

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE NICARAGUA  
UNAN – LEÓN**

**Escuela de Ciencias Agrarias y Medicina Veterinaria**



**Tema:** Leishmaniasis canina en un área endémica a leishmaniasis humana en Nicaragua.

**Tesis para optar al título de Médico Veterinario**

**Autores:**

Francis Daniela Tórrez Romero, MDV.

Cristopher José Navarrete García, MDV.

Tutor: Lic. Byron Flores Somarriba. MSc, PhD.

Asesores: Lic. Brenda Mora. MSc, Lic. William Jirón. MSc, PhD

León, Nicaragua 2016.



## **AGRADECIMIENTOS**

De manera especial queremos agradecer a Dios por guiarnos durante todo el proceso, dando gracias por traernos hasta la meta y hacernos culminar esta etapa de nuestras vidas.

Gracias a nuestras madres que nos apoyaron durante toda la carrera, brindándonos la oportunidad de ser unos excelentes profesionales.

Queremos agradecer a nuestro tutor por habernos brindado su apoyo y confianza durante nuestra investigación de grado, por sus consejos y sus correcciones que nos ayudaron a realizar un buen trabajo. Y que al final de tantos trabajos juntos, ha demostrado ser un increíble amigo.

De manera muy cariñosa queremos agradecer a todo el equipo del laboratorio por brindarnos su ayuda y disponibilidad durante todo este tiempo, que sin su apoyo hubiese sido más arduo llegar a la meta.

---



## ÍNDICE

Tabla de contenido

<b>1- RESUMEN</b> .....	1
<b>2- INTRODUCCIÓN</b> .....	2
<b>3- ANTECEDENTES</b> .....	4
<b>4- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA:</b> .....	6
<b>5- OBJETIVOS</b> .....	7
5.1- Objetivo general: .....	7
5.2- Objetivos específicos: .....	7
<b>6- MARCO TEÓRICO</b> .....	8
6.1- Taxonomía .....	8
6.2- Características y estadios del parásito.....	8
6.3- Epidemiología .....	9
6.4- Transmisión.....	10
6.5- Ciclos biológicos .....	10
<b>6.5.1- Del parásito</b> .....	10
<b>6.5.2- Del vector</b> .....	11
6.6- Patogenia.....	12
6.7- Clínica .....	14
6.8- Cuadro lesional .....	15
6.9- Diagnóstico .....	16
<b>6.9.1- Diagnóstico microscópico</b> .....	17
<b>6.9.2- Diagnóstico Molecular</b> .....	17
<b>6.9.2.1- Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR)</b> ... 17	
<b>6.9.3- Diagnóstico inmunológico</b> .....	18
<b>6.9.3.1- Enzimoimmunoensayo (ELISA)</b> .....	18
<b>6.9.4- Histopatología</b> .....	19

---



<b>6.9.5- Cultivos celulares</b> .....	19
6.10- Actitud terapéutica .....	21
<b>7- DISEÑO METODOLÓGICO</b> .....	22
7.1- Tipo de estudio: Descriptivo de corte transversal.....	22
7.2- Área de estudio .....	22
7.3- Población .....	22
7.4- Número de muestras.....	22
7.5- Tipo de muestreo .....	23
7.6- Criterios de inclusión:.....	23
7.7- Criterios de exclusión:.....	23
7.8- Consideraciones éticas .....	23
7.9- Método de recolección de datos .....	23
<b>7.9.1- Fuentes primarias</b> .....	23
7.10- Toma de muestras .....	24
<b>7.10.1- Extracción de sangre venosa y periférica:</b> .....	24
<b>7.10.1.1- Sangre Venosa</b> .....	24
<b>7.10.1.2- Sangre periférica</b> .....	25
<b>7.11- Técnicas laboratoriales</b> .....	25
<b>7.11.1- Análisis parasitológico mediante microscopia óptica</b> .....	25
<b>7.11.2.1- Extracción de ADN</b> .....	26
<b>8- RESULTADOS</b> .....	27
<b>9- DISCUSIÓN</b> .....	31
<b>10- CONCLUSIONES</b> .....	34
<b>11- RECOMENDACIONES</b> .....	35
<b>12- REFERENCIAS:</b> .....	36
<b>13- ANEXOS</b> .....	41

---



## 1- RESUMEN

La leishmaniasis es una enfermedad parasitaria sistémica, causada por un protozoo del género *Leishmania* spp, afecta al ser humano y caninos, el espectro clínico varía desde infecciones asintomáticas a otras con elevada mortalidad, y es considerada una enfermedad zoonótica de interés en Nicaragua. El estudio pretende identificar la presencia de *Leishmania* spp. en caninos de un área endémica para leishmaniasis humana. El estudio es de tipo descriptivo transversal, tomando como área de investigación la comunidad de Rota, departamento de León, en el estudio la población se definió como los caninos encontrados en la zona, el cálculo de la muestra se hizo mediante plataforma informática Working in Epidemiology, con un nivel de confianza del 90%, un error aceptado del 10%, considerando una prevalencia del 17,3% según un estudio previo. La obtención de las diferentes variables asociadas al estudio se realizó mediante ficha de datos, respectivamente. Las muestras tomadas fueron sangre de tipo venosa y periférica, para realizar frotis citológicos, que se analizaron mediante microscopía óptica, para la identificación del agente causal. Se obtuvo un 40% de positividad (18/45) a la presencia del parásito dentro de células reticuloendoteliales, para los dos tipos de frotis sanguíneo, con una baja correlación entre las muestras (venosa y periférica) con valores de  $p > 0.05$ , en dicho estudio no se encontró asociaciones significativas en relación a casos humano-animal, ni en cuanto a edades o sintomatología clínica con la presencia del parásito en los caninos que resultaron positivos. Se logró demostrar una alta prevalencia de *Leishmania* spp., en caninos de Rota, una zona endémica de leishmaniasis humana.



## 2- INTRODUCCIÓN

La leishmaniasis a nivel mundial afecta a 88 países de áreas tropicales, 72 se encuentran en vías de desarrollo y 24 son países de América, es de carácter zoonótica por lo tanto se considera un riesgo para la salud pública, según la Organización Mundial de la Salud (OMS) (1).

Según consulta de expertos de la OMS sobre la leishmaniasis visceral en las Américas, esta enfermedad es endémica en América Latina, involucrando países como: Bolivia, Colombia, Costa Rica, El Salvador, Guatemala, Honduras, México, Nicaragua, Venezuela, presentando la mayoría de los casos en Brasil (2).

La leishmaniasis no es una enfermedad única, sino que comprende una variedad de síndromes debido por lo menos a 20 especies y subespecies de *Leishmania*. En el hombre, el espectro clínico varía desde infecciones asintomáticas a otras con elevada mortalidad, con tres formas clásicas descritas: visceral (LV), cutánea (LC) y mucocutánea (LMC). Los vectores de estas enfermedades pertenecen a los géneros *Phlebotomus* y son pequeñas moscas de la especie *Lutzomyia*. Los perros son también afectados, siendo estos el principal reservorio rural, peridoméstico y doméstico, por las especies *L. infantum* y *L. chagasi*, pero se han descrito también las infecciones caninas por *L. tropica*, *L. major* y *L. braziliensis* (3).

En Panamá la forma predominante de esta enfermedad es LC, se cree que para el año 2010 según la sección estadística de la dirección general de salud pública se registraron 3,221 casos que se distribuyen en 14 regiones (2).

En Nicaragua se reportan casos de leishmaniasis en el ser humano en diferentes partes del país y se considera como principal reservorio doméstico la especie *Canis lupus familiaris* (caninos). En donde el principal transmisor es un flebótomo, el cual se encarga de pasar el parásito del canino, al ser humano mediante la picadura (4).

En Nicaragua se reportaron casos de LC en el año 2011, 3164 casos; 2012, 1742 casos y año 2013, 2959 casos y para el primer semestre del año 2014 se registraron cifras de 941 casos. Debido a esto Nicaragua tiene una situación



preocupante por el incremento de casos de leishmaniasis cutánea en los humanos que se ha registrado en los últimos años (2).

En el caso de leishmaniasis canina es una enfermedad sistémica o visceral y esto significa que puede afectar a numerosos sistemas u órganos. La característica más importante de la leishmaniasis canina es su extraordinario polimorfismo clínico. En los caninos invade diferentes órganos provocando lesiones de diversa consideración, hasta producirse la muerte del animal. La sintomatología clínica es muy variada desde lesiones en la piel, en las articulaciones, lesiones oculares y cuando la enfermedad está ya bastante avanzada, daño a nivel renal (5).

Debido a que los signos clínicos de la leishmaniasis canina no son patognomónicos, una buena evaluación de la reseña, anamnesis y exploración física, son importantes para confirmar la relación directa entre la infección por *Leishmania* spp. y la clínica que muestra el canino. Todo esto es de vital importancia, ya que se describe esta enfermedad como una zoonosis y por tanto es un riesgo para la salud humana (5).

A pesar de los varios estudios realizados a nivel nacional, estos solo son dirigidos a casos humanos, las incidencias que se observan, manejos de los pacientes y tratamientos de elección. En cambio registros de estudios de leishmaniasis en caninos no se han desarrollado a fondo y por lo tanto no se conoce la situación actual epidemiológica que existe en el país, ni como esto puede llegar a ser perjudicial para la salud pública a nivel nacional por la zoonosis que representa.

Mediante este estudio se intenta conocer la dinámica de posibles casos de leishmaniasis en caninos del lugar de estudio, con el fin de obtener datos más concretos de animales que estén infectados o jueguen un papel como reservorios en estas zonas endémicas, de igual manera como esto influye perjudicialmente en la salud pública de Nicaragua.

Para lograr este objetivo se pretenden identificar la presencia de *Leishmania* spp. en caninos de un área endémica para leishmaniasis humana. De esta manera aportar información epidemiológica y contribuir a la salud pública en Nicaragua.



