupos de mayor seroprevalencia fueron entre 3 y 4 años, y entre 6 y 7 años (Živičnjak *et al.*, 2005).

En América del Sur las investigaciones parecen no indicar patrones de edad bien definidos (Dantas-Torres, 2009), probablemente porque los vectores están presentes permanentemente. Los estudios realizados en Europa y América del Sur sugieren que la exposición entre los géneros y entre los grupos etarios puede variar de una región a otra tanto para la leishmaniasis visceral como para la tegumentaria (Abranches *et al.*, 1991; Cardoso *et al.*, 2004; Dantas-Torres, de Brito, y Brandão-Filho, 2006; Miró *et al.*, 2007). Por otro lado, es importante identificar el sesgo de selección por sexo ya que puede cambiar la interpretación si la muestra no presenta equidad de los estratos. Esto puede deberse a las preferencias de crianza de machos como perros de trabajo (Santaella *et al.*, 2011).

Las características asociadas a la leishmaniasis canina propias de los animales han sido estudiadas con mayor énfasis en la leishmaniasis visceral del Viejo y Nuevo Mundo. Por tanto, es coherente tomarlas como referencia para evaluar los factores de riesgo de la forma tegumentaria del Nuevo Mundo. Entre estos se pueden mencionar la raza, longitud de pelo, color de pelo, condición corporal y presencia de ectoparásitos (Santaella *et al.*, 2011; Carvalho *et al.*, 2015). En Brasil, el análisis basado en el tamaño y color de pelo

mostró que los animales con pelaje más claro fueron estadísticamente más propensos a infectarse de *Leishmania* (Carvalho *et al.*, 2015), mientras que en un estudio realizado en el mismo país y otro en la región mediterránea indicaron que el pelaje corto y oscuro aumentaba la susceptibilidad (Rondon *et al.*, 2008; Cortes *et al.*, 2012). Además, reportaron que el tamaño del pelo era un factor de riesgo, lo cual fue similar a un estudio de leishmaniasis visceral en un estado contiguo con orientación sur (Coura-Vital *et al.*, 2013; Carvalho *et al.*, 2015). Aunque, los autores sugieren que los resultados no son consistentes con los estudios previos debido a que la mayoría de perros muestreados en la investigación tenían pelo corto (Carvalho *et al.*, 2015).

Otros factores propuestos como asociados a la leishmaniasis visceral, que no han sido estudiados en la leishmaniasis tegumentaria canina, han sido el hábito de dormir afuera o dentro de la casa y la aptitud o rol de crianza del animal (compañía, guardia, cacería, pastoreo, etc) y se han mostrado evidencias contradictorias (Amela *et al.*, 1995; Živičnjak *et al.*, 2005; Maia *et al.*, 2016). En Croacia y España no se encontraron diferencias entre animales mantenidos dentro de casa (mascotas) y aquellos que frecuentaban permanecer fuera de ella (perros de guardia y cazadores) (Amela *et al.*, 1995; Živičnjak *et al.*, 2005). Por otro lado, en Portugal se reportó una mayor prevalencia de *Leishmania* en perros con aptitud de mascota (Amela *et al.*, 1995).

Sin embargo, un estudio en una zona considerada libre de leishmaniasis en España, reportó que los perros de compañía fueron significativamente menos propensos a contraer la leishmaniasis que los perros pastores, de caza y los de perreras, suponiendo así que los estilos de vida y ocupaciones hacen que sea mayor su exposición al vector (Amusatogui, Sainz, Aguirre, y Tesouro, 2004). De acuerdo a los reportado en un metaanálisis de factores de riesgo de la infección por leishmania en perros, evidencia que las altas tasas de infección por *Leishmania infantum* están asociadas a un mayor tiempo

de contacto con el flebotomino como se da cuando se tiene acceso a áreas verdes y en aquellos perros que no son confinados en el hogar (Belo *et al.*, 2013).

La inmunidad está estrechamente relacionada al riesgo de desarrollar leishmaniasis. Los estudios en leishmaniasis visceral sugieren que los perros con signos clínicos son más infecciosos para los flebotominos y que la infecciosidad está relacionada con la inmunosupresión, la cual es expresada mediante la circulación de células Th. Además, la infección está asociada a niveles bajos de citoquinas de tipo Th1 (como el IFN- γ , IL-2 y TNF- α) y niveles aumentados de citoquinas de tipo Th2 (como IL-10, TGF β e IL-4) (Baneth, Koutinas, Solano-Gallego, Bourdeau, y Ferrer, 2008).

2.2.2. Hallazgos clínicos y microbiológicos

La mayoría de los perros infectados manifiesta desde úlceras localizadas autocurativas cutáneas o mucosas en las orejas, hocico, escroto y otras zonas inusuales como las patas; hasta mutilaciones mucocutáneas (Madeira *et al.*, 2003; Velasquez *et al.*, 2006). Otros signos frecuentes son la descamación e hiperpigmentación de la piel o mucosa (Maia, 2013). A nivel histopatológico se puede observar alteraciones de la piel como acantosis, espongirosis, exocitosis y paraqueratosis (González *et al.*, 2018).

La lesión se caracteriza por tener una reacción inflamatoria crónica, que puede ser granulomatosa, con la presencia de linfocitos, células plasmáticas y macrófagos (González *et al.*, 2018). En la dermatitis granulomatosa se ha observado acumulaciones de linfocitos, células plasmáticas y pocos eosinófilos alrededor de los vasos sanguíneos. En la histopatología de las biopsias de piel, predominan los macrófagos que se concentran predominantemente en la dermis superficial con un volumen citoplasmático moderado, propio de las células epitelioides (Sasani., Javanbakht, Samani, y Shirani, 2014). En

general, se pueden observar los amastigotes dentro del macrófago, pero también es común encontrarlos de forma libre (DaMata *et al.*, 2015).

2.2.3. Epidemiología

La LTA está ampliamente distribuida América Central y del Sur, es producida principalmente por especies del subgénero *Viannia* y en menor medida por especies del subgénero *Leishmania*. En humanos se han reportado las especies *L.(V) braziliensis*, *L.(V) guyanensis*, *L.(V) panamensis*, *L.(V) shawi*, *L.(V) naiffi*, *L.(V) lainsoni*, *L.(V) lindenbergi*, *L.(V) peruviana*, *L.(L) mexicana*, *L.(V) venezuelensis* y *L.(L) amazonensis* (Akhoundi *et al.*, 2016). Algunas de estas especies se han encontrado en perros de forma asintomática o con manifestaciones clínicas similares a las observadas en humanos (Tabla 2).

El insecto transmisor pertenece al género *Lutzomyia* y cada especie de vector usualmente transmite solo una especie de *Leishmania* que es responsable de una forma clínica (Bates, 2007). En la última década se han propuesto y estudiado otros probables vectores, entre ellos el flebotomino *Warileya rotundipennis* en Colombia (Moreno *et al.*, 2015). Por otro lado, también se ha reportado la presencia de *Leishmania* sp. en un artrópodo no insecto: la garrapata (Dantas-Torres, 2011). Se encontró *L. infantum* en intestinos, ovarios y glándulas salivares de garrapatas de perros (*Rhipicephalus sanguineus*) en zonas de leishmaniasis visceral humana y canina en Brazil, sin la presencia de *Lutzomyia* sp. (Viol, 2016). Mientras que la detección de *Leishmania (V.) guyanensis* en *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* recolectados de pecaríes de collar (*Pecari tajacu*) en Perú, es un hallazgo importante en el estudio de otros posibles vectores de la LTA, y a sus probables reservorios silvestres (Rojas-Jaimes, Correa-Núñez, Rojas-Palomino, Cáceres-Rey, 2017).

Hasta el momento, la transmisión se limita al ambiente a rural o periurbano. Los estudios que han reportado *Leishmania (Viannia)* en perros de zonas urbanas sugieren que los perros se contagian por la presencia del vector en lugares con vegetación residual (Cerino *et al.*, 2010). La adaptación de vectores y reservorios silvestres, como los roedores sinantrópicos, a zonas de alta densidad poblacional favorece la transmisión de esta en peridomicilos y domicilios de áreas rurales y urbanas (Rosário, Andrade, Ligeiro, Ishak, y Silva, 2017). Además, en una investigación realizada en un área mayoritariamente urbana se mencionó que los casos humanos pediátricos podrían deberse al aumento de reservorios periurbanos en zonas de transición urbano-rural y urbano-vegetación residual simultáneamente a la distribución de vectores en estas zonas (Gil *et al.*, 2010)

El Perú es un país endémico de LTA humana en donde se han reportado las especies *L. (V.) peruviana*, *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) amazonensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) braziliensis* y *L. (V.) mexicana* (Sánchez-Saldaña *et al.*, 2004; González *et al.*, 2009). Tiene una amplia distribución que abarca el 74% de la superficie del territorio y afecta continuamente al menos a 18 departamentos de la región altoandina y la región amazónica, pero también en departamentos de la costa (OMS; CDC-Perú, 2018). Los departamentos con mayores reportes son San Martín, Cajamarca, Cusco, Piura y Madre de Dios. Su incidencia anual varía según los cambios sociodemográficos y ecológicos, observándose una disminución de la tasa de incidencia en el 2015 y su posterior incremento al año siguiente (CDC-Perú, 2019).

Las especies de mayor prevalencia en el Perú son *L. (V.) peruviana* y *L. (V.) braziliensis* (CDC-Perú, 2018), ambas detectadas en perros domésticos con o sin lesiones sugerentes de leishmaniasis. Reithinger *et al.*, reportaron en el 2003(a) una prevalencia del 26% de *Leishmania (Viannia)* spp. en perros domésticos de zonas endémicas de *L.*

(*V. peruviana* y *L. (V.) braziliensis* en Huánuco, el cual se encuentra ubicado en el llano amazónico. Además, la detección de positivos fue altamente sensible debido al diagnóstico por PCR, y, al usar datos de una encuesta retrospectiva, se encontró una asociación positiva entre el riesgo de leishmaniasis humana y la prevalencia local de leishmaniasis canina (Reithinger *et al.*, 2003b).

Por otro lado, en la región altoandina se detectó una infección por *Leishmania* sp del 5.4% en la población de caninos domésticos del distrito de Pampas Grande (Ancash), con antecedentes de infección natural por *Leishmania (Viannia) peruviana* en perros. Se realizaron tres técnicas diagnósticas a 87 perros: frotis directo, intradermorreacción (IDR) e IFI; y, aunque no se encontraron lesiones cutáneas o mucosas activas, dos de tres perros positivos a las 3 pruebas diagnósticas presentaron lesiones cicatriciales en la nariz, sugestivas de leishmaniasis cutánea (Medina *et al.*, 2002).

Sustentando lo anteriormente expuesto, la OMS refiere a la epidemiología de la LTA humana como compleja, con variaciones intra e inter específicas en los ciclos de transmisión, vectores, hospederos reservorios, manifestaciones clínicas y respuestas terapéuticas, además de la presencia de distintas especies de *Leishmania* circulantes en la misma área geográfica; la cual la caracteriza y distingue de la leishmaniasis visceral americana y de la leishmaniasis del Viejo Mundo.

Como parte de la adaptación evolutiva de los vectores a los entornos semiurbanos y urbanos, es probable que los animales domésticos desempeñen un rol como nuevos hospederos oportunistas. Un supuesto que podría explicar la nueva dinámica epidemiológica es la destrucción progresiva del hábitat natural del vector por parte de los humanos, desastres naturales y el calentamiento global. Las poblaciones humanas en riesgo están definidas por patrones de desplazamientos relacionados con el turismo y por

poblaciones desplazadas por guerras, crisis económicas y desastres naturales (Torres-Guerrero, 2017).

Tabla 2.

Especies de Leishmania reportadas en perros en Sudamérica, causantes de la LTA

Especies	Forma de enfermedad	Vector sospechoso o probado*	Distribución geográfica
<i>L. amazonensis</i>	Visceral	Desconocido	Brasil
<i>L. braziliensis</i>	Cutánea / mucocutánea	<i>Lu. whitmani</i> , otros	Argentina, Bolivia, Brasil, Colombia, Perú, Venezuela
<i>L. colombiensis</i>	Visceral (cutánea y visceral en humanos)	Desconocido	Venezuela
<i>L. mexicana</i>	Cutánea	<i>Lu. ayachuchensis</i>	Ecuador
<i>L. panamensis</i>	Cutánea	<i>Lu. trapidoi</i>	Colombia, Ecuador
<i>L. peruviana</i>	Cutaneous	<i>Lu. peruensis</i> , <i>Lu. verrucarum</i>	Perú
<i>L. pifanoi</i>	Cutánea	Desconocido	Ecuador

Nota: Fuente: Dantas-Torres, F. (2009). Canine leishmaniosis in South America. *Parasites & Vectors*, 2(Suppl 1), S1. doi:10.1186/1756-3305-2-s1-s1

*Especies de *Lutzomyia* sospechosas de estar involucradas en la transmisión de *Leishmania* spp. a perros en Sudamérica.

2.2.4. Diagnóstico

Las pruebas de laboratorio para el diagnóstico de la leishmaniasis canina han sido estudiadas ampliamente por todo el mundo, pero la mayoría de los estudios se centran en la forma visceral y pocos abarcan la leishmaniasis cutánea y mucocutánea. Además, estas pruebas varían en sensibilidad, especificidad y eficacia entre los distintos países (Trevisan

et al., 2015). En Europa, el diagnóstico está basado en un conjunto de criterios, que incluyen la presencia de signos clínicos, anomalías clínico-patológicas y evidencia de infección; siendo así, que cuando se sospecha que un perro tiene leishmaniasis, este debe ser sometido a un panel de exámenes de laboratorio: examen citológico de frotis (tinción Giemsa) de diferentes muestras (lesiones cutáneas, ganglios linfáticos, médula ósea y bazo), pruebas serológicas y ensayos moleculares. Esto difiere de los procedimientos realizados por la mayoría de los veterinarios de América del Sur, probablemente porque los propietarios que viven en áreas rurales alejadas no pueden pagar los servicios veterinarios, por la escasa disponibilidad de herramientas de diagnóstico molecular y la falta de guías prácticas para el manejo de la enfermedad (Dantas-Torres, 2012).

Las pruebas diagnósticas recomendadas son las clínicas, parasitológicas (recolección directa del material de la lesión), inmunológicas (pruebas de anticuerpos, antígenos o respuesta inmune celular) y moleculares (Trevisan *et al.*, 2015). El diagnóstico parasitológico es necesario para la confirmación de la leishmaniasis tegumentaria (mediante el raspado o la aspiración con aguja del borde de las úlceras), pues el examen clínico ni la serología son suficientes. Los frotis de biopsias lesionales se tiñen con solución Giemsa y se examinan microscópicamente de 600 a 1000 aumentos para ver los amastigotes. Las muestras obtenidas del raspado o aspirado también deben cultivarse en medios adecuados a una temperatura de 22 a 26 ° C para la observación microscópica de los promastigotes (Organización Mundial de Sanidad Animal [OIE], 2014). Además, las muestras de biopsias deben ser homogeneizadas en solución salina o en un medio de cultivo en condiciones estériles, lo que hace al procedimiento más complejo (OMS, 2010).