### 3- ANTECEDENTES

En Perú en el año 2000 un estudio realizado por Medina *et al*, a 87 caninos, encontró que el 3,6 % (3/83) resultó positivo en frotis de lesiones (tinción de Giemsa) e IFI y 8,4% (7/83) fueron positivos a intradermorreacción, concluyendo que la infección por *Leishmania* spp. está presente en 5,4 % de la población canina del lugar (6).

En Colombia un estudio realizado en 2002 por Fernández, *et al*, determinó que de 307 caninos analizados; el 1,4 % presentaron amastigotes en el aspirado de ganglio poplíteo y el 17,2 % fueron seropositivos mediante IFI (inmunofluorescencia indirecta), el 30,6 % de la población fueron hembras y el 69,4 % machos (7).

Un estudio realizado en Colombia en 2006 por Fernández *et al*, a 610 caninos de los cuales 67,2% eran machos y 32,8% hembras, detectó la presencia de IgG contra *Leishmania chagasi* en 118 canes mediante prueba ELISA, los signos clínicos compatibles con la enfermedad fueron; 24,3% onicogriposis, 10% linfadenitis, 5% lesiones cutáneas y 2,7% disminución del apetito (8).

Un estudio realizado en Colombia en 2009 por Romero *et al*, para comparar pruebas serológicas en el diagnóstico de leishmania en 72 caninos, determinó que la frecuencia de seropositividad anti-*Leishmania* fue 41,6% (30/72) por IFI, 47,2% (34/72) por ELISA, 40,27% (29/72) por el kit KalazarDetectTML-MRA y 22,2% (16/72) por Western-blot respectivamente. Concluyendo que existe una débil correlación entre las distintas pruebas (9).

Un estudio realizado en El Salvador en 2009 por Escobar y Rodríguez, a 79 caninos demostró que el 86.07% presentaba sintomatología compatible con la enfermedad, sin embargo los caninos resultaron negativos al aspirado de ganglio poplíteo; concluyendo que no existió relación entre la zona donde se tomó la muestra y la presencia de sintomatología clínica del animal (10).



En un estudio realizado en España en 2000, por Burriel *et al*, para detectar leishmaniasis canina en distintas muestras clínicas (aspirado de ganglio linfático, aspirado de médula ósea y sangre) mediante la técnica de PCR, determinó una menor sensibilidad para la muestra de sangre periférica y una sensibilidad mayor para aspirado de médula ósea y aspirado de ganglio linfático (11).

Un estudio realizado en Venezuela en 2015, por Reyes *et al*, estandarizó la técnica de PCR para detección de *Leishmania* spp. en 36 muestras de sangre de caninos, determinó que en la concentración para los cebadores de 0.2 mM la presencia de las bandas era íntegra para *L. amazonensis*, *L. infantum* y *L. chagasi*, mientras que en la concentración de 0.1 mM solo se observó *L. infantum* y *L. chagasi* (12).



#### 4- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA:

¿Cuál es la frecuencia de casos de caninos infectados con *Leishmania* spp. en un área endémica a leishmaniasis humana en Nicaragua?



## 5- OBJETIVOS

### 5.1- Objetivo general:

Identificar la presencia de *Leishmania* spp. en caninos de un área endémica para leishmaniasis humana y su importancia a la salud pública en Nicaragua.

### 5.2- Objetivos específicos:

- Identificar los caninos infectados con *Leishmania* spp. aplicando las técnicas de frotis de sangre periférica y sangre venosa.
- Asociar la presencia de *Leishmania* spp. con la sintomatología en caninos muestreados en una área endémica de Nicaragua.
- Determinar la concordancia entre frotis realizado de sangre periférica y el frotis de sangre venosa.



## 6- MARCO TEÓRICO

La leishmaniasis es una enfermedad parasitaria infecciosa crónica causada por un protozoo flagelado del género *Leishmania* spp. afecta fundamentalmente al hombre y a los caninos, engloba un amplio espectro de procesos patológicos que pueden ir desde cuadros cutáneos autoresolutivos a procesos viscerales de terminación fatal (4, 13).

### 6.1- Taxonomía

**Reino:** Protista

**Filo:** Euglenozoa

**Clase:** Kinetoplastea

**Orden:** Trypanosomatida

**Familia:** Trypanosomatidae

**Género:** *Leishmania* (14).

Es una zoonosis difundida ampliamente en el mundo. Cuenta con más de 20 especies diferentes y se conocen más de 90 especies de flebotóminos transmisores de *Leishmania* spp. (15).

### 6.2- Características y estadios del parásito

**Amastigote:** es la forma intracelular, tiene forma oval y mide de 2 a 4  $\mu\text{m}$  de diámetro, posee un núcleo en posición central y un orgánulo basófilo de forma y tamaño variable denominado cinetoplasto (13).

**Promastigote:** es un flagelado móvil, tiene un cuerpo elongado de aproximadamente 15  $\mu\text{m}$ ; su extremo anterior es cónico y el posterior redondeado. El núcleo es céntrico y el cinetoplasto cerca del extremo anterior próximo al flagelo. Los promastigotes metacíclicos son la forma infectante para el hospedador definitivo; aparecen al final del ciclo intravectorial, son más pequeños y activos con un flagelo más largo (13).



### 6.3- Epidemiología

La infección por *Leishmania* spp. constituye un problema de extraordinaria gravedad desde el punto de vista de la salud pública, ya que afecta a la población de 88 países de zonas intertropicales y templadas, de los cuales sólo en 40 es de declaración obligatoria, por lo que de los aproximadamente 2 millones de casos nuevos estimados por año, sólo 600 000 se declaran oficialmente. La prevalencia está en torno a los 12 millones de enfermos y la población en riesgo de más de 350 millones de personas (16).

De los casos nuevos, una cuarta parte corresponden a formas viscerales, en un 90% en la India, Nepal, Bangladesh, Brasil y Sudán. De las formas cutáneas, el 90% ocurren en Afganistán, Arabia Saudita, Irán, Siria, Brasil y Perú, y las mucocutáneas se concentran en un 90% en Bolivia, Brasil y Perú (16).

En Nicaragua los primeros casos reportados de leishmaniasis fueron en 1980, aproximadamente con 493 casos de leishmaniasis cutánea y mucocutánea, incrementándose esta cifra en los años siguientes (17).

El primer reporte de leishmaniasis visceral fue en 1988, en la isla Zapatera en el lago de Nicaragua, en 1992 se comenzaron a reportar casos de LV en la Costa Pacífico, siendo predominante la *Lutzomyia Longipalpis* como principal vector, Nicaragua comparte el mismo biotipo que Honduras donde se presentaron casos de LC, los caninos tienen un papel importante en esta enfermedad ya que sirven como reservorios por lo cual representa un problema importante en la salud pública de Nicaragua (17).

Las zonas endémicas son Jinotega, Nueva Segovia, Estelí, Zelaya Norte (50% de los casos); Matagalpa, Boaco, Zelaya Centro (30%), y Río San Juan, Zelaya Sur (20%). En Jinotega, una región montañosa norteña, se manifiesta el 80% de los casos mucocutáneos. En relación a la forma visceral se han registrado casos procedentes de los SILAIS León, Chinandega, Madriz, Estelí y Managua (17, 18).

De los estudios realizados en Nicaragua se identificaron que las especies presentes en el país son: *L. chagasi*, *L. panamensis* y *L. braziliensis* (17).



Los caninos son buenos reservorios de *L. infantum/L. chagasi*. En el viejo mundo se han registrado casos de parasitación en lobos (*canis lupus*) y en chacales (*canis aureus*), pero debido a que no están en contacto con humanos no se les considera de importancia como reservorio de la enfermedad, en cambio el perro juega un rol distinto ya que se encuentra en áreas urbanas y rurales pudiendo ser reservorio peridoméstico (10).

La leishmaniasis canina tiene una distribución bimodal, ya que afecta a perros con edades inferiores de 3 años y en otro plano a perros entre 8 y 10 años (5, 19).

#### **6.4- Transmisión**

La enfermedad es transmitida por la picadura del flebótomo hembra infectado, del género *Lutzomyia* vulgarmente llamado: chirizo o pápalo moyo el que pica al animal o persona infectándola. Los flebotómicos transmisores son pequeños, miden 1.5 - 2.5 mm y están cubiertos de pelos. Se cree que un 10% de las 600 especies conocidas está involucrado en la transmisión de la leishmaniasis humana. La hembra requiere de sangre para la maduración de los huevos, en tanto que los machos se alimentan de jugos de frutas (20).

En los focos de leishmaniasis antroponótica, los seres humanos son el único reservorio, y la transmisión de persona a persona se produce por la picadura de flebotomos. En los focos de leishmaniasis zoonótica, los caninos, el reservorio animal doméstico, constituyen la principal fuente de infección para los humanos (20).

En otras fuentes de infección aparte de los caninos, tenemos a diversos mamíferos salvajes como el ratón, rata de monte, zorros, monos y perezosos (21).

#### **6.5- Ciclos biológicos**

##### **6.5.1- Del parásito**

Todas las especies de *Leishmania* presentan un ciclo de vida similar y es importante conocer cada una de las etapas para poder entender y aplicar ciertas medidas de control. La *Leishmania* es heterogénea y completa su ciclo biológico usando dos huéspedes (1).



Para el mantenimiento del ciclo biológico depende de la capacidad de los promastigotes para colonizar el aparato digestivo del hospedador intermediario y de la capacidad de los amastigotes para establecer un parasitismo intracelular en el macrófago del hospedador vertebrado (13).

El insecto se infecta al ingerir macrófagos parasitados en los momentos en los que se alimenta con la sangre de un vertebrado; luego liberan los amastigotes en el intestino, en donde ocurren dos procesos, la diferenciación a promastigotes y la replicación, donde los promastigotes se multiplican activamente por división binaria longitudinal colonizando el resto del tracto digestivo. Algunos quedan libres desde el inicio en el lumen intestinal; otros se adhieren a la pared por hemidesmosomas; pero la localización del parásito en el intestino varía de acuerdo a cada especie de vector y de *Leishmania* (1, 13).