La sensibilidad del frotis tiene un amplio rango de variación y ha sido reportado en estudios de leishmaniasis humana. Se ha documentado que va del 15 al 70%,

dependiendo de diversos factores, mientras que su especificidad es cercana al 100%. Similar a ello, la sensibilidad del cultivo en los medios tradicionales como el agar sangre NNN y el medio de *Drosophila* de Schneider puede variar del 40 a 75%, y su especificidad es casi completa (Gomes *et al.*, 2014). En síntesis, el diagnóstico parasitológico es el método más fiable por su elevada especificidad y bajo costo; sin embargo, la sensibilidad está condicionada por factores como la localización geográfica, toma de muestra, tipo de muestra, fase de la enfermedad, especie y carga parasitaria (Saridomichelakis *et al.*, 2005; Moreira *et al.*, 2007; Manna *et al.*, 2009).

Las pruebas serológicas son frecuentemente usadas para mejorar la sensibilidad de las pruebas parasitológicas para la detección de casos sintomáticos que resultaron falsos negativos, diagnosticar infección y exposición (Saridomichelakis, 2009). Aunque, estas pruebas generalmente son menos eficaces cuando son usadas para el diagnóstico de la leishmaniasis cutánea y mucocutánea (OMS; OIE, 2014), y su uso como herramienta válida depende de los protocolos y de nuevas adaptaciones. Como ejemplos se tienen al ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) y al Western blot, técnicas muy reportadas y usadas simultáneamente para la evaluación de sensibilidad. Longoni *et al.* (2011) utilizaron las fracciones antigénicas de Fe-SODe (superóxido de hierro dismutasa) y H (extracto total de cultivo de *Leishmania*) para la reacción del ELISA y Western blot. Estas fracciones provenían de cultivos de *L. mexicana*, *L. braziliensis* y *L. panamensis* purificados. El 2.8% (4/70) de perros fueron positivos en la fracción H de ELISA, uno positivo a *L. mexicana* y 3 a *L. braziliensis*. La fracción ELISA de Fe-SODe fue positiva en 37 animales (25.9%), identificando principalmente *L. mexicana* y *L. braziliensis*, y solo una pequeña cantidad de *L. panamensis*. En este estudio también se usó la fracción de Fe-SODe para la evaluación de la presencia de anticuerpos por Western blot, y se

obtuvo 33 (47.1%) resultados positivos para *L. mexicana* y 30 (42.9%) para *L. braziliensis* (Longoni *et al.*, 2011).

Asimismo, en un estudio realizado por López-Céspedes *et al.* (2012), en el que también utilizaron las fracciones de H y Fe-SODE en cultivos de *L. mexicana*, *L. braziliensis* y además *L. infantum* para pruebas de ELISA y Western Blot; el ELISA-H tuvo una baja sensibilidad, y Fe-SODE-ELISA y Western blot Fe-SODE fueron más sensibles a todas las especies investigadas. La positividad para *L. braziliensis* fue 7.5%, un 20.6% para *L. mexicana* y 6.1% para *L. infantum* (López-Céspedes 2012).

La Inmunofluorescencia Indirecta (IFI) es una técnica muy usada por su sencilla realización. Aunque es específica para el género, se han reportado reacciones cruzadas significativas en individuos infectados con *Trypanosoma cruzi* y falsos negativos (Silva *et al.*, 2011; Alves *et al.*, 2012). En estos casos se recomiendan las pruebas de antígenos específicos de *Leishmania* recombinantes (OIE, 2014). En Brasil y México, las pruebas más utilizadas para el diagnóstico de la leishmaniasis cutánea canina son el examen directo de la lesión cutánea, IFI, ELISA, Reacción de Cadena de Polimerasa (PCR) y cultivo; y. de estos, las pruebas de IFI y ELISA obtuvieron mayor reactividad cuando se utilizó sangre animal, y se consideran los más sensibles (Trevisan *et al.*, 2015).

La PCR es una técnica molecular que es más sensible que otros métodos diagnósticos (De Bruijn *et al.*, 1993). Los métodos en tiempo real permiten el monitoreo continuo de la acumulación de productos durante la amplificación y su principal función es evaluar la cinética de la infección y monitorear la respuesta terapéutica. Además, puede ser más sensibles que la PCR convencional y también puede usarse en muestras biológicas menos invasivas como la sangre periférica (OIE, 2014). Sin embargo, algunos investigadores refieren que el uso de este diagnóstico en la leishmaniasis tegumentaria

canina no siempre otorga resultados consistentes, debido a los escasos materiales tisulares que podrían dar resultados positivos a PCR, además que se ha reportado diferencias en el diagnóstico de tejidos del mismo perro (Reithinger *et al.*, 2000; 2002), así como resultados negativos de todas las muestras de sangre de los animales (Calzada *et al.*, 2015).

Para concluir, según las investigaciones en leishmaniasis tegumentaria canina (y felina), los métodos de diagnóstico más utilizados son IFI, ELISA, PCR, las pruebas directas de la lesión y Western blot. Este último, al realizarse a partir de la fracción purificada de Fe-SODe, ha mostrado alta sensibilidad, especificidad y eficacia. Las evidencias sugieren que se utilice más de una técnica para la detección de la leishmaniasis y que se use la técnica Western blot con fracción de Fe-SODe (Trevisan *et al.*, 2015).

2.2.5. Tratamiento

La mejoría depende de factores como la condición inicial, carga parasitaria y la respuesta al tratamiento, e incluso la cura de la lesión puede ser espontánea (Dantas-Torres *et al.*, 2011). Las terapias derivan de ensayos clínicos en perros infectados con *L. infantum*. El antimonio de meglumina, usado tradicionalmente en humanos, tiene un buen efecto en el tratamiento de la leishmaniasis canina (Vélez, Carrillo, López, Rodríguez, y Robledo, 2012); sin embargo, su uso en perros no está aprobado por referentes como la FDA (Food and Drug Administration) ni por el gobierno de Brasil; y este último prohíbe cualquier fármaco de uso humano (Oliva *et al.*, 2010; Dantas-Torres *et al.*, 2011).

El alopurinol es la primera línea de elección en el tratamiento a largo plazo, y es el único fármaco recomendado por la OMS. Cuando se incorporan amastigotes intracelulares, la droga se transforma en un compuesto tóxico que los elimina (Oliva *et al.*, 2010). Se ha observado su efecto potenciado en la administración oral de 10 mg/Kg

cada 12 horas durante seis meses junto al antimonio de meglumina a 100 mg/Kg vía subcutánea, una vez al día durante un mes. Esto depende del estadio de la enfermedad, tolerancia individual y la resistencia al tratamiento. También debe monitorearse efectos adversos como urolitiasis y nefrotoxicidad (Ribeiro *et al.*, 2018).

El tratamiento con miltefosina (Milteforan TM) fue aprobado por el Ministerio de Agricultura, Ganadería y Abastecimiento (MAPA) de Brasil en el 2016, una década después de haberse aprobado su uso en Europa (MAPA, 2016). Aun así, el antimonio de meglumina junto con alopurinol sigue siendo más efectivo que el tratamiento de miltefosina junto con alopurinol (Manna *et al.*, 2015).

Es posible la cura parasitológica mediante una terapia antimonio de meglumina encapsulada en liposomas y alopurinol (da Silva *et al.*, 2012). La dosis recomendada es de 0,5 mg / kg cada 24 horas durante 30 días, en mayor actividad vectorial (en países donde la actividad de vectores es estacional) (Lacomble *et al.*, 2009; Sunter y Gull, 2016); pero en países tropicales donde esta es permanente, se requiere evaluar un tratamiento preventivo (Acero, Ángel, Fonseca, Ferrer, y Roura, 2015). Dado este caso, se reportó en un área de elevada seroprevalencia de leishmaniasis canina de España, que la terapia inmunomoduladora con domperidona puede mejorar la defensa innata al activar los fagocitos y potenciando la destrucción intracelular de los parásitos. Se logró una tasa de prevención del 80% en el primer año (Sabaté, Llinás, Homedes, Sust, y Ferrer, 2014).

También se han realizado investigaciones en el tratamiento de la forma tegumentaria, como la administración local de fármacos. En un estudio en el que se aplicó un fármaco de uso humano en una terapia intralesional de antimonio de meglumina (Glucantime®) a una dosis de 85 mg a perros infectados naturalmente con *Leishmania (V.) braziliensis*, se evidenció la cura completa de las lesiones en el 86.6% de los animales

(Barbosa-Santos *et al.*, 1998). En el 2006, Travi *et al.* reportaron una investigación sobre el uso del mismo fármaco en perros infectados con *Leishmania (V.) braziliensis* mediante una sola inyección peri y sub lesional de 1 a 2 ml y obtuvieron la curación clínica a las 6 semanas del tratamiento. Se han observado resultados positivos con la terapia de calor inducido por radiofrecuencia (RFH), en la que se reportó que la aplicación durante 3 segundos de RFH bajo anestesia local es segura y suficiente para producir la cura clínica de la leishmaniasis cutánea dentro de 45 días, así como la resolución de la lesión. Ahuja *et al.* (2012) recomiendan esta terapia no farmacológica por su seguridad, corto tiempo de realización y su efecto a largo plazo. Recientemente en Brasil, una terapia de furazolidona alternada con domperidona ha mostrado efectividad para desarrollar epitelización y cura de las heridas en perros con signos clínicos de leishmaniasis tegumentaria por *L. (V.) braziliensis* (Passos, Rodrigues, Madureira, Giunchetti y Zanini, 2014).

2.2.6. Control y Prevención

Las medidas de control y prevención son las mismas aplicadas en la leishmaniasis visceral canina, y las investigaciones conllevan a que su control es dificultoso debido a su complejo ciclo de transmisión, en donde participan vectores con biología y ecología complejas. A diferencia de los mosquitos, los flebotominos se reproducen en zonas distribuidas uniformemente de alta humedad (raíces de árboles, cavidades de roca, troncos de árboles y grietas húmedas en el suelo), con lo cual no es posible el control (Dantas-Torres, 2012).

El sacrificio de perros seropositivos ha sido una medida de control muy usada principalmente en la leishmaniasis visceral canina; sin embargo, no es ético y, sobre todo, diferentes estudios no han demostrado una reducción en la incidencia de la leishmaniasis visceral humana (Romero y Boelaert, 2010); además aquellos países en donde se ha

implementado esta medida dentro de los programas nacionales para el control de la leishmaniasis visceral, han fracasado (Ribeiro *et al.*, 2018). En cambio, el tratamiento podría ser conveniente para reducir la posible capacidad de reservorio del perro, lo cual lleva a la hipótesis de que, si los caninos son fuentes eficientes de *Leishmania* para los vectores, el tratamiento de las lesiones cutáneas podría llegar a ser en un método razonable para disminuir el riesgo de la leishmaniasis humana en el entorno peridoméstico sin sacrificar perros infectados (Travi *et al.*, 2006).

Las medidas profilácticas frecuentemente usadas consisten en el uso de repelentes que contienen piretroides sintéticos (deltametrina, permetrina o flumetrina) solos o en combinación con otros insecticidas, que muestran un efecto sinérgico. El efecto de protección contra los flebotominos después de su uso puede variar de 2 a 4 semanas en formulaciones puntuales y de 4 a 8 meses en collares de polivinilcloruro (PVC) impregnados (Scalibor® y Seresto®), para su uso en perros infectados y no infectados (Ribeiro *et al.*, 2018).

Por otro lado, es de suma importancia el control fronterizo tanto en países libre de la enfermedad como en aquellos que presentan solo la forma tegumentaria. En Lima (Perú) se reportó un caso de leishmaniasis visceral canina importado desde España (Vega *et al.*, 2014), y aunque los resultados fueron informados por SENASA a la Organización Panamericana de la Salud y al Ministerio de Salud del Perú, el descarte de leishmaniasis sigue sin estar incluido dentro de los requisitos del SENASA para la importación de animales. Mientras que, en Uruguay, país libre de leishmaniasis, se estableció como requisito para el ingreso de canes que conste que el/ los animales sean negativos a la prueba de detección inmunitaria a leishmaniasis, realizada dentro de los 60 (sesenta) días previos al ingreso al país (Resolución GMC Mercosur N° 17/15, 2017).

III. METODOLOGÍA

3.1. Localización

El estudio se llevó a cabo en localidades endémicas de leishmaniasis de la provincia de La Convención ($12^{\circ}51'48''S$ $72^{\circ}41'35''O$) (Figura 1), en los centros poblados de Kiteni y sus comunidades cercanas (Figura 2) e Ivochote (Figura 3), ubicados en el distrito de Echarati, de la Micro Red de salud de Kiteni; y en el centro poblado de Kquelccaybamba y comunidades adyacentes, ubicados en el distrito de Ocobamba (Figura 4). Echarati tiene una altitud media de 1162 m.s.n.m con una superficie de 19135,5 Km². La Micro Red de Salud de Kiteni está ubicado en la región natural Ceja de selva, caracterizado por un clima tropical húmedo, con una precipitación anual media que fluctúa entre los 2100 y 2600 mm. Kiteni poblado se encuentra a una altitud aproximada de 605 m.s.n.m e Ivochote poblado a una altitud aproximada de 517 m.s.n.m. El distrito de Ocobamba tiene una altitud media de 1543 m.s.n.m y abarca una

superficie de 840,93 Km². Está ubicado en Ceja de selva. El centro poblado de Kquelccaybamba es la capital y se encuentra a una altitud aproximada de 1479 m.s.n.m.

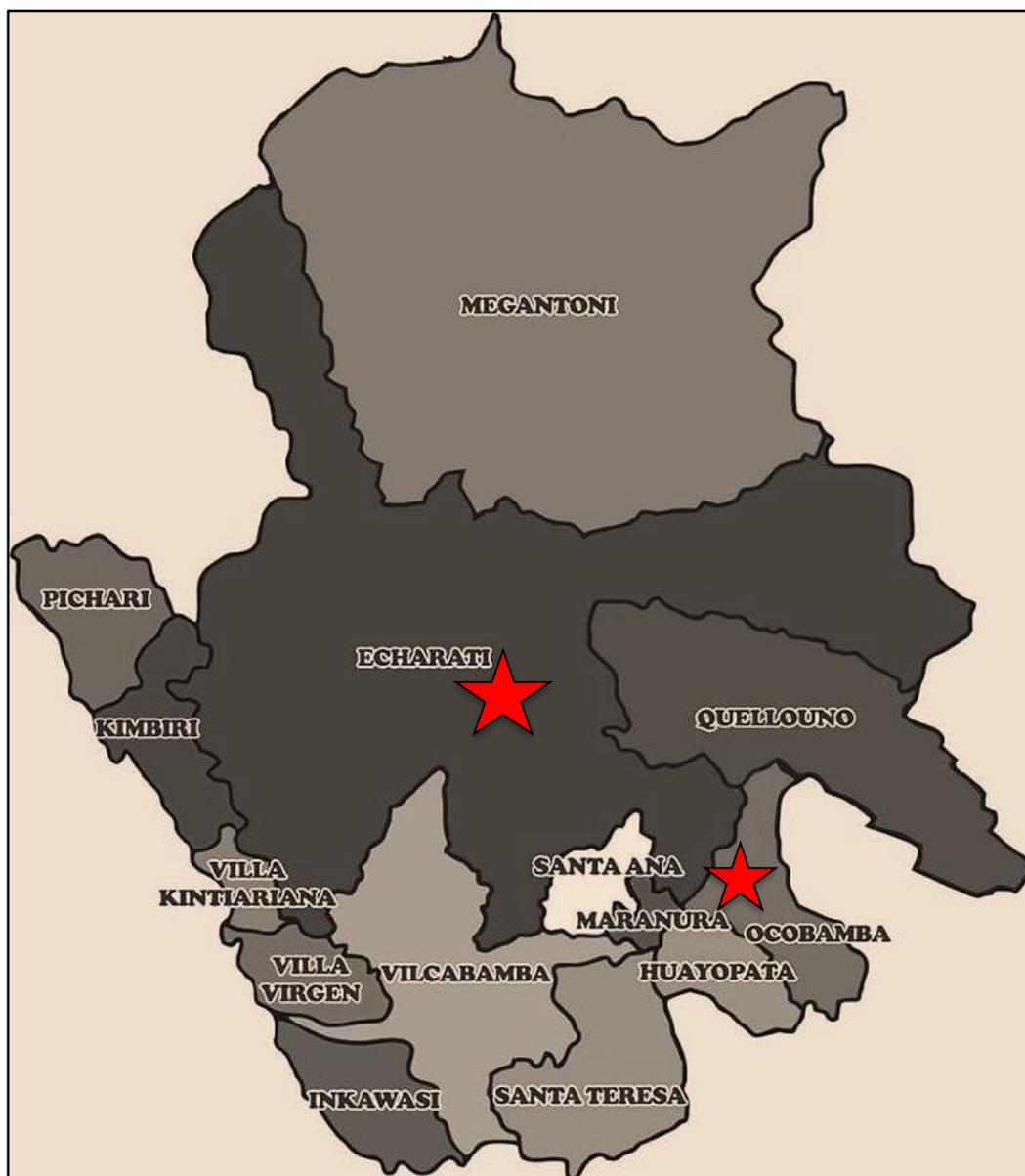


Figura 1. Provincia de La Convención

Nota: Fuente: Harry AC. Pinterest. Recuperado de:
<https://www.pinterest.com/pin/124552745929861163>
Zona de estudio (estrella)