El final del ciclo, ocurre la maduración de los promastigotes, empieza la migración hacia las piezas bucales y la proboscis del insecto. Este ciclo ocurre en un tiempo promedio de 6-14 días (1, 13).

El huésped vertebrado es infectado por el vector mediante la picadura, en donde los promastigotes son inoculados, en promedios de 10 a 100 células parasitarias que penetran en la dermis, estos son fagocitados por los macrófagos y en un período de 3 a 4 horas en promedio, tiene lugar su transformación de promastigotes a amastigotes, luego permanecen en estado estacionario por 36 horas aproximadamente y, pasado este tiempo, empiezan a reproducirse. Estos comienzan un ciclo de multiplicación, en el que se produce un gran número de parásitos que van ocupando el citoplasma celular y origina la rotura del macrófago. Los amastigotes liberados son fagocitados por otros macrófagos, que se distribuyen, entre otras localizaciones, por la sangre periférica y piel, desde donde pueden ser ingeridos por el insecto vector (1, 13).

### **6.5.2- Del vector**

La *Lutzomyia* es un díptero, hematófago con metamorfosis completa, es más pequeña que otras moscas miden 2-4 mm y posee un solo par de alas; son ovaladas, en forma de V y densamente cubiertas por pelos, tienen antenas con



más de 6 segmentos y piezas bucales presentes en las fases adultas e inmaduras (4, 22).

Poseen una actividad crepuscular y nocturna, su ciclo biológico es terrestre, no sometidas a corrientes de aire, su actividad se ve afectada por cambios climáticos bruscos. Las hembras pican cuando la temperatura oscila entre 25-28 °C y la humedad se encuentra en 88-95 %, aunque esto varía según la especie y la adaptación del medio, su vuelo es corto aproximadamente de 1 km, es silencioso y avanzan en forma de saltos en zig-zag (10, 22).

Una vez alimentadas las hembras vuelven a su refugio para reposar y filtrar la sangre antes de buscar un lugar rico en nutrientes para realizar la ovoposición que sucede 4 a 5 días después; el período de vida en la naturaleza varía de 40 a 50 días. Después de unos 30 a 60 días, se desarrollan pasando por una larva de tres estadios y de la pupa en adultos. Su hábitat son las zonas forestales, aunque pueden adaptarse a ambientes modificados, incluyendo áreas peridomiciliares humanas (10, 22).

### **6.6- Patogenia**

Para el desarrollo de la enfermedad se aclara que se deben de considerar tanto las características del parásito y hospedador, en donde juega un papel muy importante las formas de evasión al sistema inmunitario por parte del agente causal sobre el hospedador; las condiciones que presenta el individuo infectado, como, inmunodepresión, mala nutrición, estrés u otros condicionantes que influyen en la receptividad de la enfermedad (13).

Como primer paso para el establecimiento de la infección y el desarrollo de la enfermedad, que consiste en la penetración del agente causal a las células fagocíticas y la resistencia que expresa para evitar la acción lítica dentro de células blancas. En la penetración del agente, se puede observar una interacción de la fracción C3 del complemento y moléculas de superficie del parásito, como la glucoproteína de superficie mayor (gp63) y lipofosfoglicano (LPG) y diversos receptores de membrana de los macrófagos. El agente dentro del huésped se vale de mecanismos intrínsecos que la capacitan para resistir la acción de las enzimas hidrolíticas lisosomales y de los radicales libres de oxígeno (RLO), resultantes del



estallido respiratorio del macrófago; acá entra en juego las gp63 y LPG capaces de degradar a la mayoría de enzimas hidrolíticas e inhiben parcialmente la producción de RLO, por poseer enzimas como la catalasa y superóxido dismutasa, que contrarresta su acción. Todo este conjunto de evasión por parte del parásito, evitan el buen funcionamiento de los mecanismos microbicidas que se generan al activarse los macrófagos dependientes de oxígeno y de óxido nítrico (NO), dando lugar a una mala respuesta inmunitaria (13, 23).

Luego del establecimiento del parásito, se produce la diseminación y localización del agente por el organismo, por vía hemática o linfática, siendo este un requisito para el desarrollo de las lesiones iniciales y comienzo de las manifestaciones clínicas. Dentro de las localizaciones más importantes dentro del hospedador está el bazo, los ganglios linfáticos (en especial los supra-escapulares y poplíteos), la médula ósea, el hígado, los riñones y la piel. Todo lo anterior solo explica el establecimiento del parásito y cómo influye en una disminución de la capacidad fagocítica, en la actividad como células presentadoras de antígenos y finalmente en la destrucción de la célula parasitada. Pero estas acciones no explican por sí solas el desarrollo de la enfermedad. Para explicar el resto de los signos presentes, se menciona un segundo elemento patogénico, responsable de la gran variedad de alteraciones producidas, que es debido a una respuesta parcialmente inmunomediada, resultado de una respuesta inmune ineficaz, en donde se altera la respuesta celular y humoral (13).

En la respuesta celular ocasiona un proceso reactivo tisular, generalizado, cuyo componente fundamental es una reacción inflamatoria de tipo proliferativo; caracterizado por un infiltrado celular de macrófagos, neutrófilos y células plasmáticas, en las que además, se producen procesos degenerativos y necróticos (13, 23).

En la humoral, propia de animales sensibles, se derivan mecanismos inmunopatogénicos, básicamente causados por autoanticuerpos y complejos inmunitarios; por la estimulación policlonal de células B, que conlleva a la producción exacerbada de inmunoglobulinas, tanto específicas como inespecíficas y autoanticuerpos. El componente inmunopatogénico más importante es la



formación y depósito de complejos inmunes circulantes (CIC), que alteran la capacidad fagocítica de monocitos y neutrófilos circulantes e intervienen en los mecanismos de agregación plaquetaria y estimulación la liberación de aminas vasoactivas (13, 23).

### **6.7- Clínica**

La presentación clínica de la leishmaniasis canina es muy compleja ya que los signos clínicos no son patognomónicos de la enfermedad, el canino puede presentar una serie de sintomatología variada haciendo difícil el diagnóstico si no se toman en cuenta la anamnesis, epidemiología y exámenes laboratoriales. Esta variabilidad depende del grado de infestación, estado inmunitario del animal, tiempo de evolución de la enfermedad, así como de los órganos afectados. Debido a que esta enfermedad es de carácter zoonótico y de impacto en salud pública, se toma frecuentemente como diagnóstico diferencial de otras enfermedades por su variada sintomatología (13).

En el hombre existen tres manifestaciones clínicas de la infección: cutánea, muco-cutánea y visceral (24).

- ❖ Cutánea clásica: Aquí aparecen lesiones cerradas como pápulas, nódulos o placas, pudiendo ser de forma verrugosa o ulcerada. La ulcera es redondeada, de bordes elevados, eritematosos, con centro granulomatoso limpio y base infiltrada. Generalmente son indoloras y de crecimiento lento; excepto cuando hay sobreinfecciones bacterianas tornándose dolorosas, de fondo sucio y purulento (24).
- ❖ Muco-cutánea: Esta forma ocurre por la diseminación linfohematógena del parásito pudiéndose presentar simultáneamente con las lesiones cutáneas. Afecta vías aéreas superiores, nariz, faringe, boca, laringe, tráquea. Inicialmente hay hiperemia nasal, nodulaciones, rinorrea y posterior ulceración. Las lesiones se acompañan de congestión, epistaxis, prurito nasal, rinorrea serohemática y salida de costras (24).
- ❖ Visceral: caracterizada por fiebre, esplenomegalia y/o hepatomegalia, poliadenopatías, anemia, leucopenia, trombocitopenia y debilidad progresiva.



Se puede presentar diarrea e infecciones respiratorias una vez instalado el cuadro clínico, si no es tratada puede ser mortal (24).

En los caninos se manifiestan la forma muco-cutánea y la forma visceral, así como la asociación de las dos formas. El canino puede mostrar una sintomatología general al inicio de la enfermedad como: anorexia, mucosas pálidas, decaimiento adelgazamiento que puede llegar hasta caquexia, hipertermia irregular y debilidad muscular (25).

La forma muco-cutánea se presenta con alopecia progresiva periocular, en orejas y miembros, dermatitis exfoliativa no prurítica, descamaciones con caída abundante del pelo, piel seca y áspera, las úlceras también son observables en áreas próximas a articulaciones o mucosas como zona de la nariz, siendo estas con algo de exudado seroso, onicogriphosis, hiperqueratosis plantar y nódulos múltiples o solitarios en algunas partes del tronco y cabeza. En el caso de la forma visceral se observan signos clínicos en donde el animal se encuentra deprimido, pérdida de peso marcada, anemia no regenerativa, epistaxis, enteritis granulomatosa, enteritis hemorrágica, vómitos, afecciones oculares como: conjuntivitis, queratoconjuntivitis, glaucoma etc. glomerulonefritis, hematuria, hepato y esplenomegalia que es el signo más representativo, junto a linfadenopatía generalizada y en algunos casos presencia de fiebre. La leishmaniasis puede llegar a afectar otros órganos como el corazón, aparato genital, huesos, articulaciones y sistema nervioso, aunque es menos frecuente (26).

### **6.8- Cuadro lesional**

Las lesiones más importantes se encuentran en riñones, el hígado, órganos linfoides y la piel. El cuadro lesional está constituido por una reacción inflamatoria crónica proliferativa con un infiltrado inflamatorio constituido por macrófagos, linfocitos y células plasmáticas dispuestas de forma difusa o formando microgranulomas poco organizados, junto con procesos degenerativos y necróticos (13).