Figura 2. Centro Poblado de Kiteni y comunidades. Mapa de riesgo de enfermedades metaxénicas 2015

Nota: Fuente: Centro de Salud de Kiteni

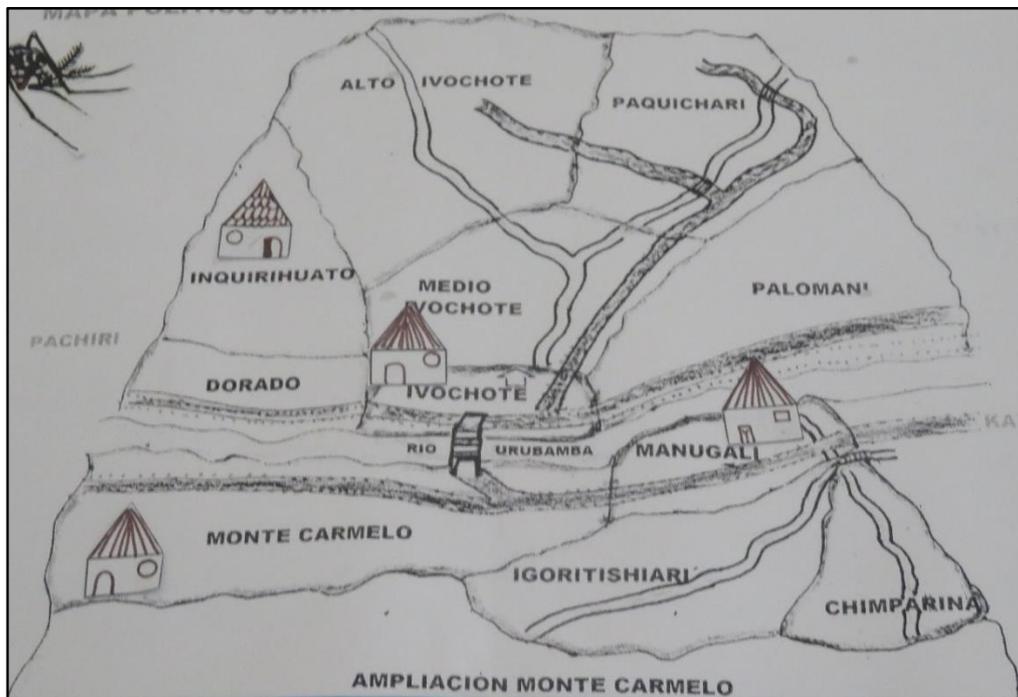


Figura 3. Centro Poblado Ivochote

Nota: Fuente: Establecimiento de Salud de Ivochote

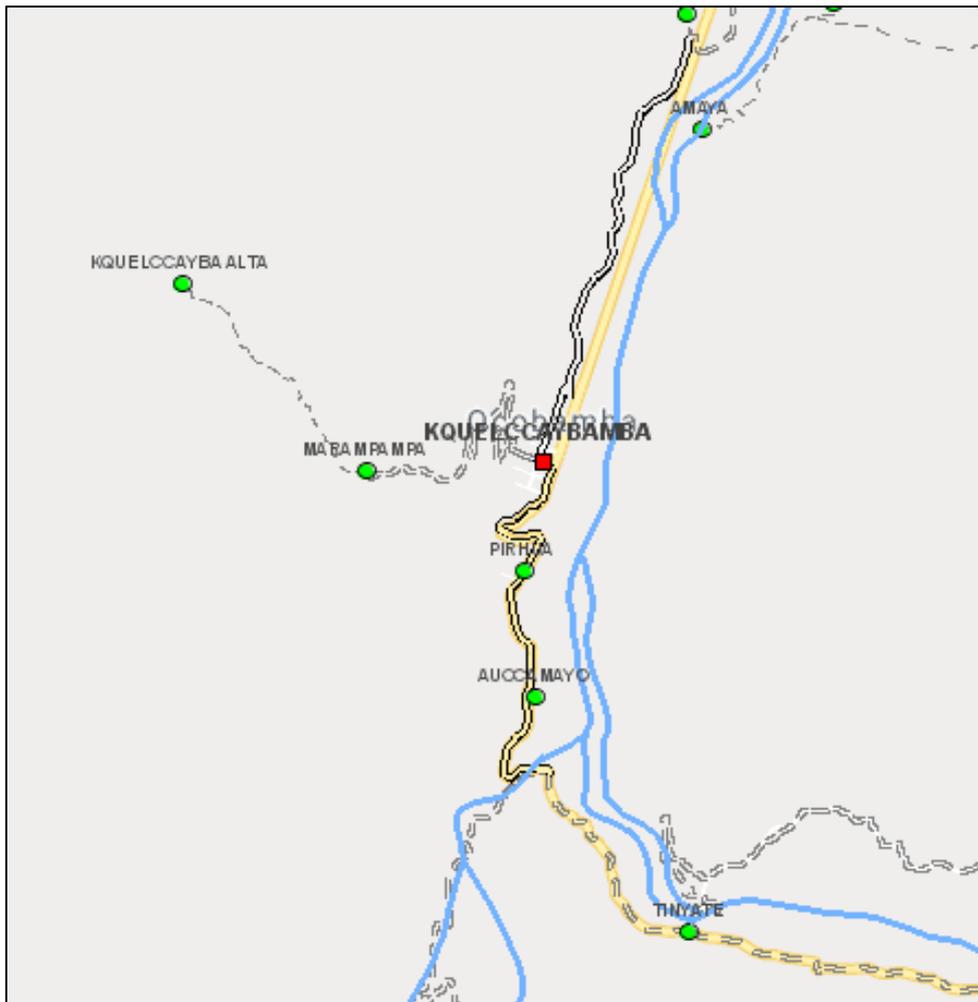


Figura 4. Centro Poblado Kquelccaybamba, distrito de Ocabamba

Nota: Fuente: INEI. Sistema de Consulta de Centros Poblados

3.2. Población y muestra

La población de estudio fueron los caninos domésticos con o sin lesiones sugerentes de leishmaniasis, que vivían en zonas endémicas de leishmaniasis humana en la provincia de La Convención durante los años 2015 al 2017. Dentro de la zona de estudio se ha reportado *Leishmania (Viannia) braziliensis* y *Leishmania (Viannia) peruviana* como especies predominantes que infectan a humanos (Aguilar, 2014). Hasta el momento no se cuenta con una estimación adecuada de población canina que permita utilizar los porcentajes de cobertura de vacunación de manera confiable para ser aplicados y tomados de referencia para el cálculo de tamaño de muestra (CDC-Perú, 2018b). Debido a ello, en

este estudio se realizó un muestreo no probabilístico por conveniencia, tomando como referencia las zonas reportadas de leishmaniasis humana por los establecimientos de salud.

Participaron del estudio 46 caninos domésticos de ambos sexos equitativamente y el grupo etario predominante fue el juvenil. La mayoría de ellos perteneció al distrito de Echarati. Del total de perros, 15 presentaron lesiones cutáneas y/o mucosas activas y/o cicatrizadas. Las zonas afectadas fueron nariz, boca, escroto y otras no usuales (Tabla 3).

3.3. Diseño de estudio

El diseño de estudio es exploratorio, transversal y observacional. No se consideró edad mínima o máxima. Se estratificó en tres grupos etarios: ≤ 2 años, 3-7 años y ≥ 8 años; de acuerdo a los criterios de posible exposición y a la clasificación de edad según al probable riesgo reportado en la leishmaniasis visceral canina (Abranches *et al.*, 1991; Cardoso *et al.*, 2004; Mahshid *et al.*, 2013; Sabzevari *et al.*, 2016; Živičnjak *et al.*, 2005). Los criterios de exclusión fueron individuos clasificados referencialmente (mediante exploración física e historia clínica) como ASA 3 (American Society of Anesthesiologists) en adelante y hembras gestantes o nerviosas/agresivas (no se aplica sedación). Se realizó el análisis estadístico mediante la prueba de Chi Cuadrado y cuando no cumplió con los supuestos se usó la Prueba Exacta de Fisher. Se evaluaron las asociaciones entre la variable presencia de *Leishmania (V) sp.* y grupo etario, sexo, lugar que frecuenta y leishmaniasis humana. Alternativamente, se asoció la variable presencia de lesión con las mismas variables de exposición. Para el reporte de frecuencias, se incluyeron también la localización de la lesión y el distrito de procedencia. Los análisis se realizaron usando el software estadístico STATA 12.

Tabla 3.

Características de los caninos domésticos muestreados (n=46)

Características	n (%)
Lesión	
No	31 (67.4)
Sí	15 (32.6)
Localización de lesión	
Sin lesión	31 (67.4)
Nariz/labio	10 (21.7)
Escroto	1 (2.2)
Otro	3 (6.5)
Más de una zona	1 (2.2)
Sexo	
Hembra	23 (50)
Macho	23 (50)
Grupo etario	
≤ 2 años	24 (52.2)
3-7 años	14 (30.4)
≥ 8 años	8 (17.4)
Lugar que frecuenta	
Casa	17 (37)
Calle	3 (6.5)
Chacra	21(45.6)
Otro	5 (10.9)
Distrito	
Echarati	37 (80.4)
Ocobamba	9 (19.6)

3.4. Recolección de muestras y procesamiento

Previo a la toma de muestra, se solicitó el consentimiento informado del propietario o persona encargada del canino (Anexo 1). Luego se procedió a completar la ficha clínica epidemiológica con los datos del animal (Anexo 2) obtenidos por examen físico y un breve cuestionario al propietario o encargado. Se sedaron a los animales con lesiones activas, y a aquellos que fueron de dificultoso manejo para la toma de muestra, tomando

como referencia sus datos clínicos para la dosificación de los fármacos. Se aplicó xilacina al 2% sola o adicionada a tramadol para la sedación mediante vía intramuscular, y anestesia local con lidocaína al 2% en el área circundante a la lesión.

Una vez que los animales mostraron los efectos de la sedación, fueron aproximados a un espacio ambientado para la toma de muestra con un mechero cercano a los materiales de recolección y almacenamiento. Se limpiaron las lesiones con solución salina fisiológica, posteriormente se aplicó la anestesia local y se tomaron muestras de raspado, biopsia y/o aspirado de cada lesión activa (Anexo 3). Primero se recolectaron muestras para el cultivo en dos medios de agar sangre y un medio para *Drosophila* de Schneider. Se tomaron los mismos tipos de muestras para el respectivo frotis en láminas portaobjeto. Se recolectó aproximadamente 5 mL de sangre entera en tubos estériles, obtenida mediante la punción venosa de la vena cefálica. Todas las muestras se almacenaron temporalmente en contenedores térmicos de plástico con paquetes de hielo reutilizables.

El procesamiento de las muestras fue realizado en el Instituto Universitario de Enfermedades Tropicales y Biomedicina del Cusco (IUTBC) de la Universidad Nacional San Antonio Abad del Cusco (UNSAAC), siguiendo la norma técnica de diagnóstico y tratamiento de la leishmaniosis en el Perú (MINSa) para el diagnóstico de leishmaniasis por diagnóstico parasitológico. Para el diagnóstico parasitológico por frotis, primero se fijó el material recolectado con alcohol metílico durante 3 minutos. Se realizó la tinción con solución de trabajo Giemsa durante 30 minutos y luego se descartó el colorante y se lavaron las láminas con agua corriente. Luego se dejaron secar al medio ambiente y se procedió a leer las láminas con el objetivo 40X para la localización de los parásitos. Se observó con el objetivo 100X, con aceite de inmersión, para la visualización y determinación de *Leishmania*. Los tubos de cultivo fueron almacenados en una estufa a un rango de temperatura de 24 - 25 °C y revisados semanalmente para buscar amastigotes

con el objetivo 40X, hasta la cuarta semana. Los sueros fueron congelados y almacenados para estudios futuros.

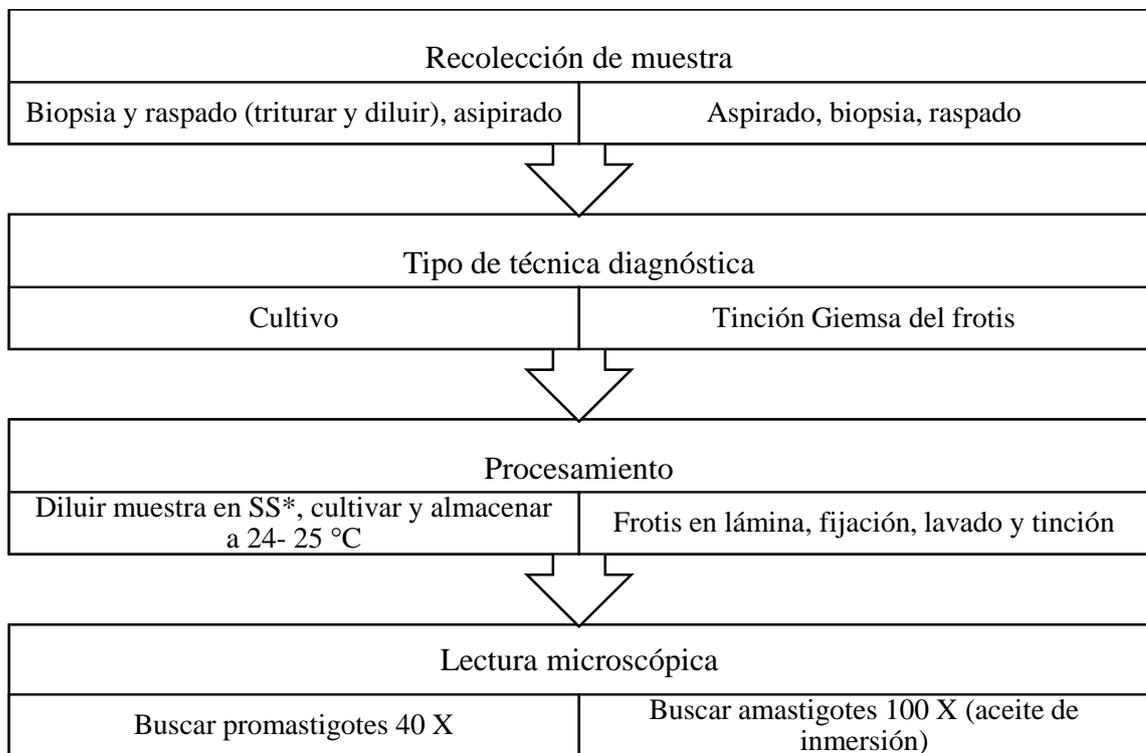


Figura 5. Flujograma de recolección y procesamiento de muestras.