En el riñón se produce una nefropatía crónica proliferativa afectando a los glomérulos, túbulos y tejido intersticial; en el sistema tubular aparece una



tubulonefrosis con degeneración de las células de la pared por tumefacción turbia, degeneración vacuolar y pérdida de microvellosidades. Las lesiones glomerulares consisten en una glomerulonefritis membranoproliferativa, caracterizada por el engrosamiento de la membrana basal glomerular por depósito de sustancia hialina y por la proliferación de células endoteliales y mesangiales. La nefritis intersticial difusa también es común destacándose el edema y abundante infiltrado celular. El hígado presenta una inflamación crónica proliferativa, con alteraciones vasculares, hiperemia de los vasos centrolobulillares y espacios porta, con infiltrado celular compuesto de linfocitos, células plasmáticas, histiocitos y ocasionalmente de células epitelioides y procesos degenerativos de los hepatocitos como alteraciones vacuolares del citoplasma, tumefacciones mitocondriales y fenómenos de esteatosis, acompañada en ocasiones de necrosis por coagulación. También puede observarse hiperplasia e hipertrofia de las células de Kupffer (13).

El bazo presenta una inflamación hiperplásica con depleción linfocitaria, también se observan fenómenos de hiperemia y microhemorragias así como acumulo de hemosiderina en células reticulares. Las lesiones ganglionares se manifiestan como linfadenitis hiperplásica. La lesión básica cutánea es la dermatitis crónica proliferativa que puede caracterizarse como dermatitis descamativa, pustular, ulcerativa o nodular, con infiltrado inflamatorio. Con menor frecuencia aparecen lesiones inmunomediadas oculares como blefaritis, conjuntivitis, uveítis etc. Así como lesiones vasculares y gastrointestinales (13).

### **6.9- Diagnóstico**

Los métodos disponibles para el diagnóstico de la leishmaniasis canina son variables, dando un amplio rango de detección a dicha enfermedad, dentro de estos podemos apreciar el examen clínico de los casos sospechosos, pauta que permite iniciar un protocolo para su confirmación con pruebas diagnósticas más específicas, como el diagnóstico parasitológico visual, el inmuno-diagnóstico y técnicas moleculares. A continuación se describen algunos métodos utilizados (3, 13, 27).



### **6.9.1- Diagnóstico microscópico**

En estas pruebas se intenta obtener la identificación visual del agente, condicionado por factores como toma de la muestra, fase de la enfermedad y carga parasitaria. Aquí se incluyen exámenes microscópicos como extendidos de sangre, raspados, biopsias o aspirados tomados de lesiones y teñidos con Giemsa (3, 28).

Los raspados son obtenidos de las lesiones visibles externamente si el animal los presenta, se debe de realizar una buena limpieza en estos casos, con el fin de eliminar el material costroso, tejidos necrotizados, pus y otros detritos de las lesiones y tomar del tejido vivo más recientemente comprometido (29).

Para los aspirados, estos son obtenidos de los ganglios linfáticos (poplíteo o pre-escapular) y aspirado de médula ósea (cara interna del fémur, cresta iliaca o unión costoesternal). El aspirado de médula ósea es más sensible que el aspirado de ganglio, pero, el método es más invasivo, y es necesario tener una alta experiencia en la obtención de la muestra para evitar ocasionar lesiones al canino; se eligen estos órganos por ser lugares en donde el parásito se aloja en abundancia durante el proceso de la enfermedad (28).

Para los extendidos sanguíneos, estos suelen ser obtenidos de sangre venosa o tomada de los capilares periféricos del canino, estos deben ser procesados a más tardar, antes de 1 semana luego de su toma, para ser coloreados con la tinción de Giemsa. Cada laboratorio debe ajustar la concentración del colorante, el pH y el tiempo de coloración para una visualización correcta de los elementos parasitarios. Pueden utilizarse también otras fórmulas de coloración del tipo Romanowsky, May-Grünwald, o Wrigth, pero la que es más utilizada por los laboratorios es la coloración original de Giemsa (28).

### **6.9.2- Diagnóstico Molecular**

#### **6.9.2.1- Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR)**

La reacción en cadena de la polimerasa, es una técnica que permite producir múltiples copias de ADN (Ácido desoxirribonucleico) específica, basándose en la actividad de la enzima ADN polimerasa que es capaz de fabricar una cadena de



ADN complementaria a otra ya existente. Sus únicos requerimientos son que existan nucleótidos, materia base para fabricar el ADN (adenina, timina, citosina y guanina), y una pequeña cadena de ADN que pueda unirse a la molécula que queremos copiar para que sirva como cebadora (cebador) (30).

La clave en la PCR cuantitativa es la posibilidad de detectar en tiempo real la amplificación de nuestro genoma de interés. Para llevar a cabo esta detección existen varios métodos pero casi todos basados en la utilización de un señalizador fluorescente llamado fluorofóro. La cuantificación de la fluorescencia emitida durante cada ciclo de la PCR será proporcional a la cantidad de ADN que se está amplificando. En general para que sea válida esta técnica requiere realizar en paralelo una curva patrón en las mismas condiciones para conocer la cantidad total de ADN que se está amplificando. Al finalizar cada ciclo, la cantidad de ADN molde disponible para el ciclo siguiente aumenta al doble. El ciclo se repite unas 20 a 30 veces a fin de obtener una cantidad detectable de ADN replicado (27, 29).

Para realizar esta prueba las muestras que se necesitan pueden variar, en donde se pueden usar todas las muestras ya mencionadas (médula ósea, sangre, ganglio, raspados cutáneos, biopsias tisulares), por ser una técnica de gran sensibilidad y especificidad, es el método con mayor peso diagnóstico confirmativo (28).

### **6.9.3- Diagnóstico inmunológico**

#### **6.9.3.1- Enzimoimmunoensayo (ELISA)**

Consiste en la detección de anticuerpos circulantes en sangre de los animales sospechosos a la enfermedad, donde serán positivos todos aquellos que hayan estado expuestos al agente causal, con mayor sensibilidad aquellos que presentan la infección activa en el momento de la prueba, para realizar la preparación del antígeno que será utilizado para el ensayo, se ocupara como base los cultivos del parásito, en los cuales se encuentran los promastigotes, de donde se extraerán los antígenos correspondientes para dicha prueba (3).

Los ensayos ELISA se pueden hacer con suero o con un volumen medido de sangre. La sangre se recoge por punción con aguja en tiras de papel absorbente



adecuado y se deja secar. La muestra se eluye y se prueba a una dilución única determinada previamente para dar una especificidad y sensibilidad aceptables. Esta prueba se puede utilizar para los estudios epidemiológicos en condiciones de campo (3).

#### **6.9.4- Histopatología**

Esta es otra técnica utilizada para la detección del parásito mediante microscopía, el método de obtención de la muestra es similar a los raspados, en cuanto a la limpieza, diferenciándose en que se debe tomar pequeños trozos de tejido comprometido para realizar los cortes histológicos correspondientes, que luego son teñidos con colorante Eosina-Hematoxilina (E&H), para la observación de las células linfoides infectadas (macrófagos) con la forma de amastigote del parásito en la lesión, permite al mismo tiempo el diagnóstico de otro tipo de patologías, las cuales pueden ser similares clínicamente a la leishmaniasis, pudiendo de esta forma realizarse un diagnóstico diferencial (28).

#### **6.9.5- Cultivos celulares**

Esta técnica permite aislar el parásito y demostrar la presencia en muestras de lesiones adquiridas por cada paciente. Donde la fase evolutiva aislada del parásito es el promastigote, siendo esta la etapa parasitaria más fácil de cultivar. Realizar dichos cultivos tiene como objetivo, demostrar el agente en lesiones de forma primaria, la obtención de cepas para posteriores estudios, así como la creación de antígenos para la elaboración de pruebas diagnósticas, entre otras, todo esto bajo criterios médicos y epidemiológicos (31).

Existe una diversidad de medios para realizar el cultivo de *Leishmania*, entre los más utilizados se encuentran, los medios monofásicos y bifásicos, con características definidas para cada uno. Se debe mencionar que la eficacia de cada prueba está condicionada por la especie del agente implicado, por mostrar diferencias en los requerimientos para su desarrollo in vitro (31).

Los medios bifásicos son empleados desde mucho tiempo para la detección del parásito, en donde el medio NNN (Medio de Novy, McNeal, Nicolle) es el más empleado para el cultivo de parásitos hemáticos y tisulares (31).



El medio bifásico de agar sangre o NNN, es un medio constituido por agar simple, NaCl (cloruro de sodio), agua destilada, sangre desfibrinada de conejo, todo debe ser bajo un estricto nivel de esterilidad para evitar contaminaciones. Es preparado como un medio de agar sangre, sin embargo esta incluye una etapa sólida referida al agar, y una etapa líquida que se forma por la condensación dentro de los tubos al momento del enfriamiento en agua fría o dentro de refrigeradora para obtener más de líquido en donde se reproducirán los parásitos. Se deben utilizar tubos de ensayo estériles de 13x100 mm, que terminado el proceso de elaboración es necesario dejarlos incubar 24 horas a 37°C y revisar el medio líquido para descartar posibles medios contaminados. Muchos autores mencionan que lo ideal es preparar estos medios con sangre desfibrinada de conejo o en su defecto sangre humana con la cual se han obtenido resultados favorables en los aislamientos primarios y en el mantenimiento de cepas de referencia (31).

Dentro de las ventajas que se han observado en la utilización de medios bifásicos de agar sangre para el diagnóstico primario se mencionan las siguientes: son valiosos para el aislamiento primario y el mantenimiento, por largo tiempo, de los «stocks» de *Leishmania*, permiten la morfogénesis celular de amastigotes en promastigotes, en la gran mayoría de los aislados de *L. braziliensis*, y de otras especies del sub-genero *Viannia*, así como del sub-genero *Leishmania*, son apropiados para los estudios de curvas de crecimiento, lográndose densidades de 107-108 promastigotes por mL de cultivo «in vitro» (31).

El medio permite también el establecimiento de la fase estacionaria de crecimiento, en aproximadamente 6-7 días, son de fácil preparación y de bajo costo. Sin embargo, existen también algunos inconvenientes entre los cuales podríamos citar: la dificultad de poder estandarizarse, por ser químicamente complejos y no definidos, no son apropiados para el crecimiento en masa de los flagelados por la presencia del agar, por lo que es necesario utilizar mejor los medios líquidos para la preparación de antígenos convencionales y células para estudios bioquímicos. El uso de medios líquidos, si bien adolece del inconveniente de su alto costo, presenta la ventaja de facilitar la observación del parásito directamente en el microscopio invertido. En cambio, cuando se efectúa el cultivo en medio NNN la observación se dificulta y por ello se le debe agregar unas gotas



de medio Schneider, también para facilitar la observación se realiza entre porta y cubreobjetos, tras la toma aséptica de una pequeña porción de la fase líquida que es donde crecen los promastigotes (31).

### **6.10- Actitud terapéutica**

Existen algunos protocolos de tratamiento para contrarrestar la enfermedad y evitar así la propagación del agente causal. Los derivados de antimonio constituyen la base terapéutica de la leishmaniasis canina; sin embargo hay pautas que interfieren con la aplicación del tratamiento, donde se explica que los caninos infectados son el reservorio más importante de contagio para los humanos a nivel peridoméstico y por esa consideración sanitaria requiere una vigilancia y actuación especiales; la OMS ha recomendado el sacrificio de los animales infectados con el fin de evitar la continuación del ciclo del parásito (13, 28).

En relación a los fármacos empleados, se utilizan los mismos grupos que en la leishmaniasis humana; donde los antimoniales pentavalentes son la primera elección. Para los caninos se utiliza el antimoniato de meglubine (antimoniato de N-metil glucamina), que posee como nombre comercial Glucantime®, este es aplicado a dosis de 100 mg/Kg/día, por 30 días como primera serie, con 7 a 15 días de descanso al finalizarlo. Pasado este período se aplica una segunda serie de 15 a 20 días, con el fin de evitar recidivas. Con este protocolo, un porcentaje notable de los animales tratados muestran una clara recuperación clínica; sin embargo algunas bibliografías mencionan que no hay certeza de una curación parasitológica completa y que por eso motivo en ocasiones hay muchas recidivas (13, 28).

Considerando las posibilidades en nuestro país, tenemos que mencionar que los tratamientos de este tipo no son aplicados, esto, por ser muy costosos y de poca accesibilidad, con un largo período de aplicación y parcialmente ineficaz según algunos autores.



## **7- DISEÑO METODOLÓGICO**

### **7.1- Tipo de estudio:** Descriptivo de corte transversal

Es descriptivo, porque se realizó la observación de un fenómeno social y clínico en un área geográfica determinada, estimándose los parámetros de la población a investigar a partir de una única muestra sin realizar manipulación de las variables independientes.

Corte Transversal porque todas las variables fueron medidas en una sola ocasión, es decir no se realizó más de una toma de la misma muestra en un período de tiempo determinado.

### **7.2- Área de estudio**

Se tomó como área de estudio regiones endémicas para leishmaniasis humana, según registros del Ministerio de Salud (MINSA), ubicándonos en una comunidad llamada Rota, del departamento de León. Dicha localidad cuenta con las siguientes características geográficas.

Área de extensión:

Coordenadas Geográficas: 12°32'0" Norte y 86°43'0" Este

Altura sobre el nivel del mar (asnm): 92.28 m.

Temperaturas promedio anuales: 39.4°C (verano) – 27.0°C (invierno)

Precipitación promedio anual: 1827 mm

### **7.3- Población**

Todos los caninos domésticos encontrados en el área de estudio.

### **7.4- Número de muestras**

Se calculó una muestra de 39 animales, mediante plataforma informática Working in Epidemiology, considerando que se desconoce la población, se tomó un nivel de confianza del 90% para el estudio, con un error aceptado del 10% y considerando una prevalencia del 17,3% según un estudio previo (7, 32).



### **7.5- Tipo de muestreo**

Por conveniencia, ya que se tomaron los caninos de las zonas endémicas para leishmaniasis en humanos, con el fin de poder observar la dinámica epidemiológica del lugar.

### **7.6- Criterios de inclusión:**

- Caninos domésticos encontrados en el área peridoméstica de la zona de estudio.
- Que el propietario aceptara que el canino participara voluntariamente en el estudio.

### **7.7- Criterios de exclusión:**

- Caninos que se encontraran en gestación.
- Caninos menores de 3 meses de edad.
- Que el canino sea demasiado agresivo.
- Que el dueño no quiera participar.

### **7.8- Consideraciones éticas**

El muestreo se llevó a cabo con la aprobación previa de cada propietario, para esto se elaboró un consentimiento informado, que invitaba al propietario a participar o no, en dicho estudio. También se tomaron en cuenta las normativas establecidas en la sección VII de la ley para la protección y el bienestar de los animales domésticos y animales silvestres domesticados, Ley 747.

### **7.9- Método de recolección de datos**

#### **7.9.1- Fuentes primarias**

Los datos con información sobre las diferentes variables fueron recolectados directamente en el momento de la toma de las muestras, aplicando una ficha de recolección de datos diseñada exclusivamente para este estudio, las variables incluyeron información relacionada con características epidemiológicas generales sobre el canino (edad, sexo, raza, condición corporal) así como, características clínicas y ambientales.



De igual manera se utilizó la ficha para obtener información sobre los dueños y posibles casos de leishmaniasis humanas que se hayan presentado pasados o recientes.

En la ficha se aplicó la escala de condición corporal que va de 1 a 5 donde se valoró el IMC (índice de masa corporal), donde:

1. Caquéctico: masa muscular disminuida en muslos, sin grasa subcutánea, costillas muy fácilmente palpables, esqueleto marcado, siendo fácil individualizar las apófisis espinosas y transversas de las vértebras torácicas.
2. Delgado: poca grasa subcutánea, costillas fácilmente palpables, esqueleto levemente aparente, siendo fácil individualizar las apófisis transversas de las vértebras lumbares.
3. Normal: costillas fácilmente palpables, esqueleto no aparente, cintura obvia lateralmente y dorsoventralmente.
4. Sobrepeso: presencia de panículos de grasa, costillas difícilmente palpables.
5. Obeso: panículos de grasa en toda la superficie corporal, costillas difícilmente palpables, disfunción respiratoria o locomotora (33).

## **7.10- Toma de muestras**

### **7.10.1- Extracción de sangre venosa y periférica:**

#### **7.10.1.1- Sangre Venosa**

Los tubos fueron rotulados con los datos correspondientes del animal. Luego se realizó de la forma más aséptica posible, haciendo una limpieza del área de extracción, se procedió a la depilación y desinfección del lugar. Se le aplicó un torniquete con una banda de goma por encima del codo de la extremidad delantera, donde se hizo la punción en la vena cefálica que discurre cranealmente por encima de las extremidades delanteras, con una aguja n° 21G y jeringa de 5 mL para extraer la cantidad de 4 mL de sangre, después de extraer la aguja se limpió con una torunda de algodón para contener la sangre post-punción. Se depositó la muestra en un tubo de ensayo con EDTA (ácido etilen diamino



tetraacético) para evitar la coagulación de la misma. Dicha muestra se refrigeró para su traslado al laboratorio donde se procesó, aquí se procedió a realizar el debido frotis a como se describe en sangre periférica.

#### **7.10.1.2- Sangre periférica**

Primero se procedió a identificar las láminas con los datos necesarios de cada canino. Para la muestra de sangre periférica se limpió una de las orejas del animal con alcohol y algodón, se depiló la zona de ser necesario localizando una de las venas auriculares, se realizó una punción con aguja estéril y con un capilar se hizo la recogida de la gota de sangre, que luego se depositó en un porta objeto para realizar el frotis, con ayuda de otro portaobjetos nuevo colocándolo encima de la gota en un ángulo de 30°, dejando la gota de sangre extenderse por capilaridad a lo largo de la superficie de contacto, se desliza el porta superior hacia adelante con movimiento firme y uniforme, con lo que la sangre se extiende formando una película delgada que posteriormente se dejó secar al aire, respectivamente.

### **7.11- Técnicas laboratoriales**

#### **7.11.1- Análisis parasitológico mediante microscopía óptica**

Ya obtenido el frotis este se tiñó con colorante Giemsa bajo el siguiente protocolo:

1. Una vez seco el frotis se fija con alcohol metílico absoluto durante 3-5 minutos, pasado este tiempo se escurre el exceso de alcohol y se deja secar.
2. Se cubre con una solución de colorante diluida, que se deja durante 30-60 minutos. El colorante se diluye a razón de 2 gotas de colorante comercial por cada mL de agua (para la tinción cada porta requiere aproximadamente 2 mL de solución).
3. Lavar la preparación con agua abundante y dejarla secar al aire o presionándola ligeramente entre dos hojas de papel de filtro (34).



Al tener la lámina teñida, se procedió a la observación en el microscopio con un lente objetivo de 100x colocando una gota de aceite de inmersión. La lectura se realizó en uno de los bordes del extendido con un movimiento de vaivén. La técnica para visualizar las células que podrían estar infectadas (monocitos) es la misma descrita en el caso de conteo diferencial de leucocitos (34).