Nota: Fuente: Elaboración propia
SS*: Solución Salina

IV. RESULTADOS

Se detectó la presencia de *Leishmania (Viannia) spp.* en el 19.6 % (9/46) de los caninos domésticos mediante la técnica de frotis directo de la lesión. El reconocimiento de los amastigotes y sus estructuras hizo posible el diagnóstico (Anexo 4). El 32.6% (15/46) de animales tuvieron lesiones activas y/o cicatrices sugerentes de leishmaniasis. El 60% (9/15) de los perros con lesiones sospechosas fueron positivos al diagnóstico directo por frotis y ningún medio de cultivo logró aislar al parásito (Tabla 4).

Tabla 4.

Caninos domésticos de La Convención con lesiones sugerentes de LTA, positivos a Leishmania (Viannia) spp. según técnica diagnóstica (n=15)

Características de las lesiones	n° de caninos	Técnica de frotis, n (%)	Técnica de cultivo	
			Agar Sangre, n (%)	Medio de Drosophila de Schneider, n (%)
Activa	7	6 (40)	0 (0)	0 (0)
En cicatrización	2	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Cicatriz	1	*NR	*NR	*NR
Activa y Cicatriz	5	3 (20)	0 (0)	0 (0)

Nota: *NR: Diagnóstico no realizado debido al grado de cicatrización de la lesión.

Las lesiones más frecuentes se hallaron en la nariz, en donde se observaron en su mayoría más de una lesión (activas y cicatrices) (Figura 6). Un canino macho presentó heridas en nariz y en el escroto (Anexo 5). Un animal fue afectado en nariz y boca en estado avanzado hasta perder parte del labio (Anexo 6). Otras zonas afectadas según el reporte de los propietarios y a la examinación preliminar fueron el lomo, la pata (carpo) y la caña nasal. La lesión más antigua que fue diagnosticada positiva a *Leishmania sp.* tuvo aproximadamente 12 meses de enfermedad. Se reportó a un animal con un tiempo lesión alrededor de los 6 años (72 meses) (Anexo 7).

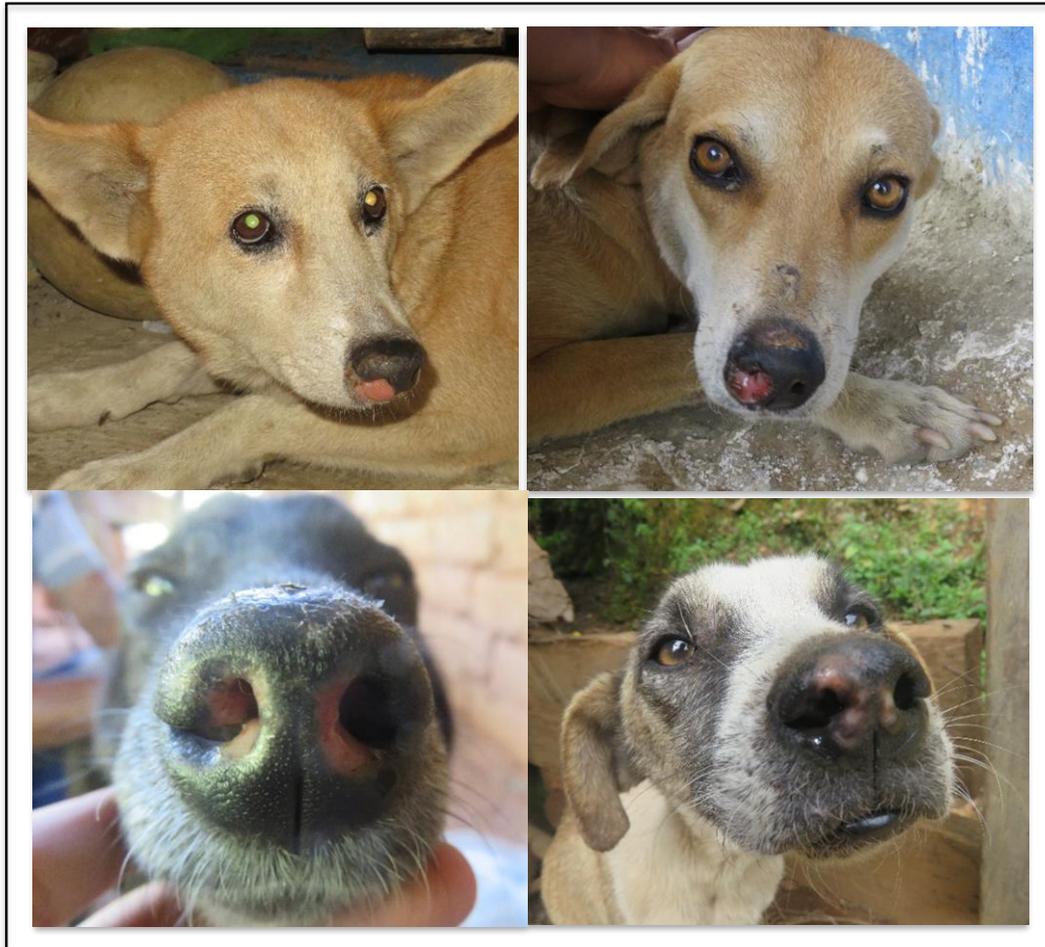


Figura 6. Lesiones mucosas en nariz

Nota: Lesiones ulcerosas, con despigmentación y queratinización, compatibles con leishmaniasis tegumentaria canina

La variable lugar que frecuenta fue categorizada para el análisis en base a la exposición en bosque (chacra o área de abundante vegetación) y no bosque (casa, otra edificación o territorio con escasa o nula vegetación). Se reportó historia de leishmaniasis humana en el propietario o personas cercanas a los animales, en perros con y sin lesiones (Tabla 6).

Tabla 5.

Factores asociados a la leishmaniasis tegumentaria americana canina mediante la técnica diagnóstica de frotis lesional (n=46).

Características	Diagnóstico positivo n (%)	Valor p	Presencia de lesión, n (%)	Valor p
Sexo				
Hembra	6 (13)	0.46	8 (17.4)	0.75
Macho	3 (6.5)		7 (15.2)	
Grupo etario				
≤ 2 años	4 (8.7)	0.6	5 (10.9)	0.21
3-7 años	4 (8.7)		6 (13)	
≥ 8 años	1 (2.2)		4 (8.7)	
Total	9 (19.6)		15 (32.6)	

Nota: No se encontró asociación significativa ($p>0.05$) entre el sexo o grupo etario, y el diagnóstico de *Leishmania (Viannia) spp.*, ni asociación con la presencia de lesión

Tabla 6.

Factores asociados a la leishmaniasis tegumentaria americana canina mediante la técnica diagnóstica de frotis lesional (n=46). Variables asociadas

Características	Diagnóstico positivo, n (%)	Valor p	Presencia de lesión, n (%)	Valor p
Lugar que frecuenta				
No bosque	1 (2.2)	0.24	2 (4.3)	0.09
Bosque	8 (17.4)		13 (28.3)	0.051 (1-t)*
Leishmaniasis humana				
No	2 (4.3)	0.14	4 (8.7)	0.06
Sí	7 (15.2)	0.09 (1-t)*	11 (23.9)	0.045 (1-t)*
Total	9 (19.6)		15 (32.6)	

Nota: * Prueba de hipótesis de una cola (1-t)

No se encontró asociación ($p>0.05$) entre la presencia de *Leishmania (Viannia) spp.* y las variables de exposición. Además, se tomó la variable presencia de lesión como desenlace

de interés para evaluar la asociación; dicho análisis mostró una asociación marginal ($p=0.051$) entre la presencia de lesión y el lugar que frecuenta el animal, en la hipótesis de una cola mediante la prueba exacta de Fisher. Asimismo, se determinó la asociación entre la presencia de lesión y la leishmaniasis humana ($p<0.05$), mediante el mismo análisis estadístico en hipótesis de una cola (Tabla 5 y Tabla 6)

V. DISCUSIÓN

Esta investigación determinó la presencia de *Leishmania (Viannia) spp.* en caninos domésticos de La Convención, siendo el primer reporte en la región. La presencia del protozoario concuerda con los hallazgos previos en zonas endémicas de leishmaniasis humana en Huánuco y Ancash (Reithinger *et al.*, 2003a; Medina *et al.*, 2002), en donde se reportaron perros con lesiones activas y cicatrizadas sugerentes de leishmaniasis; estos fueron diagnosticados mediante cultivo, frotis, intradermorreacción, inmunofluorescencia y reacción de cadena de polimerasa.

El 64.3% (9/14) de los perros a los que se les realizó el diagnóstico parasitológico fueron positivos al examen de frotis de las lesiones, lo cual coincide con lo reportado por Reithinger *et al.* (2003a) con 85% de casos positivos, mediante la técnica de frotis de biopsias de las lesiones activas. Por otro lado, en un estudio observacional de leishmaniasis humana en Pakistán, Bari y Rahman (2006) reportaron un 60% de pacientes positivos mediante frotis de las lesiones, en donde los individuos manifestaron heridas

hasta de 12 semanas de antigüedad. Por lo que, los autores sugieren que en zonas endémicas es posible detectar un porcentaje elevado de personas afectadas positivas a *Leishmania* sp. mediante el examen directo del frotis de la lesión.

El diagnóstico por cultivo resultó negativo en todos los perros evaluados, posiblemente por las condiciones poco asépticas en las que se tomaron la mayoría de las muestras (exposición al ambiente, al nivel del suelo, elevada humedad); además, el material dentro del tubo de cultivo permaneció a bajas temperaturas (5 - 7 °C) de 2 a 6 días, antes de ser incubadora, condición que puede afectar la supervivencia; esto concuerda con la experiencia de Nejjar *et al.* (2000), quienes sugieren que el resultado negativo de todos los cultivos pudo estar relacionada con la baja carga parasitaria, a la contaminación microbiológica en los medios de aislamiento, la contaminación durante la toma de muestra, el transporte de las muestras a temperaturas adecuadas, entre otras (Kawamura *et al* 2010).

Las técnicas parasitológicas realizadas en esta investigación son reconocidas por tener una alta especificidad (OIE, 2014); sin embargo, la sensibilidad suele ser baja, debido a múltiples factores como la localización geográfica, toma de muestra, tipo de muestra, fase de la enfermedad, especie y/o carga parasitaria (Saridomichelakis *et al.*, 2005; Moreira *et al.*, 2007; Manna *et al.*, 2009). Por lo que para detectar la infección verdadera en los falsos negativos, se usa simultáneamente una prueba “gold standard” como la amplificación del ADN mediante PCR. No obstante, esta prueba molecular parece no ser plausible en la leishmaniasis tegumentaria canina, debido a las limitadas áreas de tejido afectado donde se puede esperar resultados positivos; además, se han observado diferencias en el diagnóstico de tejidos del mismo perro (Reithinger *et al.*, 2000, 2002).

Esto sucede también al coleccionar sangre como material de diagnóstico, en donde se han notificado resultados negativos de todas las muestras (Calzada *et al.*, 2015). Por lo que, dependiendo del punto de vista del investigador, el uso de PCR es indispensable o no, frente a pruebas con mayores limitaciones como IFI (García *et al.*, 2006). Sin embargo, pese a los inconvenientes, las técnicas parasitológicas son indispensables y pueden ser suficientes para el diagnóstico de leishmaniasis en zonas endémicas debido su bajo costo y fácil realización (Bari y Rahman, 2006).

Los métodos serológicos son ampliamente usados para complementar el diagnóstico, no solo para mejorar la sensibilidad en la detección de casos sintomáticos, sino también para detectar la infección y la exposición (Saridomichelakis, 2009). Estas pruebas tienen menor valor cuando se usan en el diagnóstico de la leishmaniasis cutánea y mucocutánea (OIE, WHO), aunque otros estudios han demostrado que al usarse antígenos altamente específicos como el Fe-SODe en métodos como el ELISA, se obtienen resultados prometedores (López, 2013).

En este contexto, si bien la serología sería útil como una herramienta complementaria que detectaría a los falsos negativos y los casos asintomáticos, es probable que tenga una menor validez en estudios transversales debido a la alta tasa de recuperación de los caninos, como es reportado en Huánuco por Reithinger *et al.* (2003a); por otro lado, los resultados serológicos falsos negativos debido a la recuperación no siempre son considerados, tal es el caso de un estudio realizado en Panamá, en el que el modelo usado para el análisis de infección no incluyó una posible recuperación debido a que sugieren que la mortalidad es un proceso más importante (Calzada *et al.*, 2015). En la presente investigación no se realizaron metodologías complementarias, pero se conservaron las muestras tisulares y el suero de los animales para estudios posteriores.

A pesar de que el diagnóstico parasitológico fue realizado solo a los perros con lesiones, es posible detectar la presencia de *Leishmania* sp. en piel sana de animales. Esto ha sido reportado en animales de zonas notificadas de leishmaniasis humana causada por *Leishmania (Viannia) braziliensis*, donde se detectó el parásito en piel sana y otros órganos de perros que previamente fueron positivos a lesiones cutáneas en el diagnóstico molecular (Marquez, 2017).

Se encontró una asociación significativa ($p > 0.05$) entre la presencia de lesiones sugerentes de leishmaniasis canina y el reporte de leishmaniasis en su propietario. Mientras que la mayoría de los estudios evalúan la presencia de leishmaniasis canina como factor de riesgo de leishmaniasis humana, es posible que la transmisión pueda ser inversa o que la exposición sea similar tanto en humanos como en perros, por lo que incriminarlos como reservorios peridomésticos requiere de estudios epidemiológicos que incluyan a los reservorios silvestres (Baneth *et al.*, 2014; Roque, 2014).

Durante el estudio, los dueños reportaron que fueron advertidos sobre el riesgo de la transmisión por intermedio de los perros, por lo que algunos optaron por sacrificarlos y otros por tratar sus lesiones con métodos cauterizantes como soluciones quelantes, aceite quemado, ácido de batería, entre otros. Sin embargo, ninguno de estos métodos es conveniente debido a que los perros sacrificados son reemplazados por más jóvenes quienes tienen el mismo riesgo de contagio, mientras que los tratamientos aplicados se limitan a la cicatrización de la lesión, más no a la cura (Nunes *et al.*, 2008). La mejor forma de controlar y prevenir la leishmaniasis tegumentaria canina es el tratamiento y el uso de collarines con repelentes; y de esta manera, si el perro es un potencial reservorio que mantiene la enfermedad en el área peridoméstica, es posible reducir el riesgo de la enfermedad humana (Travi *et al.*, 2006). Pese a ello, estas medidas dependen de los planes nacionales de cada gobierno y de la difusión de la aprobación de estos métodos.