## **7.11.2- Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR) (sybrgreen)**

### **7.11.2.1- Extracción de ADN**

Se realizó la extracción según manual de uso del fabricante del kit para qPCR, el utilizado fue el kit DNAzol® (ver anexo N°1)

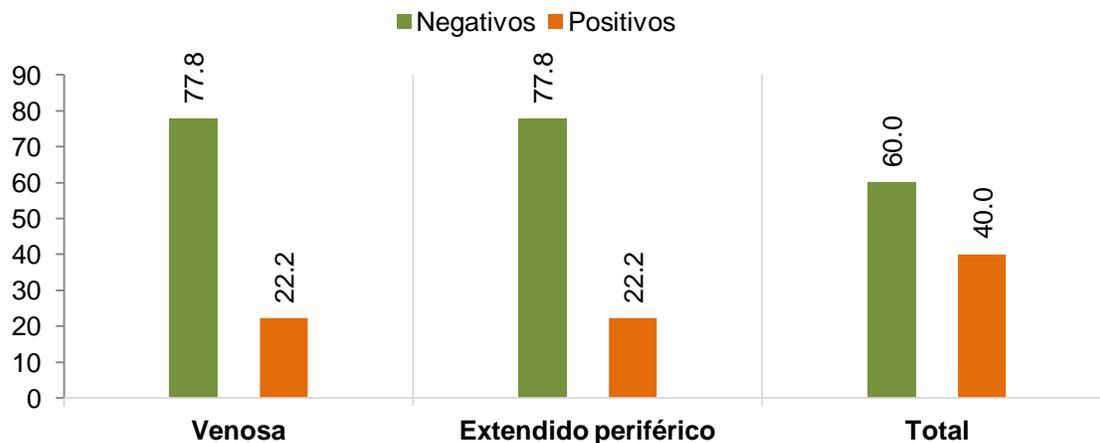
Reacción de amplificación (mezcla, los tiempos y temperaturas). Las cantidades utilizadas en la mezcla para las pruebas estas descritas en la Tabla N°1 (anexos).

Para el proceso de amplificación ocurren los siguientes pasos: desnaturalización, hibridación y extensión. En la Tabla N°2 (anexos) se explican cada una de estas etapas.

## 8- RESULTADOS

El estudio de Leishmaniasis canina realizado en la comunidad de Rota, departamento de León; incluyó 45 caninos para determinar la presencia del parásito y observar el papel de los caninos como reservorio en una zona endémica a casos en humanos.

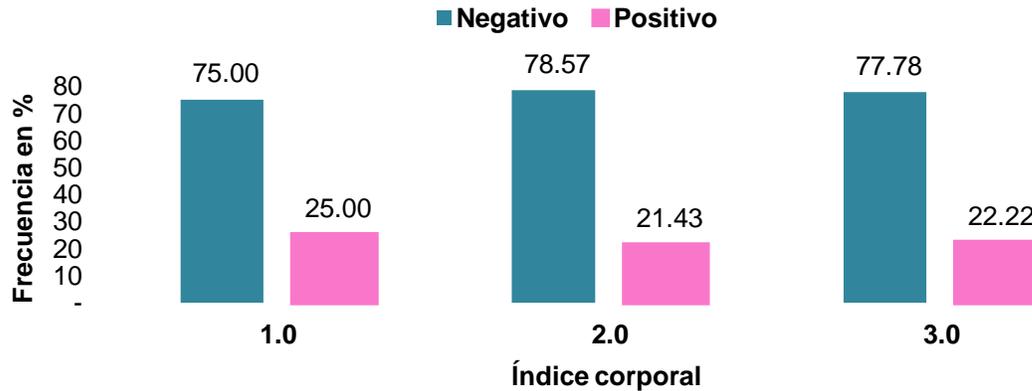
Para los frotis sanguíneos, se obtuvieron dos conjuntos de datos conforme a los tipos de frotis realizados; venosa y periférica. En muestra venosa se encontró el amastigote en 22.2%, mismos hallazgos fueron observados en las muestras de sangre periféricas, sin embargo, no fueron los mismos animales que resultaron positivos en las muestras venosas. El 40% de los caninos muestreados fueron positivos en al menos una de las dos muestras pero solamente el 4.4% de los perros fueron positivos en ambas muestras, estos datos proporcionaron un valor de concordancia de Kappa de -0.029 ( $p=0.848$ ) (Gráfica N°1).



**Gráfica N°1: resultados obtenidos de los frotis sanguíneos**

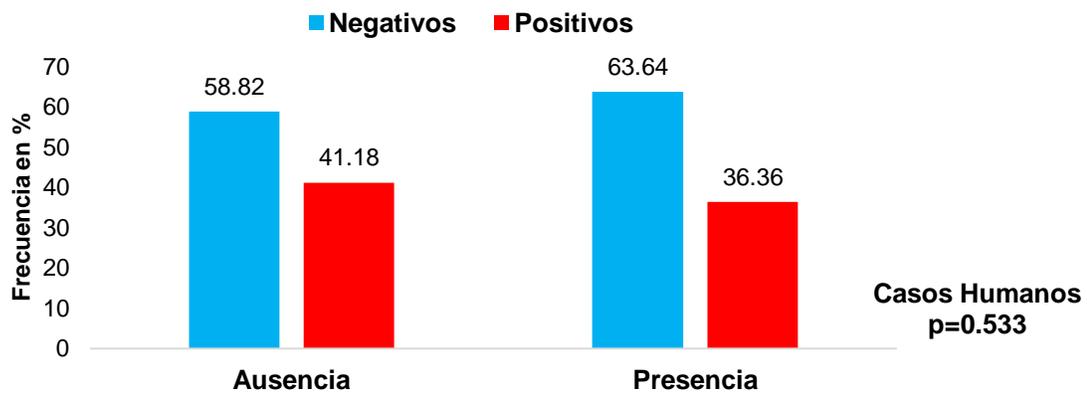
Con la asociación entre la presencia del parásito y la sintomatología clínica de cada canino, no se encontraron diferencias significativas, debido a que los valores de  $p$  según el análisis de Chi cuadrada, fueron mayores de 0.05 al realizar las tablas de contingencias para la infección con el parásito y el índice de masa corporal, presencia de enfermedad o lesiones cutáneas. (Gráfica N°2)

Para el índice de masa corporal los valores encontrados fueron, estado de caquexia (1), delgadez (2) y estado ideal (3). En el caso de lesiones cutáneas se observó dermatosis descamativa (4.4%), debilidad y alopecia (25%) de los caninos, esto no fue significativo en la asociación con presencia del parásito.



**Gráfica N°2: Asociación del índice de masa corporal y la infección de *Leishmania* spp.**

En el análisis de la asociación humano-canino se observó que, en ausencia de casos humanos el 58.8% de los caninos resultaron negativos y un 41.2% positivos. Mientras que en presencia de casos humanos el 63.6% de los perros fueron negativos y solo un 36.3% fueron positivos. Del cruce de estos valores se obtuvo un valor de significancia de  $p$  superior a 0.05 ( $p=0.533$ ), (Gráfica N°3).

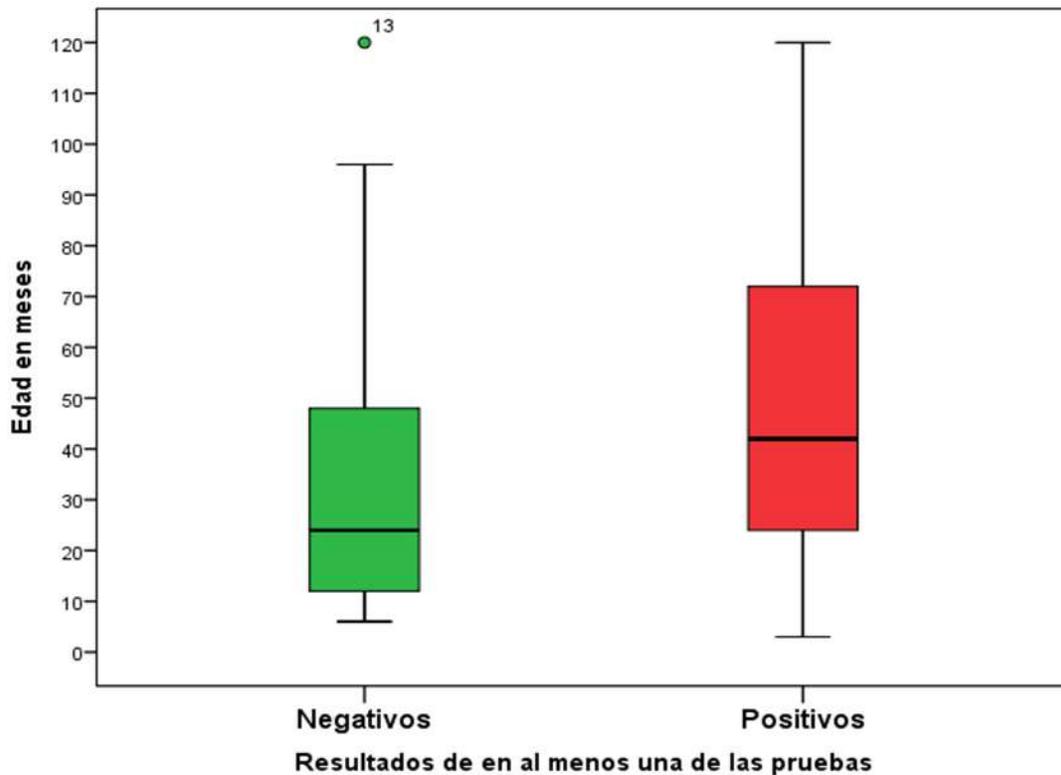


**Gráfica N°3: Asociación entre la presencia del *Leishmania* spp. en caninos y la presencia de casos humanos**

En la evaluación para asociar la edad de los caninos con la enfermedad, demostró que los perros positivos presentaban medias 45.94 meses de edad (Des. típ. 28.01), en cambio los negativos presentaron promedio de edad 35.18 meses (Des. típ 27.04), mediante el cálculo correspondiente de t de Student se obtuvo un valor de significancia mayor de 0.05 ( $p=0.944$ ), (Tabla N°3 y Gráfica N°4).

**Tabla N°3 Asociación a edades de caninos con la presencia del parásito.**

Presencia del parásito	Media de las edades en meses	Desviación estándar	Valor p según prueba de t
Negativo	35.18	27.05	0.944
Positivo	45.94	28.01	



**Grafica N°4:**  
Asociación de la edad de los caninos con la infección de Leishmania spp.



En la amplificación del PCR convencional para la detección de *Leishmania infantum* no se obtuvo resultados positivos para las 45 muestras, sin embargo los controles provenientes de cultivos de una cepa control de *Leishmania mexicana* fueron amplificados, por lo que se procedió a realizar PCR cuantitativo, obteniéndose los mismos resultados.

Los resultados indican que en los caninos de la zona endémica de Rota no circula *L. mexicana*. Los resultados se reflejan los anexos n° 8 y 9.



## 9- DISCUSIÓN

En este estudio se trabajó con el fin de poder demostrar la presencia del parásito *Leishmania* en canes de una zona endémica a leishmaniasis humana, tomando como lugar de estudio la comunidad de Rota, perteneciente al municipio de Malpaisillo, departamento de León.

En el análisis de sangre venosa se encontró un 22.2% de caninos positivos, misma frecuencia encontrada en sangre periférica. Aplicando un análisis mediante tabla de contingencia, se logró obtener un valor de concordancia de Kappa de -0.029 ( $p=0.848$ ), representando un 4.4% (2/45) de los caninos que dieron positivos en ambas muestras. En un estudio realizado en Perú en el año 2000 encontraron resultados similares, al comparar tres técnicas diagnósticas, con valores de 3.6% (3/83) de positivos en frotis de lesiones e IFI, en contraste al 8,4% (7/83) positivo mediante intradermorreacción, dando una concordancia del 100% para frotis e IFI, y un 58% para frotis e intradermorreacción (6).

En nuestro estudio, la frecuencia de caninos positivos en muestras de sangre fue superior a la observada en un estudio realizado en Colombia a 307 caninos (1.4%) (7), a los que se les realizaron frotis a partir de muestras de ganglio poplíteo, autores refieren que la muestra de ganglio es más sensible que el extendido periférico, sugiriendo así, que la prevalencia de caninos infectados en la zona endémica de Rota, podría ser mayor a la observada en nuestro estudio por análisis de sangre.

La asociación entre sintomatología clínica y presencia del parásito por microscopía óptica, no se determinó debido a la poca sintomatología presente. Los principales signos clínicos compatibles con la parasitosis fueron: lesiones cutáneas (dermatosis descamativa - alopecia) (4.4%), estado de caquexia y debilidad (25%). Un estudio realizado en Colombia en 2006 (8), asoció signos similares en 35% de la población canina, 24,3% onicogrifosis, 10% linfadenitis, 5% lesiones cutáneas y 2,7% disminución del apetito respectivamente. En El Salvador en 2009 (10), obtuvieron un alto porcentaje de compatibilidad a la



enfermedad mediante sintomatología clínica, llegando a un 86% (65/79) de caninos positivos, sin embargo al momento de la prueba confirmatoria por frotis de ganglio poplíteo los resultados fueron negativos (79/79), analizando estos datos podemos señalar que no se ha podido confirmar con certeza la asociación clínica- enfermedad, y que la presencia o ausencia de signos clínicos no siempre son indicativos de la existencia del parásito.

La relación de casos humano-animal registradas durante la investigación, reflejaron una baja correlación entre ambos, con valores de 41.2% positivos en al menos uno de los dos frotis sanguíneos, evaluando los valores por cada tipo de frotis realizado solo 18.2% de relación fue obtenida para ambos frotis. Esto puede atribuirse, a que el 55% (5/9) de los casos humanos fue tratado con resolución de la enfermedad en los períodos iniciales, el restante 45% (4/9) obtuvo curación de forma natural, con la sospecha que fuesen portadores asintomáticos. Debido a que esto no es determinante para la infección en caninos, también se tomaron factores como: presencia del canino en el momento de la enfermedad, donde en el 33% (3/9) de los casos no habían caninos durante la enfermedad. Sin embargo, existen circunstancias tales como, comportamiento ambiental del vector transmisor, horas de actividad para la alimentación (anochececer y antes del amanecer), distancia de vuelo (200 m) que determina la propagación del agente infeccioso a caninos u otros animales silvestres. Aunque no hay correlación entre casos humano-animal, hay un elevado porcentaje de positividad en caninos de la zona, pudiendo ser un factor de riesgo para diseminación de la enfermedad.

El análisis de PCR convencional y cuantitativo reflejó que no se encuentra circulando *L. mexicana* en los caninos de la comarca de Rota, un estudio realizado en España en el 2000 (11), el cual analizó diferentes muestras para detectar la presencia de *Leishmania* spp. por PCR, determinó que las muestras de sangre son menos sensibles, lo cual se explica por el tiempo que el parásito circula en vía hemática; aunque otros estudios reportan que la sangre contiene un componente (hematina) que es capaz de inhibir la PCR, por otra parte un estudio realizado en 2015 por Reyes en Venezuela (12) encontró que la concentración de algunos



***Leishmaniasis canina en un área endémica a leishmaniasis humana en Nicaragua.***



reactivos, son factor determinante para la amplificación del ADN parasitario y sugiere que existen diferencias en la cantidad de ADN en las diferentes especie de *Leishmania* lo que afecta la sensibilidad de la prueba.



## 10-CONCLUSIONES

**Primera:** en el presente estudio se logró identificar una alta presencia de caninos positivos a *Leishmania* spp. en el área endémica de Rota, comprobándose mediante frotis, tanto periférico, como venoso.

**Segunda:** las variables; sintomatología clínica y edad no mostraron asociación con los resultados positivos.

**Tercera:** existe una baja concordancia en los resultados parasitológicos observados en sangre periférica y sangre venosa, lo que posiblemente se explica por el ciclo biológico de *Leishmania* spp.

**Cuarta:** no se observó asociación entre casos positivos de leishmaniasis humana y leishmaniasis canina, explicado posiblemente por la aplicación de tratamiento en casos humanos y la ausencia del canino en el momento de la infección humana, aunque es de importancia el porcentaje de caninos positivos encontrados en el estudio por formar parte de un riesgo para la salud pública.

**Quinta:** no se encuentra circulando *L. mexicana* en los caninos del área endémica de Rota, comprobándose por PCR convencional y PCR cuantitativo.



## 11-RECOMENDACIONES

- Dar continuidad a investigaciones sobre leishmaniasis canina en áreas endémicas de leishmaniasis humana mediante técnicas de diagnóstico con mayor sensibilidad como PCR y pruebas serológicas.
- Comprobar la existencia y la especie del vector de la leishmaniasis en esta área endémica.
- Determinar la presencia de *Leishmania* spp. en el vector transmisor.
- Ejecutar otros estudios para comprobar si existen reservorios silvestres de leishmaniasis en esta área de Nicaragua.
- Efectuar jornadas de desparasitación para los caninos de estas zonas endémicas de leishmaniasis humana.
- Brindar capacitaciones a la población sobre la leishmaniasis y los riesgos que representa para la salud.
- Realizar jornadas de fumigación para el control del vector de la leishmaniasis.



## 12-REFERENCIAS:

1. Sánchez Saldaña, Sáenz Anduaga. Educación Médica Continua: Leishmaniasis [Internet]. [citado 26 de julio de 2016]. Disponible en: [http://sisbib.unmsm.edu.pe/bvrevistas/dermatologia/v14\\_n2/pdf/a02.pdf](http://sisbib.unmsm.edu.pe/bvrevistas/dermatologia/v14_n2/pdf/a02.pdf)
2. Bermúdez Montiel, López Vásquez. Diagnóstico y aplicación del tratamiento en pacientes con leishmaniasis cutánea atendidos en el hospital primario Fidel Ventura, Waslala. Primer semestre del 2014. [Managua]: Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua, Managua. Facultad de Ciencias Médicas; 2015.
3. Leishmaniosis, Manual de la OIE sobre animales terrestres [Internet]. 2008. Disponible en: [http://web.oie.int/esp/normes/mmanual/pdf\\_es\\_2008/2.01.08.%20Leishmaniosis.pdf](http://web.oie.int/esp/normes/mmanual/pdf_es_2008/2.01.08.%20Leishmaniosis.pdf)
4. Fonseca, Pérez, Jiménez, Sandoval. Prevalencia de Leishmaniasis cutánea atípica y encuesta entomológica sobre flebótomos spp existentes en veinte comunidades rurales de los municipios de Tipitapa, San Francisco Libre y Ticuantepe pertenecientes al SILAIS Managua. Período Septiembre a Octubre de 2004. 2003.
5. Signos clínicos de la leishmaniosis canina [Internet]. Argos Portal Veterinaria. [citado 14 de enero de 2016]. Disponible en: <http://argos.portalveterinaria.com/noticia/6240/articulos-archivo/signos-clinicos-de-la-leishmaniosis-canina.html>
6. Medina, Chávez, Minaya, Espinoza. Infección por Leishmania sp. en caninos del distrito de Pampas Grande, ANCASH [Internet]. Disponible en: <http://www.scielo.org.pe/pdf/rivep/v13n2/a06v13n2>
7. Fernández, Charry, Bello, Escovar, Lozano, Ayala, et al. Prevalencia de leishmaniosis visceral canina en municipios de Huila – Colombia. Rev Salud Pública [Internet]. 12 de octubre de 2010 [citado 13 de enero de