Se reportó una asociación marginal ($p = 0.051$) entre la presencia de lesiones sugerentes de leishmaniasis canina y el lugar que frecuentaban los caninos (bosque y no bosque), lo cual es compatible con la revisión sistemática y metaanálisis de Silva *et al.* (2013), quienes reportan que una tasa elevada de infección por *Leishmania infantum* está asociada al acceso de los caninos a las áreas verdes, y/o al no confinamiento en el hogar; lo cual indica que tales características otorgan una mayor exposición al vector.

En este estudio no se realizó un muestreo probabilístico, lo que implica un fuerte sesgo de selección, por tanto, la evaluación de los factores asociados no puede ser extrapolada. Por otro lado, la participación de los propietarios en el estudio es aleatoria, lo que le da una relativa representatividad a la muestra para considerar los resultados como característicos de la zona de estudio. Otra limitación, fue la dificultad en la toma de muestra que se realizó mayoritariamente en la intemperie, siendo intra o extra domiciliaria en zonas urbanas y rurales (Anexo 3), resultando todos los cultivos negativos. Sin embargo, la metodología fue lo suficientemente sustentable dado que fue aplicada en un estudio observacional descriptivo. Esta investigación demandó una considerable búsqueda de los caninos, ya que, al no tener una estimación de la población y distribución canina, su reclutamiento fue laborioso y tomó mucho tiempo a pesar de que se realizaron avisos radiales y difusiones en los establecimientos de salud. A esto, se le puede sumar que las horas en las que se realizó el muestreo fueron dentro de la jornada laboral de la mayoría de los propietarios, quienes debían de estar presentes para el consentimiento del estudio.

Finalmente, las variables evaluadas podrían simplificar la complejidad de la transmisión, factores de riesgo y ciclo de la enfermedad, por ello es necesario estudios de mayor escala que incluyan mejores criterios epidemiológicos que puedan aplicarse para el estudio de la leishmaniasis tegumentaria americana canina según cada contexto

VI. CONCLUSIONES

Durante el periodo 2015-2017 se determinó la presencia de *Leishmania (Viannia) spp.* en caninos domésticos de zonas endémicas de leishmaniasis humana de la provincia de La Convención, Cusco.

VII. RECOMENDACIONES

- Realizar estudios transversales (bajo costo y menor tiempo de aplicación) con cuestionarios validados que incluyan múltiples variables de exposición que afectan directamente a los animales y previamente reportadas por la literatura, y de exposición ambiental que los caninos comparten con sus propietarios (tipo de zona, distancia a áreas de vegetación, etc.)
- La vigilancia de los canes con lesiones sugerentes de leishmaniasis sería una estrategia de bajo costo y muy factible dado que es posible asignarles un rol de centinela debido a que las lesiones de los perros suelen ser más evidentes que las manifestada en humanos por estar plenamente expuestas. Además, tendría una doble función de vigilancia en zonas endémicas de bartonelosis, enfermedad transmitida por el mismo vector.
- Debido a la continua urbanización que consecuentemente dará lugar al establecimiento de la profesión veterinaria, se necesitará la aprobación de fármacos para la aplicación en la leishmaniasis tegumentaria canina, sin descartar

el probable ingreso de la leishmaniasis visceral de la cual se necesita estar preparado.

- Ante esta situación inevitable que requiere de una preparación a largo plazo, se recomienda reforzar los requisitos de importación de animales, y la educación sanitaria centrada en la tenencia responsable de animales quienes cumplen con un papel en la epidemiología de muchas de las enfermedades endémicas.
- Estas recomendaciones se dirigen principalmente a las entidades de salud, que, por evidencia suficiente del impacto de las enfermedades emergentes, se requiere del reforzamiento interdisciplinario como la inclusión de los profesionales veterinarios en la salud pública con enfoque en enfermedades tropicales desatendidas y zoonóticas.

VIII. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

- Abranches, P., Silva-Pereira, M. C. D., Conceicao-Silva, F. M., Santos-Gomes, G. M., y Janz, J. G. (1991). Canine Leishmaniasis: Pathological and Ecological Factors Influencing Transmission of Infection. *The Journal of Parasitology*, 77(4), 557. doi:10.2307/3283159
- Acero, V. P., Ángel, P. B., Fonseca, E. B., Ferrer, L., y Roura, X. (2015). Canine Leishmaniosis: tools for diagnosis in veterinary practice in Colombia
Leishmaniosis canina: herramientas para el diagnóstico en la consulta veterinaria en Colombia. *Mvz*, 20(3), 4822–4842.
- Aguilar, E. (2014). Caracterización Molecular De Los Casos de endemia de leishmaniosis de La Micro Red de Kiteni – La Convención – Cusco 2010-2011 (Tesis de Maestría). Universidad Católica de Santa María, Arequipa.

- Ahuja, A. A., Bumb, R. A., Mehta, R. D., Prasad, N., Tanwar, R. K., & Satoskar, A. R. (2012). Successful treatment of canine cutaneous leishmaniasis using radio-frequency induced heat (RFH) therapy. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, *87*(2), 261-3. doi: 10.4269/ajtmh.2012.11-0756
- Akhoundi, M., Kuhls, K., Cannet, A., Votýpka, J., Marty, P., Delaunay, P., & Sereno, D. (2016). A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of *Leishmania* Parasites and Sandflies. *PLoS neglected tropical diseases*, *10*(3), e0004349. doi:10.1371/journal.pntd.0004349
- Albuquerque, G. R., ... Silva, F. L. (2016). Diagnosis and epidemiology of canine leishmaniasis in southeastern Bahia, Brazil. *Genetics and Molecular Research*, *15*(3), 1–10. <https://doi.org/10.4238/gmr.15038684>
- Aleman, C. (1969). Finestructure of cultured *Leishmania brasiliensis*. *Experimental Parasitology*, *24*(2), 259–264. DOI:10.1016/0014-4894(69)90163-5
- Alemayehu, B., y Alemayehu, M. (2017). Leishmaniasis: A Review on Parasite, Vector and Reservoir Host. *Health Science Journal*, *11*(4), 1–6. <https://doi.org/10.21767/1791-809X.1000519>
- Alves, A. S., Mouta-Confort, E., Figueiredo, F. B., Oliveira, R. V. C., Schubach, A. O., y Madeira, M. F. (2012). Evaluation of serological cross-reactivity between canine visceral leishmaniasis and natural infection by *Trypanosoma caninum*. *Research in Veterinary Science*, *93*(3), 1329–1333. doi:10.1016/j.rvsc.2012.07.006
- Anjili, C. O., Mbatia, P. A., Mwangi, R. W., Githure, J. I., Olobo, J. O., Robert, L. L., & Koech, D. K. (1995). The chemotactic effect of *Phlebotomus duboscqi* (Diptera:

- Psychodidae) salivary gland lysates to murine monocytes. *Acta Tropica*, 60(2), 97–100. doi:10.1016/0001-706x(95)00112-r
- Antoine, J. C., Prina, E., Jouanne, C., y Bongrand, P. (1990). Parasitophorous vacuoles of *Leishmania amazonensis*-infected macrophages maintain an acidic pH. *Infection and Immunity*, 58(3), 779–787
- Antoine, J. C., Prina, E., Lang, T., y Courret, N. (1998). The biogenesis and properties of the parasitophorous vacuoles that harbour *Leishmania* in murine macrophages. *Trends in Microbiology*, 6(10), 392–401. [https://doi.org/10.1016/S0966-842X\(98\)01324-9](https://doi.org/10.1016/S0966-842X(98)01324-9)
- Amela, C., Mendez, I., Torcal, J. M., Medina, G., Pachón, I., Cañavate, C., y Alvar, J. (1995). Epidemiology of canine leishmaniasis in the Madrid region, Spain. *European Journal of Epidemiology*, 11(2), 157–161. doi:10.1007/bf01719481
- Amusatégui, I., Sainz, A., Aguirre, E., y Tesouro, M. A. (2004). Seroprevalence of *Leishmania infantum* in Northwestern Spain, an Area Traditionally Considered Free of Leishmaniasis. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1026(1), 154–157. doi:10.1196/annals.1307.022
- Arango-Duque, G. y Descoteaux, A. (2015). *Leishmania* survival in the macrophage: where the ends justify the means. *Current Opinion in Microbiology*, 26:32-40. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2015.04.007>
- Baneth, G., Koutinas, A. F., Solano-Gallego, L., Bourdeau, P., y Ferrer, L. (2008). Canine leishmaniosis – new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. *Trends in Parasitology*, 24(7), 324–330. doi:10.1016/j.pt.2008.04.001

- Baneth, G., Koutinas, A. F., Solano-Gallego, L., Bourdeau, P., y Ferrer, L. (2008). Canine leishmaniosis – new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. *Trends in Parasitology*, 24(7), 324–330. doi:10.1016/j.pt.2008.04.001
- Barbosa-Santos, E.G.O., Marzochi, M.C.A., Conceição, N.F., Brito, C.M.M., Barroso, J.A., y Pacheco, R.S. (1998). N-methylglucamine antimonate (Sbv+): intralesional canine tegumentary leishmaniasis therapy. *Parasite*, 5(2), 175-180
- Bari A, Rahman S. (2006). Correlation of clinical, histopathological, and microbiological findings in 60 cases of cutaneous leishmaniasis. *Indian Journal of Dermatology Venereology and Leprology*, 72(1):28-32.
- Bates, P. A. (1994). Complete developmental cycle of *Leishmania mexicana* in axenic culture. *Parasitology*, 108(01), 1. doi:10.1017/s0031182000078458
- Bates, P. A. (2007). Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. *International Journal for Parasitology*, 37(10), 1097–1106. doi:10.1016/j.ijpara.2007.04.003
- Belo, V. S., Struchiner, C. J., Werneck, G. L., Barbosa, D. S., de Oliveira, R. B., Neto, R. G. T., y da Silva, E. S. (2013). A systematic review and meta-analysis of the factors associated with *Leishmania infantum* infection in dogs in Brazil. *Veterinary Parasitology*, 195(1-2), 1–13. doi:10.1016/j.vetpar.2013.03.010
- Brandão-Filho, S. P., Brito, M. E., Carvalho, F. G., Ishikaw, E. A., Cupolillo, E., Floeter-Winter, L., y Shaw, J. J. (2003). Wild and synanthropic hosts of *Leishmania (Viannia) braziliensis* in the endemic cutaneous leishmaniasis locality of Amaraji, Pernambuco State, Brazil. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 97(3), 291–296. doi:10.1016/s0035-9203(03)90146-5

- Calzada, J. E., Saldaña, A., González, K., Rigg, C., Pineda, V., Santamaría, A. M., Rodríguez, I., Gottdenker, N. L., Laurenti, M. D., ... Chaves, L. F. (2015). Cutaneous Leishmaniasis in dogs: is high seroprevalence indicative of a reservoir role?. *Parasitology*, *142*(9), 1202-14.
- Cardenas, R., Sandoval, C. M., Rodriguez-Morales, A. J., Bendezu, H., Gonzalez, A., Briceno, A., ... Scorza, J. V. (2006). Epidemiology of American tegumentary leishmaniasis in domestic dogs in an endemic zone of western Venezuela. *Bulletin de La Societe de Pathologie Exotique*, *99*(5), 355–358.
- Cardoso, L., Rodrigues, M., Santos, H., Schoone, G. J., Carreta, P., Varejão, E., ... Schallig, H. D. F. H. (2004). Sero-epidemiological study of canine *Leishmania* spp. infection in the municipality of Alijó (Alto Douro, Portugal). *Veterinary Parasitology*, *121*(1-2), 21–32. doi:10.1016/j.vetpar.2004.02.008
- Carvalho, F. S., Wenceslau, A. A., Albuquerque, G. R., Munhoz, A. D., E., Gross, E., Carneiro, P.L.S., Oliveira, H.C., J.M. Rocha... *Leishmania (Viannia) braziliensis* in dogs in Brazil: epidemiology, co-infection, and clinical aspects. *Genetics and Molecular Research* *14* (4): 12062-12073 (2015)
- Castro, R., Scott, K., Jordan, T., Evans, B., Craig, J., Peters, E. L., y Swier, K. (2006). The ultrastructure of the parasitophorous vacuole formed by *Leishmania major*. *Journal of Parasitology*, *92*(6). <https://doi.org/10.1645/GE-841R.1>
- Chang, K. P., y Dwyer, D. M. (1978). *Leishmania donovani*. Hamster macrophage interactions in vitro: cell entry, intracellular survival, and multiplication of amastigotes. *The Journal of experimental medicine*, *147*(2), 515-30.

Center for Disease Control and Prevention (2017). Leishmaniasis. Laboratory Identification of Parasites of Public Health Concern. Recuperado de <https://www.cdc.gov/dpdx/leishmaniasis/index.html>

Center for Disease Control and Prevention (2018). Epidemiology y Risk Factors. Parasites - Leishmaniasis. Recuperado de: <https://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/epi.html>

Centro Nacional de Epidemiología, Prevención y Control de Enfermedades (2018a). Casos de Leishmaniasis hasta la SE 36 - 2018. Recuperado de <http://www.dge.gob.pe/portal/docs/vigilancia/sala/2018/SE36/leishmaniosis.pdf>

Centro Nacional de Epidemiología, Prevención y Control de Enfermedades. (2018b). Sala de Situación Perú SE 09, 2018. Recuperado de: <http://www.dge.gob.pe/portal/docs/tools/teleconferencia/2018/SE102018/01.pdf>

Centro Nacional de Epidemiología, Prevención y Control de Enfermedades. Casos acumulados de Leishmaniasis, Hasta la SE 53, 2012-2019. Recuperado de: http://www.dge.gob.pe/salasisituacional/sala/index/1_TablaCasosSE/82

Cerino, D. A., Veloso, J., Perles, T. F., Zanzarini, P. D., Lonardoní, M. V. C., y Silveira, T. G. V. (2010). American cutaneous leishmaniasis in dogs from an endemic urban area in Cianorte municipality, Paraná State, Brazil. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*, 16(2), 241-252. <https://dx.doi.org/10.1590/S1678-91992010000200007>

Cortes, S., Vaz, Y., Neves, R., Maia, C., Cardoso, L., y Campino, L. (2012). Risk factors for canine leishmaniasis in an endemic Mediterranean region. *Veterinary Parasitology*, 189(2-4), 189–196. doi:10.1016/j.vetpar.2012.04.028

- Coura-Vital, W., Reis, A. B., Reis, L. E. S., Braga, S. L., Roatt, B. M., Aguiar-Soares, R. D. de O., ... Carneiro, M. (2013). Canine visceral leishmaniasis: Incidence and risk factors for infection in a cohort study in Brazil. *Veterinary Parasitology*, 197(3-4), 411–417. doi:10.1016/j.vetpar.2013.07.031
- Courret, N., Fréhel, C., Gouhier, N., Pouchelet, M., Prina, E., Roux, P., y Antoine, J.-C. (2002). Biogenesis of *Leishmania*-harbouring parasitophorous vacuoles following phagocytosis of the metacyclic promastigote or amastigote stages of the parasites. *Journal of Cell Science*, 115(Pt 11), 2303–2316.
- Cupolillo, E., Medina-Acosta, E., Noyes, H., Momen, H., & Grimaldi, G. (2000). A revised classification for *Leishmania* and *Endotrypanum*. *Parasitology Today*, 16(4), 142–144. [https://doi.org/10.1016/S0169-4758\(99\)01609-9](https://doi.org/10.1016/S0169-4758(99)01609-9)
- Cuvillier, A. , Miranda, J. C., Ambit, A. , Barral, A. and Merlin, G. (2003), Abortive infection of *Lutzomyia longipalpis* insect vectors by aflagellated LdARL-3A-Q70L overexpressing *Leishmania amazonensis* parasites. *Cellular Microbiology*, 5: 717-728. doi:10.1046/j.1462-5822.2003.00316.x
- da Silva, S. M., Amorim, I. F., Ribeiro, R. R., Azevedo, E. G., Demicheli, C., Melo, M. N., Tafuri, W. L., Gontijo, N. F., Michalick, M. S., ... Frézard, F. (2012). Efficacy of combined therapy with liposome-encapsulated meglumine antimoniate and allopurinol in treatment of canine visceral leishmaniasis. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 56(6), 2858-67. doi: 10.1128/AAC.00208-12
- DaMata, J. P., Mendes, B. P., Maciel-Lima, K., Menezes, C. A. S., Dutra, W. O., Sousa, L. P., y Horta, M. F. (2015). Distinct Macrophage Fates after in vitro Infection with Different Species of *Leishmania*: Induction of Apoptosis by *Leishmania*

- (*Leishmania*) *amazonensis*, but Not by *Leishmania* (*Viannia*) *guyanensis*. *PLOS ONE*, 10(10), e0141196. doi:10.1371/journal.pone.0141196
- Dantas-Torres, F., de Brito, M. E. F., y Brandão-Filho, S. P. (2006). Seroepidemiological survey on canine leishmaniasis among dogs from an urban area of Brazil. *Veterinary Parasitology*, 140(1-2), 54–60. doi:10.1016/j.vetpar.2006.03.008
- Dantas-Torres, F. (2007). The role of dogs as reservoirs of *Leishmania* parasites, with emphasis on *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum* and *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis*. *Veterinary Parasitology*, 149(3–4), 139–146. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2007.07.007>
- Dantas-Torres F. (2009). Canine leishmaniosis in South America. *Parasites & Vectors*, 2 Suppl 1(Suppl 1), S1. doi:10.1186/1756-3305-2-S1-S1
- Dantas-Torres, F. (2011). Ticks as vectors of *Leishmania* parasites. *Trends in Parasitology*, 27(4), 155–159. doi:10.1016/j.pt.2010.12.006
- Dantas-Torres, F., Solano-Gallego, L., Baneth, G., Ribeiro, V. M., de Paiva-Cavalcanti, M., y Otranto, D. (2012). Canine leishmaniosis in the Old and New Worlds: unveiled similarities and differences. *Trends in Parasitology*, 28(12), 531–538. doi:10.1016/j.pt.2012.08.007
- de Almeida, M. C., Vilhena, V., Barral, A, y Barral-Netto, M. (2003). Leishmanial infection: analysis of its first steps. A review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 98(7), 861-870. <https://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762003000700001>
- de Menezes, J. P., Saraiva, E. M., y da Rocha-Azevedo, B. (2016). The site of the bite: *Leishmania* interaction with macrophages, neutrophils and the extracellular

matrix in the dermis. *Parasites & vectors*, 9, 264. doi:10.1186/s13071-016-1540-3

Dostálová, A., y Volf, P. (2012). *Leishmania* development in sand flies: parasite-vector interactions overview. *Parasites & vectors*, 5, 276. doi:10.1186/1756-3305-5-276

Eid, D., Guzman-Rivero, M., Rojas, E., Goicolea, I., Hurtig, A. K., Illanes, D., y San Sebastian, M. (2018). Risk factors for cutaneous leishmaniasis in the rainforest of Bolivia: a cross-sectional study. *Tropical medicine and health*, 46, 9. doi:10.1186/s41182-018-0089-6

Fang, F. C. (2004). Antimicrobial reactive oxygen and nitrogen species: concepts and controversies. *Nature Reviews Microbiology*, 2, 820. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1004>

Figueira, C. P., Carvalhal, D. G., Almeida, R. A., Hermida, M. d., Touchard, D., Robert, P., Pierres, A., Bongrand, P., ... dos-Santos, W. L. (2015). *Leishmania* infection modulates beta-1 integrin activation and alters the kinetics of monocyte spreading over fibronectin. *Scientific reports*, 5, 12862. doi:10.1038/srep12862

Forestier, C. L., MacHu, C., Loussert, C., Pescher, P., y Späth, G. F. (2011). Imaging host cell-*Leishmania* interaction dynamics implicates parasite motility, lysosome recruitment, and host cell wounding in the infection process. *Cell Host and Microbe*, 9(4), 319–330. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2011.03.011>

Fraga, J., Montalvo, A. M., De Doncker, S., Dujardin, J. C., y Van der Auwera, G. (2010). Phylogeny of *Leishmania* species based on the heat-shock protein 70 gene.

Infection, Genetics and Evolution, 10(2), 238–245.

<https://doi.org/10.1016/j.meegid.2009.11.007>

Francino, O., Altet, L., Sánchez-Robert, E., Rodríguez, A., Solano-Gallego, L., Alberola, J., ... Roura, X. (2006). Advantages of real-time PCR assay for diagnosis and monitoring of canine leishmaniosis. *Veterinary Parasitology*, 137(3-4), 214–221. doi:10.1016/j.vetpar.2006.01.011

Franco, L. H., Beverley, S. M., & Zamboni, D. S. (2012). Innate immune activation and subversion of Mammalian functions by *Leishmania* lipophosphoglycan. *Journal of parasitology research*, 2012, 165126. doi: 10.1155/2012/165126

Gabriel, C., McMaster, W. R., Girard, D., y Descoteaux, A. (2010). *Leishmania donovani* Promastigotes Evade the Antimicrobial Activity of Neutrophil Extracellular Traps. *The Journal of Immunology*, 185(7), 4319 LP-4327. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1000893>

Gardener, P. J., Shchory, L., y Chance, M. L. (1977). Species differentiation in the genus *Leishmania* by morphometric studies with the electron microscope. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 71(2), 147–155. <https://doi.org/10.1080/00034983.1977.11687173>

Gil, J. F., Nasser, J. R., Cajal, S. P., Juarez, M., Acosta, N., Cimino, R. O., ... Krolewiecki, A. J. (2010). Urban transmission of American cutaneous leishmaniasis in Argentina: spatial analysis study. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 82(3), 433–440. doi:10.4269/ajtmh.2010.09-0113

- Glennie, N. D., Volk, S. W., y Scott, P. (2017). Skin-resident CD4+ T cells protect against *Leishmania major* by recruiting and activating inflammatory monocytes. *PLoS pathogens*, 13(4), e1006349. doi:10.1371/journal.ppat.1006349
- Gluezn, E., Höög, J. L., Smith, A. E., Dawe, H. R., Shaw, M. K., y Gull, K. (2010). Beyond 9+0: noncanonical axoneme structures characterize sensory cilia from protists to humans. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 24(9), 3117-21. doi: 10.1096/fj.09-151381
- Gomes, C. M., Paula, N. A., Morais, O. O., Soares, K. A., Roselino, A. M., & Sampaio, R. N. (2014). Complementary exams in the diagnosis of American tegumentary leishmaniasis. *Anais brasileiros de dermatologia*, 89(5), 701–709. doi:10.1590/abd1806-4841.20142389
- Goncalves, R., Zhang, X., Cohen, H., Debrabant, A., y Mosser, D. M. (2011). Platelet activation attracts a subpopulation of effector monocytes to sites of *Leishmania major* infection. *The Journal of experimental medicine*, 208(6), 1253-65. doi: 10.1084/jem.20101751
- González, U., Pinart, M., Rengifo-Pardo, M., Macaya, A., Alvar, J., Tweed, J. A. (2009). Interventions for American cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis (Review). *The Cochrane Collaboration*.
- Gull, K. (2009). The parasite point of view: insights and questions on the cell biology of *Trypanosoma* and *Leishmania* parasite–phagocyte interactions. En: Russell, D. y Gordon, S.(eds). *Phagocyte–pathogen interactions*, (pp. 453–462). Washington, D. C., USA. *American Society for Microbiology*. DOI: 10.1128/9781555816650

- Hayes, P., Varga, V., Olego-Fernandez, S., Sunter, J., Ginger, M. L., y Gull, K. (2014). Modulation of a cytoskeletal calpain-like protein induces major transitions in trypanosome morphology. *The Journal of Cell Biology*, 206(3), 377 LP-384. <https://doi.org/10.1083/jcb.201312067>
- Hurrell, B. P., Regli, I. B., y Tacchini-Cottier, F. (2016). Different *Leishmania* species drive distinct neutrophil functions. *Trends in Parasitology*, 32(5), 392–401. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2016.02.003>
- Hurrell, B. P., Schuster, S., Grün, E., Coutaz, M., Williams, R. A., Held, W., Malissen, B., Malissen, M., Yousefi, S., Simon, H. U., Müller, A. J., ... Tacchini-Cottier, F. (2015). Rapid Sequestration of *Leishmania mexicana* by Neutrophils Contributes to the Development of Chronic Lesion. *PLoS pathogens*, 11(5), e1004929. doi:10.1371/journal.ppat.1004929
- Iles, K. E., y Forman, H. J. (2002). Macrophage Signaling and Respiratory Burst. *Immunologic Research*, 26(1–3), 095-106. <https://doi.org/10.1385/IR:26:1-3:095>
- Jirmanus, L., Glesby, M. J., Guimarães, L. H., Lago, E., Rosa, M. E., Machado, P. R., y Carvalho, E. M. (2012). Epidemiological and clinical changes in American tegumentary leishmaniasis in an area of *Leishmania (Viannia) braziliensis* transmission over a 20-year period. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 86(3), 426-33. doi: 10.4269/ajtmh.2012.11-0378
- Kawamura, Y., Yoshikawa I., y Katakura K. (2010). Imported Leishmaniasis in Dogs, US Military Bases, Japan [Carta al editor]. DOI: 10.3201/eid1612.100389
- Lainson, R. y Shaw, J. (1987). Evolution, Classification and Geographical Distribution: The Leishmanioses. En: Peters, W. y Killick-Kendrick, R. (eds). The

Leishmaniasis in Biology and Medicine (Vol. 1): Biology and Epidemiology (pp. 1-120). London, England. *Academic Press Inc.*

Lacomble, S., Vaughan, S., Gadelha, C., Morphew, M. K., Shaw, M. K., McIntosh, J. R., y Gull, K. (2009). Three-dimensional cellular architecture of the flagellar pocket and associated cytoskeleton in trypanosomes revealed by electron microscope tomography. *Journal of cell science*, 122(Pt 8), 1081-90. doi: 10.1242/jcs.045740

Longoni, S. S., Marín, C., Sauri-Arceo, C. H., López-Céspedes, A., Rodríguez-Vivas, R. I., Villegas, N., ... Sánchez-Moreno, M. (2011). An Iron-Superoxide Dismutase Antigen-Based Serological Screening of Dogs Indicates Their Potential Role in the Transmission of Cutaneous Leishmaniasis and Trypanosomiasis in Yucatan, Mexico. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 11(7), 815–821. doi:10.1089/vbz.2010.0125

López-Céspedes, A., Longoni, S. S., Sauri-Arceo, C. H., Sánchez-Moreno, M., Rodríguez-Vivas, R. I., Escobedo-Ortegón, F. J., ... Marín, C. (2012). *Leishmania* spp. Epidemiology of Canine Leishmaniasis in the Yucatan Peninsula. *The Scientific World Journal*, 2012, 1–10. doi:10.1100/2012/945871

Madeira, M., Uchôa, C. M., Leal, C., Silva, R. M., Duarte, R., Magalhães, C. M., y Serra, C. M. (2003). *Leishmania (Viannia) braziliensis* em cães naturalmente infectados. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 36(5), 551-555. <https://dx.doi.org/10.1590/S0037-86822003000500002>

Mahshid, M., Baharak, A., Iraj, S., Sina, K., Javad, K., y Mehdi, B. (2013). Seroprevalence of canine visceral leishmaniasis in southeast of Iran. *Journal of parasitic diseases: official organ of the Indian Society for Parasitology*, 38(2), 218-22. doi: 10.1007/s12639-012-0226-9

- Maia, C., Altet, L., Serrano, L., Cristóvão, J. M., Tabar, M. D., Francino, O., ... Roura, X. (2016). Molecular detection of *Leishmania infantum*, *filariae* and *Wolbachia* spp. in dogs from southern Portugal. *Parasites & Vectors*, 9(1). doi:10.1186/s13071-016-1452-2
- Manna, L., Reale, S., Vitale, F. and Gravino, A.E. (2009). Evidence for a relationship between *Leishmania* load and clinical manifestations. *Research in Veterinary Science*, 87, 76-78.
- Manna, L., Corso, R., Galiero, G., Cerrone, A., Muzj, P., & Gravino, A. E. (2015). Long-term follow-up of dogs with leishmaniosis treated with meglumine antimoniate plus allopurinol versus miltefosine plus allopurinol. *Parasites & vectors*, 8, 289. doi:10.1186/s13071-015-0896-0
- Marquez, E. S., de Castro, E.A., Nabut, L. B., da Costa-Ribeiro M. C.V., Dela Coletta Troiano Araújo L., Poubel, S. B., Gonçalves, A. L., Cruz, M. F. R., Dos Santos Trad A. P. M. E., Dias, R. A. F, Navarro, I. T., Thomaz-Soccol, V. (2017). Cutaneous leishmaniosis in naturally infected dogs in Paraná, Brazil, and the epidemiological implications of *Leishmania (Viannia) braziliensis* detection in internal organs and intact skin. *Veterinary Parasitology*, 243(30), 219-225. doi: 10.1016/j.vetpar.2017.07.003.
- Mauricio, I. L. (2018). *Leishmania* Taxonomy. En: Bruschi, F., y Gradoni, L. (eds.). *The leishmaniases: Old neglected tropical diseases* (pp. 15-30). Cham, Switzerland. Springer International Publishing AG. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-72386-0>

- McCall, L. y Matlashewski, G. (2010), Localization and induction of the A2 virulence factor in *Leishmania*: evidence that A2 is a stress response protein. *Molecular Microbiology*, 77: 518-530. doi:10.1111/j.1365-2958.2010.07229.x
- Medina R G., Chávez V, A., Minaya, G., Barbosa-Santos, E. G. O., y Espinoza Z, G. (2002). Infección Por *Leishmania* sp. En Caninos Del Distrito de Pampas Grande, Ancash. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú* 13(2): 44–50.
- Merma, I., y Julca, A. (2012). Caracterización y evaluación de la sustentabilidad de fincas en alto Urubamba, Cusco, Perú. *Ecología Aplicada*, 11(1), 1-11.
- Miró, G., Montoya, A., Mateo, M., Alonso, A., García, S., García, A., ... Molina, R. (2007). A leishmaniosis surveillance system among stray dogs in the region of Madrid: ten years of serodiagnosis (1996–2006). *Parasitology Research*, 101(2), 253–257. doi:10.1007/s00436-007-0497-8
- Moreira, M.A., Luvizotto, M.C., Garcia, J.F., Corbett, C.E. y Laurenti, M. D. (2007). Comparison of parasitological, immunological and molecular methods for the diagnosis of leishmaniasis in dogs with different clinical signs. *Vet Parasitol*, 145, 245-252.
- Moreno, M., Ferro, C., Rosales-Chilama, M., Rubiano, L., Delgado, M., Cossio, A., Gómez, M. A., Ocampo, C., ... Saravia, N. G. (2015). First report of *Warileya rotundipennis* (Psychodidae: Phlebotominae) naturally infected with *Leishmania* (*Viannia*) in a focus of cutaneous leishmaniasis in Colombia. *Acta tropica*, 148, 191-6. doi: 10.1016/j.actatropica.2015.04.017
- Murray, H. W., Berman, J. D., Davies, C. R., y Saravia, N. G. (2005). Advances in leishmaniasis. *The Lancet*, 366(9496), 1561–1577. <https://doi.org/10.1016/S0140>

- Nejjar, R., Lemrani, M., Boucedda, L., Amarouch, H. y Benslimane, A. (2000). Variation in antibody titres against *Leishmania infantum* in naturally infected dogs in northern Morocco. *Revue de médecine vétérinaire*, 151(8):841-846.
- Nunes, C. M., Lima, V. M., Paula, H. B., Perri, S. H., Andrade, A. M., Dias, F. E., Burattini, M. N. (2008) Dog culling and replacement in an area endemic for visceral leishmaniasis in Brazil. *Veterinary Parasitology*, 153, 19–23. doi: 10.1016/j.vetpar.2008.01.005.
- Oliva, G., DVM, X. R., Crotti, A., Maroli, M., Castagnaro, M., Gradoni, L., ... Zini, E. (2010). Guidelines for treatment of leishmaniasis in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 236(11), 1192–1198. doi:10.2460/javma.236.11.1192
- Ogbadoyi, E. O., Robinson, D. R., & Gull, K. (2003). A high-order trans-membrane structural linkage is responsible for mitochondrial genome positioning and segregation by flagellar basal bodies in trypanosomes. *Molecular biology of the cell*, 14(5), 1769-79. doi: 10.1091/mbc.E02-08-0525
- Oliveira, T. N. A., Guedes, P. E. B., Souza, G. B., Carvalho, F. S., Alberto Carlos, R. S., Albuquerque, G. R., ... Silva, F. L. (2016). Diagnosis and epidemiology of canine leishmaniasis in southeastern Bahia, Brazil. *Genetics and Molecular Research*, 15(3). doi:10.4238/gmr.15038684
- Organización Mundial de la Salud. (2010). Control of the Leishmaniases. *WHO Technical Report Series*, 949.
- Organización Mundial de la Salud. (2018). Leishmaniasis. Recuperado de <http://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>

Organización Mundial de la Salud. Leishmaniasis. Perú. Leishmaniasis Country Profiles.

Recuperado de:

http://www.who.int/leishmaniasis/burden/Leishmaniasis_Peru/en/

Organización Mundial de la Salud. Leishmaniasis. Perú. Epidemiological situation.

Recuperado de: <https://www.who.int/leishmaniasis/burden/en/>

Organización Mundial de Sanidad Animal. (2014). Leishmaniasis. *Manual Terrestre*.

Recuperado de:

http://www.oie.int/fileadmin/Home/fr/Health_standards/tahm/2.01.11_LEISHMANIOSIS.pdf

Oryan, A., y Akbari, M. (2016). Worldwide risk factors in leishmaniasis. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 9(10), 925–932.

<https://doi.org/10.1016/j.apjtm.2016.06.021>

Palatnik-de-Sousa, C. B., & Day, M. J. (2011). One Health: The global challenge of epidemic and endemic leishmaniasis. *Parasites & Vectors*, 4(1), 197.

<https://doi.org/10.1186/1756-3305-4-197>

Passos, S. R., Rodrigues, T. de A., Madureira, A. P., Giunchetti, R. C., & Zanini, M. S.

(2014). Clinical treatment of cutaneous leishmaniasis in dogs with furazolidone and domperidone. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 44(5), 463–465.

doi:10.1016/j.ijantimicag.2014.07.011

Petropolis, D. B., Rodrigues, J. C., Viana, N. B., Pontes, B., Pereira, C. F., y Silva-Filho,

F. C. (2014). *Leishmania amazonensis* promastigotes in 3D Collagen I culture: an in vitro physiological environment for the study of extracellular matrix and host cell interactions. *PeerJ*, 2, e317. doi:10.7717/peerj.317

- Real, F., Mortara, R. A., Rabinovitch, M. (2010). Fusion between *Leishmania amazonensis* and *Leishmania major* Parasitophorous Vacuoles: Live Imaging of Coinfected Macrophages. *PLoS neglected tropical diseases* 4(12): e905. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000905>
- Reithinger, R., Lambson, B. E., Barker, D. C., & Davies, C. R. (2000). Use of PCR to detect *Leishmania (Viannia)* spp. in dog blood and bone marrow. *Journal of clinical microbiology*, 38(2), 748-51.
- Reithinger, R., Lambson, B. E., Barker, D. C., Counihan, H., Espinoza, J. C., Gonzalez, J. S., & Davies, C. R. (2002). *Leishmania (Viannia)* spp. dissemination and tissue tropism in naturally infected dogs (*Canis familiaris*). *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 96(1), 76–78. doi:10.1016/s0035-9203(02)90249-x
- Reithinger, R., Espinoza, J. C., y Davies, C. R. (2003a). The transmission dynamics of canine American cutaneous Leishmaniasis in Huánuco, Peru. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 69(5), 473–480.
- Reithinger, R., Espinoza, J.C., Llanos-Cuentas, A., y Davies, C.R. (2003b). Domestic Dog Ownership: A Risk Factor for Human Infection with *Leishmania (Viannia)* Species. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 97(2): 141–45
- Reithinger, R., & Dujardin, J. C. (2007). Molecular diagnosis of leishmaniasis: current status and future applications. *Journal of clinical microbiology*, 45(1), 21-5. doi: 10.1128/JCM.02029-06
- MERCOSUR. Resolución GMC Mercosur N° 17/15 (2015)

- Rittig, M. G., Schröppel, K., Seack, K. H., Sander, U., N'Diaye, E. N., Maridonneau-Parini, I., Solbach, W., ... Bogdan, C. (1998). Coiling phagocytosis of trypanosomatids and fungal cells. *Infection and immunity*, 66(9), 4331-9.
- Rivas, A. K., Alcover, M., Martínez-Orellana, P., Montserrat-Sangrà, S., Nachum-Biala, Y., Bardagí, M., ... Solano-Gallego, L. (2018). Clinical and diagnostic aspects of feline cutaneous leishmaniosis in Venezuela. *Parasites & vectors*, 11(1), 141. doi:10.1186/s13071-018-2747-2
- Rojas-Jaimes, J. E., Correa-Núñez, G. H., Rojas-Palomino, N., Cáceres-Rey, O. (2017). Detección de *Leishmania (V) guyanensis* en ejemplares de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) recolectados en pecaríes de collar (*Pecari tajacu*). *Biomédica*, 37(Supl.2):208-214. <https://doi.org/10.7705/issn.0120-4157>
- Rondon, F. C. M., Bevilaqua, C. M. L., Franke, C. R., Barros, R. S., Oliveira, F. R., Alcântara, A. C., y Diniz, A. T. (2008). Cross-sectional serological study of canine *Leishmania* infection in Fortaleza, Ceará state, Brazil. *Veterinary Parasitology*, 155(1-2), 24–31. doi:10.1016/j.vetpar.2008.04.014
- Romano, A., Carneiro, M., Doria, N. A., Roma, E. H., Ribeiro-Gomes, F. L., Inbar, E., Lee, S. H., Mendez, J., Paun, A., Sacks, D. L., ... Peters, N. C. (2017). Divergent roles for Ly6C+CCR2+CX3CR1+ inflammatory monocytes during primary or secondary infection of the skin with the intra-phagosomal pathogen *Leishmania major*. *PLoS pathogens*, 13(6), e1006479. doi:10.1371/journal.ppat.1006479
- Romero, G. A., y Boelaert, M. (2010). Control of visceral leishmaniasis in latin america- a systematic review. *PLoS neglected tropical diseases*, 4(1), e584. doi:10.1371/journal.pntd.0000584

- Roque, A. L., y Jansen, A. M. (2014). Wild and synanthropic reservoirs of *Leishmania* species in the Americas. *International journal for parasitology. Parasites and wildlife*, 3(3), 251-62. doi:10.1016/j.ijppaw.2014.08.004
- Rosário, I. N., Andrade, A. J., Ligeiro, R., Ishak, R., y Silva, I. M. (2017). Evaluating the Adaptation Process of Sandfly Fauna to Anthropized Environments in a Leishmaniasis Transmission Area in the Brazilian Amazon. *Journal of medical entomology*, 54(2), 450–459. doi:10.1093/jme/tjw182
- Rossi, M., y Fasel, N. (2017). How to master the host immune system? *Leishmania* parasites have the solutions!. *International immunology*, 30(3), 103-111. doi:10.1093/intimm/dxx075
- Rotureau, B. (2006). Ecology of the *Leishmania* species in the Guianan ecoregion complex. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 74(1), 81-96 <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2006.74.81>
- Rougeron, V., De Meeûs, T., y Bañuls, A.-L. (2015). A primer for *Leishmania* population genetic studies. *Trends in Parasitology*, 31(2), 52–59. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2014.12.001>
- Rudzinska, M. A., D'Alesandro, P. A., y Trager, W. (1964). The Fine Structure of *Leishmania donovani* and the Role of the Kinetoplast in the *Leishmania*-Leptomonad Transformation. *Journal of Protozoology*, 11(2), 166-191. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.1964.tb01739.x>
- Saada, E. A., Kabututu, Z. P., Lopez, M., Shimogawa, M. M., Langousis, G., Oberholzer, M., ... Hill, K. L. (2014). Insect Stage-Specific Receptor Adenylate Cyclases Are Localized to Distinct Subdomains of the *Trypanosoma brucei* Flagellar

Membrane. *Eukaryotic Cell*, 13(8), 1064 LP-1076.
<https://doi.org/10.1128/EC.00019-14>

Sabaté, D., Llinás, J., Homedes, J., Sust, M., y Ferrer, L. (2014). A single-centre, open-label, controlled, randomized clinical trial to assess the preventive efficacy of a domperidone-based treatment programme against clinical canine leishmaniasis in a high prevalence area. *Preventive Veterinary Medicine*, 115(1-2), 56–63.
 doi:10.1016/j.prevetmed.2014.03.010

Sabzevari, S., Razmi, G., Naghibi, A., y Khoshnegah, J. (2016). A study of visceral leishmaniasis in owned dogs with dermal lesions in Mashhad area, Khorasan Razavi province. *Veterinary research forum : an international quarterly journal*, 7(1), 55-61.

Sánchez-Saldaña, L., Sáenz-Anduaga, E., Pancorbo-Mendoza, J., Zegarra-Del-Carpio, R., Garcés-Velasco, N., Regis-Roggero, A. (2004). *Dermatología Peruana*, 4(2), 82-98.

Santaella, J., Ocampo, C. B., Saravia, N. G., Méndez, F., Góngora, R., Gomez, M. A., Munstermann, L. E., ... Quinnell, R. J. (2011). *Leishmania (Viannia)* infection in the domestic dog in Chaparral, Colombia. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 84(5), 674-80. doi: 10.4269/ajtmh.2011.10-0159

Saridomichelakis, M.N., Mylonakis, M.E., Leontides, L.S., Koutinas, A.F., Billinis, C. and Kontos, V. I. (2005). Evaluation of lymph node and bone marrow cytology in the diagnosis of canine leishmaniasis (*Leishmania infantum*) in symptomatic and asymptomatic dogs. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 73, 82-86.

- Saridomichelakis, M. N. (2009). Advances in the pathogenesis of canine leishmaniosis: epidemiologic and diagnostic implications. *Veterinary Dermatology*, 20(5-6), 471–489. doi:10.1111/j.1365-3164.2009.00823.x
- Sasani, F., Javanbakht, J., Samani, R., y Shirani, D. (2014). Canine cutaneous leishmaniasis. *Journal of parasitic diseases: official organ of the Indian Society for Parasitology*, 40(1), 57-60. doi: 10.1007/s12639-014-0444-4
- Schönian, G., Mauricio, I. y Cupolillo, E. (2010) Is it time to revise the nomenclature of *Leishmania*? *Trends in Parasitology*, 26(10), 466-469. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2010.06.013>
- Steverding D. (2017). The history of leishmaniasis. *Parasites & vectors*, 10(1), 82. doi:10.1186/s13071-017-2028-5
- Schubach, T. M. P., Figueiredo, F. B., Pereira, S. A., Madeira, M. F., Santos, I. B., Andrade, M. V., ... Schubach, A. (2004). American cutaneous leishmaniasis in two cats from Rio de Janeiro, Brazil: First report of natural infection with *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 98(3), 165–167. [https://doi.org/10.1016/S0035-9203\(03\)00040-3](https://doi.org/10.1016/S0035-9203(03)00040-3)
- Seraphim, T., Ramos, C. H. I y Borges, J. C. (2014). The Interaction Networks of Hsp70 and Hsp90 in the Plasmodium and *Leishmania* Parasites. En: Houry, W. A. (ed). *The Molecular Chaperones Interaction Networks in Protein Folding and Degradation* (pp. 445-481). New York, USA. Springer Science+Business Media. DOI: 10.1007/978-1-4939-1130-1_17

- Serafim, T. D., Coutinho-Abreu, I. V., Oliveira, F., Meneses, C., Kamhawi, S., y Valenzuela, J. G. (2018). Sequential blood meals promote *Leishmania* replication and reverse metacyclogenesis augmenting vector infectivity. *Nature microbiology*, 3(5), 548-555.
- Silva, D. A., Madeira, M. F., Teixeira, A. C., de Souza, C. M., y Figueiredo, F. B. (2011). Laboratory tests performed on *Leishmania* seroreactive dogs euthanized by the leishmaniasis control program. *Veterinary Parasitology*, 179(1-3), 257–261. doi:10.1016/j.vetpar.2011.01.048
- Sunter, J. D., y Gull, K. (2016). The Flagellum Attachment Zone: The Cellular Ruler' of Trypanosome Morphology. *Trends in Parasitology*, 32(4), 309–324. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2015.12.010>
- Sunter, J., y Gull, K. (2017). Shape, form, function and *Leishmania* pathogenicity: from textbook descriptions to biological understanding. *Open biology*, 7(9), 170165. doi: 10.1098/rsob.170165
- Torres-Guerrero, E., Quintanilla-Cedillo, M. R., Ruiz-Esmenjaud, J., & Arenas, R. (2017). Leishmaniasis: a review. *F1000Research*, 6, 750. doi:10.12688/f1000research.11120.1
- Trevisan, D. A. C., Lonardoní, M. V., Campana, M. V., y Galhardo, D. I. (2015). Diagnostic methods to cutaneous leishmaniasis detection in domestic dogs and cats. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, 90(6), 868-872. <https://dx.doi.org/10.1590/abd1806-4841.20153716>
- Varga, V., Moreira-Leite, F., Portman, N., y Gull, K. (2017). Protein diversity in discrete structures at the distal tip of the trypanosome flagellum. *Proceedings of the*

National Academy of Sciences, 114(32).
<https://doi.org/10.1073/pnas.1703553114>

Vega, I., Gómez-Puerta, L., Valderrama W., Grisolle, M., De Los Santos, M., Pérez, E., Baldeviano, G., Lescano, A. Leishmaniosis visceral canina importada. Recuperado de: <http://cmvl.pe/2016/08/11/leishmaniosis-visceral-canina-por-leishmania-l-infantum-importada-al-peru-papel-de-la-regulacion-del-desplazamiento-de-animales/>

Velasquez, L, Membrive, N., Membrive, U., Rodrigues, G., Reis, N., Lonardoní, M. V., ... Silveira, T. (2006). PCR in the investigation of canine American tegumentary leishmaniasis in northwestern Paraná State, Brazil. *Cadernos de Saúde Pública*, 22(3), 571-578. <https://dx.doi.org/10.1590/S0102-311X2006000300012>

Vélez, I. D., Carrillo, L. M., López, L., Rodríguez, E., y Robledo, S. M. (2012). An epidemic outbreak of canine cutaneous leishmaniasis in Colombia caused by *Leishmania braziliensis* and *Leishmania panamensis*. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 86(5), 807-11. doi: 10.4269/ajtmh.2012.11-0408

Vinet, A. F., Fukuda, M., Turco, S. J., y Descoteaux, A. (2009). The *Leishmania donovani* lipophosphoglycan excludes the vesicular proton-ATPase from phagosomes by impairing the recruitment of synaptotagmin V. *PLoS pathogens*, 5(10), e1000628. doi: 10.1371/journal.ppat.1000628

Viol, M. A., Guerrero, F. D., de Oliveira, B. C. M., de Aquino, M. C. C., Loiola, S. H., de Melo, G. D., ... Bresciani, K. D. S. (2016). Identification of *Leishmania* spp. promastigotes in the intestines, ovaries, and salivary glands of *Rhipicephalus sanguineus* actively infesting dogs. *Parasitology Research*, 115(9), 3479–3484. doi:10.1007/s00436-016-5111-5

- Weigle, K. A., Santrich, C., Martinez, F., Valderrama, L., y, N. G. (1993). Epidemiology of Cutaneous Leishmaniasis in Colombia: Environmental and Behavioral Risk Factors for Infection, Clinical Manifestations, and Pathogenicity. *Journal of Infectious Diseases*, 168(3), 709–714. doi:10.1093/infdis/168.3.709
- Wheeler, R. J., Gluenz, E., y Gull, K. (2015). Basal body multipotency and axonemal remodelling are two pathways to a 9+0 flagellum. *Nature Communications*, 6, 8964. Retrieved from <https://doi.org/10.1038/ncomms9964>
- Wheeler, R. J., Sunter, J. D., y Gull, K. (2016). Flagellar pocket restructuring through the *Leishmania* life cycle involves a discrete flagellum attachment zone. *Journal of Cell Science*, 129(4), 854–867. <https://doi.org/10.1242/jcs.183152>
- Xin, L., Vargas-Inchaustegui, D. A., Raimer, S. S., Kelly, B. C., Hu, J., Zhu, L., Sun, J., ... Soong, L. (2010). Type I IFN receptor regulates neutrophil functions and innate immunity to *Leishmania* parasites. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 184(12), 7047-56. doi: 10.4049/jimmunol.0903273
- Zhang, W. W., Mendez, S., Ghosh, A., Myler, P., Ivens, A., Clos, J., ... Matlashewski, G. (2003). Comparison of the A2 gene locus in *Leishmania donovani* and *Leishmania major* and its control over cutaneous infection. *Journal of Biological Chemistry*, 278(37), 35508–35515. <https://doi.org/10.1074/jbc.M305030200>
- Živičnjak, T., Martinković, F., Marinculić, A., Mrljak, V., Kučer, N., Matijatko, V., ... Barić-Rafaj, R. (2005). A seroepidemiologic survey of canine visceral leishmaniasis among apparently healthy dogs in Croatia. *Veterinary Parasitology*, 131(1-2), 35–43. doi:10.1016/j.vetpar.2005.04.036

IX. ANEXOS

Anexo 1.

Ficha de consentimiento informado

	IUETBC- UNSAAC	FICHA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO	Anexo 1
---	-------------------	--	---------

Investigación de leishmaniosis en animales

Este formulario de **Consentimiento informado**, se dirige a propietarios o responsables de animales con lesiones sugerentes de leishmaniosis o uta canina, se les invita a participar de la investigación que lleva como título "Determinación de presencia de leishmaniosis o uta, en perros en la provincia de La Convención, departamento del Cusco", por parte de la investigadora Alejandra Esther Troncos Villanueva, Bachiller en Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Científica del Sur.

¿Qué se realizará? Se le pondrá anestesia (estará relajado, adormitado y no sentirá dolor) mediante una inyección en el lomo del animal y una inyección en la (s) heridas (s) cutáneas, se limpiará la lesión y si tiene costra será retirada. También se le sacará sangre.

Duración. El procedimiento tendrá una duración de 20 a 30 minutos.

Muestras. Se le tomarán muestras de las heridas y sangre del brazo.

Riesgos. Los riesgos son mínimos, en caso de no poder manejar a los animales, se pedirá ayuda al dueño para la toma de muestra.

Resultados. Por medio de la Posta de Salud o Centro de Salud se enviarán los resultados en cuanto terminen los análisis.

Confidencialidad
La información que usted proporcione será confidencial, su animal será identificado con un código de estudio que será conocido solo por usted y el personal del estudio.

En caso de tener alguna pregunta:
La Bióloga Elsa Gladys Aguilar Ancori, Docente de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco y Directora del Instituto Universitario de Enfermedades Tropicales y Biomedicina de Cusco de la UNSAAC, ubicado en el Pabellón "C"- 223 segundo piso UNSAAC, Avenida La Cultura 733; cuyos números telefónicos son 984939873, 987102047 y correo electrónico egaa3@hotmail.com

Como propietario o responsable, acepto voluntariamente que mi animal pueda participar en esta investigación y he sido informado, por cual suscribo mi nombre y mi firma.

..... Nombre y apellido del propietario DNI y firma del propietario
..... Firma del investigador encargado de la toma de muestra Nombre de la persona que obtuvo el consentimiento
..... Nombre del Testigo (en letra imprenta) Firma del testigo

Fecha: / /

Anexo 2.

Ficha clínica de leishmaniosis tegumentaria canina

	IUETBC-UNSAAC	FICHA CLÍNICA DE LEISHMANIOSIS TEGUMENTARIA CANINA	Anexo 2
---	----------------------	---	---------

1. Datos del animal

Datos de identificación	
Nombre	
Edad	
Raza	
Sexo	
Propietario	
Ubicación	

2. Examen físico

Datos	
Peso	
C.C	
F.C	
F.R	
T.LL.C	
Temp.	
Mucosas	
Observ.	

Código

Vive en:	
()	Chacra
()	Casa
()	Calle
()	Otros: _____

Valoración ASA	
I	II

*En base sólo al examen físico. No se pueden determinar valores superiores.

3. Diagnóstico clínico para leishmaniosis

Tipo de lesión

a) Cutánea ()

Ubicación:

Oreja ()

Abdomen ()

Escroto ()

Otro: _____

Característica:

Activa () Cicatriz ()

b) Mucosa ()

Ubicación:

Nariz ()

Boca ()

Paladar ()

Úvula ()

Otro: _____

Característica:

Activa () Cicatriz ()

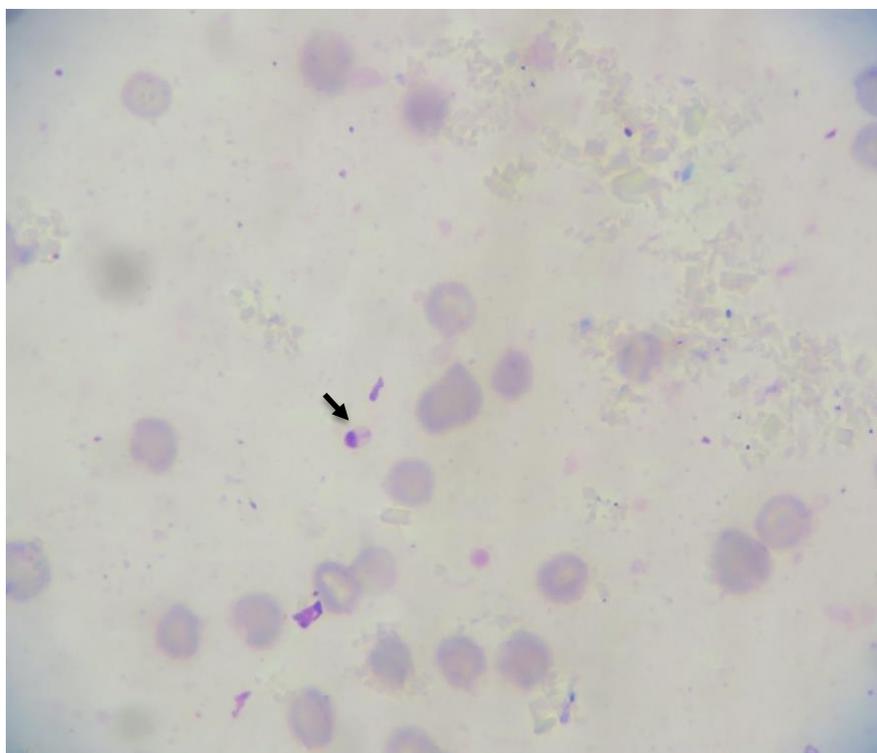
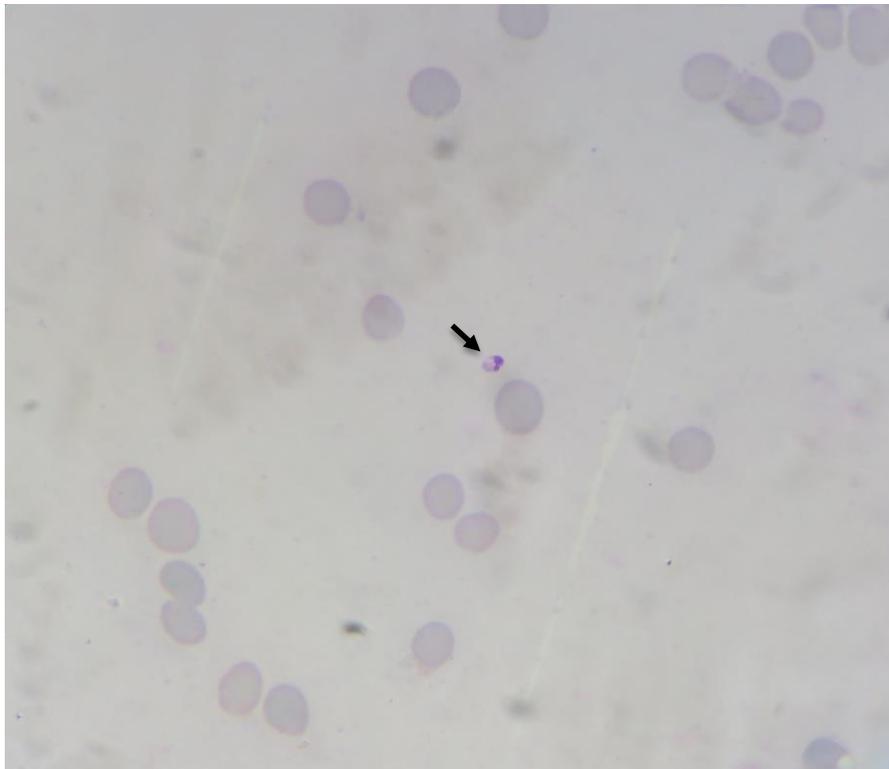
Anexo 3.

Toma de muestra posterior a la sedación



Anexo 4.

Amastigotes observados mediante la técnica de frotis con tinción Giemsa



Nota: en ambas imágenes se puede observar la presencia de *Leishmania sp.* de forma libre (flecha)

Anexo 5.

Perro con lesiones sugerentes de leishmaniasis en nariz y escroto



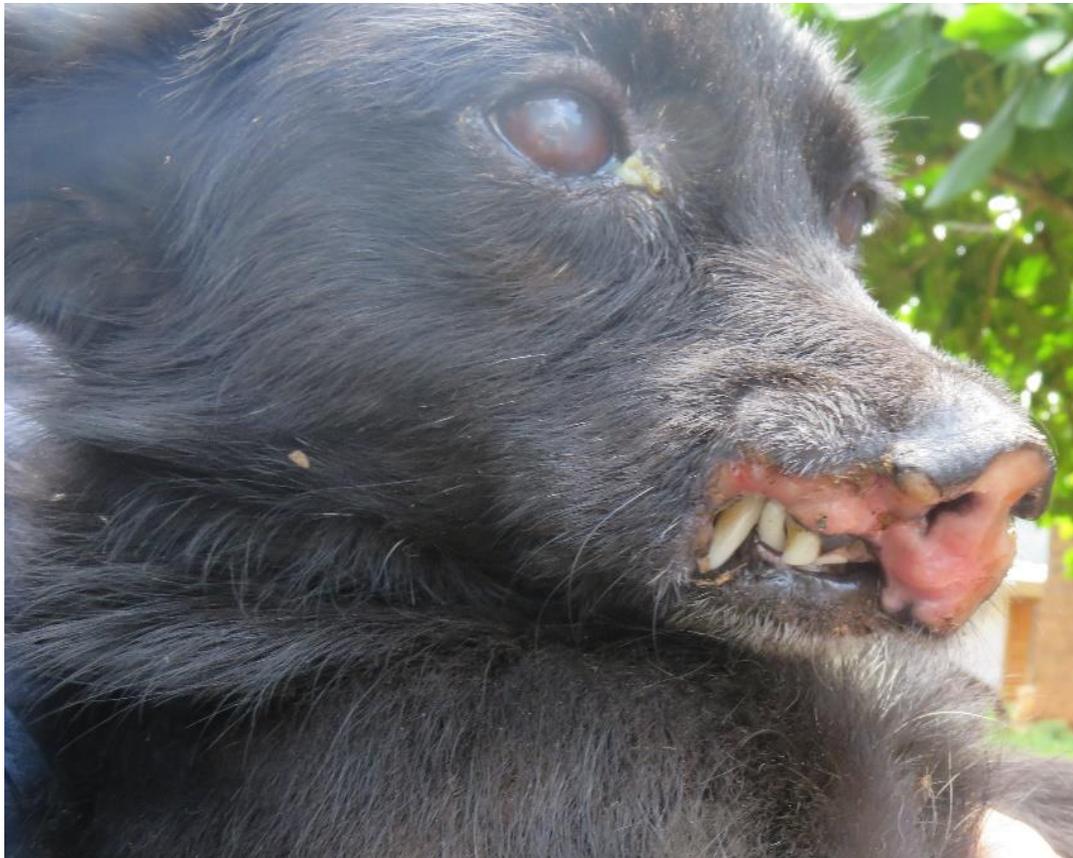
Nota: Lesión activa en nariz



Nota: Dos lesiones activas en escroto

Anexo 6.

Perro con lesión avanzada cicatrizada



Nota: Las lesiones crónicas mucosas no tratadas pueden llevar a la desfiguración

Anexo 7.

Descripción de las lesiones sugerentes de leishmaniasis en perros y diagnóstico por frotis.

Animal	Localización de lesión	N° de lesiones	Tipo de lesión	Tiempo* (meses)	Frotis
1	Nariz y labio	1	C	72	-
2	Nariz	1	A	12	+
3	Escroto	1	A	1	+
4	Pata izquierda	2	C	12	NR
5	Lomo	10	A/C	4	-
6	Nariz	3	A/C	0.7-24	+
7	Nariz	1	A	1	+
8	Nariz	3	A/C	1-12	+
9	Nariz	3	A/C	D	+
10	Caña nasal	1	C	D	-
11	Nariz	3	A	0.7	+
12	Nariz y escroto	2/2	A, C/A,C	1	-/-
13	Nariz	1	A	2	+
14	Nariz	3	A	1	+
15	Nariz	1	A	1	-

Nota: * Tiempo a la toma de muestra; A: Activa; C: Cicatriz; NR: No realizado; D: Desconocido