- 2016];4(3):278-85. Disponible en:  
<http://revistas.unal.edu.co/index.php/revsaludpublica/article/view/18534>
8. Fernández, Bello, López, Moncada, Vargas, Ayala, et al. Seroprevalencia de leishmaniosis visceral canina en la comuna 8 de Neiva y en cuatro municipios de Huila, Colombia. Disponible en:  
<http://www.revistabiomedica.org/index.php/biomedica/article/view/1506>
9. Romero, López, Echeverry, Rivas. Estudio comparativo de pruebas serológicas para el diagnóstico de la Leishmaniasis visceral canina: nota técnica. :5. Disponible en: <http://www.scielo.org.ve/pdf/rc/v19n6/art05.pdf>
10. Escobar, Arteaga Rodríguez. Prevalencia de Leishmania spp. en cánidos domésticos de dos cantones del municipio de San Ildefonso, Departamento de San Vicente El Salvador [Internet]. [El Salvador]: UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS; Disponible en: <http://ri.ues.edu.sv/1600/1/13100615.pdf>
11. Burriel, Osta R, Gascón. Diagnóstico de la Leishmaniasis canina mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR): un procedimiento simple para uso en la clínica.
12. Reyes, Viettri, Rivas, Lares, Herrera, Aguilar, et al. Estandarización de la técnica de PCR para la detección de ADN de Leishmania sp. en muestras de sangre de caninos.
13. Cordero del Campillo, Rojo Vázquez, Martínez Fernández, Sánchez Acedo, Hernández Rodríguez, Navarrete López-Cozar, et al. Parasitología Veterinaria. McGRAW-HILL-INTERAMERICANA DE ESPAÑA, S.A.U.; 1999. 652-665 p.
14. [citado 22 de noviembre de 2016]. Disponible en:  
<https://parasitologiauce.files.wordpress.com/2015/03/leishmania-sp.pdf>



15. OMS | Leishmaniasis [Internet]. WHO. [citado 16 de enero de 2016]. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/es/>
16. García Almagro. Leishmaniasis cutánea: estudio en el área sanitaria de Toledo. [Madrid]: Universidad Complutense de Madrid; 2004.
17. Arias, Beltrán, Desjeux, Walton. Epidemiología y control de la leishmaniasis en las Américas, por país o territorio [Internet]. 1996. Disponible en: <http://www.bvsde.paho.org/texcom/cd045364/epi-y-control.pdf>
18. Rivera, Guevara. Comportamiento clínico epidemiológico de la Leishmaniasis cutánea en Murra, Nueva Segovia 2004-2005 [Internet]. Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua, León. Facultad de Ciencias Médicas; Disponible en: <http://riul.unanleon.edu.ni:8080/jspui/bitstream/123456789/2062/1/196987.pdf>
19. Lugo, Ortega Moreno, Rodríguez, Belizario, Galindo, Cabrera González, et al. Seroprevalencia de la Leishmaniasis Visceral Canina Mediante Elisa con rK39 en Focos Endémicos de Venezuela. Rev Fac Cienc Vet [Internet]. vol.56. Disponible en: <http://www.scielo.org.ve/pdf/rfcv/v56n1/art06.pdf>
20. Epidemiología de la Leishmaniasis [Internet]. [citado 17 de enero de 2016]. Disponible en: [http://www.madrimasd.org/blogs/salud\\_publica/2008/01/26/83327](http://www.madrimasd.org/blogs/salud_publica/2008/01/26/83327)
21. Diagnóstico y control de la leishmaniasis en Centroamérica [Internet]. Issuu. [citado 19 de enero de 2016]. Disponible en: [http://issuu.com/alejandrovalenciat/docs/manual\\_centroamerica\\_leishmaniasi](http://issuu.com/alejandrovalenciat/docs/manual_centroamerica_leishmaniasi)
22. Almanza, Martínez. Estudio del ciclo biológico del vector de leishmaniasis visceral *Lutzomyia evansi* (Núñez-Tovar, 1924) (Diptera:Psychodidae) bajo condiciones de laboratorio. [Internet]. 2008. Disponible en: <http://repositorio.unisucre.edu.co/bitstream/001/68/2/595.771043A445.pdf>
23. Amusatogui. Tratamiento de la Leishmaniosis canina: valoración, caracterización y comparación de la respuesta a distintos protocolos a base



- de antimonio de meglubine (asociado o no a alopurinol) [Internet]. [Madrid]: Universidad Complutense de Madrid; 1998 [citado 21 de abril de 2016]. Disponible en: <http://biblioteca.ucm.es/tesis/19972000/D/2/D2017401.pdf>
24. Echeverry, Narváez, Gualtero Trujillo. Guía de atención de la Leishmaniasis.
25. Novedades sobre leishmaniosis canina | Clínica veterinaria 24 horas [Internet]. [citado 20 de abril de 2016]. Disponible en: <http://www.clinica-veterinaria-barcelona.com/web/novedades-sobre-leishmaniosis-canina/>
26. Veterinaria Argentina. Leishmaniosis Visceral en los Caninos y Felinos: Actualización. [Internet]. [citado 20 de abril de 2016]. Disponible en: <http://www.veterinariargentina.com/revista/2011/10/leishmaniosis-visceral-en-los-caninos-y-felinos-actualizacion/>
27. Montalvo, Fraga, Monzote, García, Fonseca. Diagnóstico de la leishmaniasis: de la observación microscópica del parásito a la detección del ADN [Internet]. Disponible en: [http://www.bvs.sld.cu/revistas/mtr/v64n2\\_12/mtr02212.htm](http://www.bvs.sld.cu/revistas/mtr/v64n2_12/mtr02212.htm)
28. Canese, Domingo, Oddone. Manual de diagnóstico y tratamiento de la leishmaniosis. [Internet]. 2011 [citado 28 de abril de 2016]. Disponible en: [http://www.imt.edu.py/admin/uploads/Documento/manual\\_leish.pdf](http://www.imt.edu.py/admin/uploads/Documento/manual_leish.pdf)
29. Diagnóstico Parasitológico de la Leishmania Tegumentaria Americana [Internet]. [citado 28 de abril de 2016]. Disponible en: [http://sisbib.unmsm.edu.pe/bvrevistas/medicina\\_experimental/v17\\_n1-4/diagnos\\_parasito.htm](http://sisbib.unmsm.edu.pe/bvrevistas/medicina_experimental/v17_n1-4/diagnos_parasito.htm)
30. [citado 22 de noviembre de 2016]. Disponible en: <http://www2.inecc.gob.mx/publicaciones/libros/530/cap17.pdf>
31. Montealegre. Importancia de los medios de cultivo en el diagnóstico de leishmaniasis. Disponible en: [http://www.unicolmayor.edu.co/invest\\_nova/NOVA/NOVA14\\_EDITORIAL.pdf](http://www.unicolmayor.edu.co/invest_nova/NOVA/NOVA14_EDITORIAL.pdf)



32. de Blas I. Working in Epidemiology [Internet]. Zaragoza, España; 2006. Disponible en: <http://www.winepi.net/>
33. Cómo evaluar el Índice de Condición Corporal (ICC) en perros y gatos [Internet]. [citado 2 de febrero de 2016]. Disponible en: <http://www.cimformacion.com/blog/veterinaria/como-evaluar-el-indice-de-condicion-corporal-icc/>
34. Gómez Piquer, Meseguer, Verde Arribas, Marca, Gascón Pérez, García Belenguer, et al. Manual práctico de análisis clínicos en veterinaria. Zaragoza, España: MIRA EDITORES, S. A.; 1992. 21-64 p.



## 13-ANEXOS

### Anexo N°1: DNAzol® - Reactivo de aislamiento de ADN genómico. Protocolo general de extracción de ADN

<b>1. Lisis \ Homogenización:</b>	1 mL DNAzol + 25 - 50 mg de tejido, células 107 o 100 $\mu$ L de muestra líquida.
<b>2. Centrifugación(Opcional):</b>	10.000 g x 10 minutos.
<b>3. Precipitación del ADN:</b>	Lisado + 0,5 mL de etanol al 100%.
<b>4. Lavado del ADN:</b>	1 mL de etanol al 75% (2x).
<b>5. Solubilización del ADN:</b>	8 mM NaOH o agua. (0,2 a 0,3 mL x 100 $\mu$ L ó 10 a 20 mg de muestra )

#### Descripción del Procedimiento.

1. En un vial de 2 mL, depositar 500  $\mu$ L de DNAzol + 50  $\mu$ L de la muestra, homogenizar la dilución por pipeteo repetido. Incubar de 5-10 min. a temperatura ambiente.
2. Centrifugar la dilución a razón de 10,000 Rcf x 10 min, a temperatura de 4-25 °C.
3. Agregar 250  $\mu$ L de Ethanol al 99%, mezclar por inversión de 6-8 tiempos. Dejar incubar de 1-3 min, pasado el tiempo desechar el sobre nadante por decantación procurando dejar el precipitado recién formado.
4. Lavar el material obtenido con 400  $\mu$ L de Ethanol al 75%, mezclar por inversión de 6-8 tiempos y dejar incubar 1 min. Se desecha el sobrenadante de Ethanol por decantación y se repite el paso 1 vez más. El producto obtenido se pasa a centrifugar a razón de 1000 Rcf x 1min y luego retirar el etanol restante mediante pipeteado.
5. En el material obtenido se agregan 100  $\mu$ L de 8 mM NaOH con HEPES para la solubilización del ADN. La dilución obtenida esta lista para su análisis mediante técnica de PCR. (Si no es utilizada en el momento se debe de guardar la dilución a -20 °C para su posterior análisis.

*Nota: Las cantidades de reactivos, al igual que las de muestras, pueden variar dependiendo del tipo de material biológico utilizado y del criterio del investigador para una optimización de los resultados.*

**Tabla N° 1. Componentes para cada muestra equivalente a 20 µL**

Producto	Cantidad (µL)
Master mix 2X	10
Cebador directo	1
Cebador inverso	1
Agua libre de nucleasas	3
Muestra (ADN)	5
<b>Total</b>	<b>20</b>

**Tabla N° 2. Secuencia utilizada en el Termociclador**

Inicio	Ciclos 44 X			Final
95°C (7 Min)	95°C (30 Seg)	55°C (30 Seg)	72°C (30 seg)	55°C  * 90°C
Activación Taq ADN polimerasa (Hot Start)	Desnaturalización del ADN blanco (obtención de dos hebras de ARN para la replicación)	Hibridación con unión de cebadores (T° Anneling)**	Replicación de ADN por acción de la Taq ADN polimerasa (T° Melting)***	Curva de Disociación, para obtener la cantidad exacta del ADN diana de los ciclos de amplificación
	En cada ciclo de replicación se muestra la cuantificación del número de copias obtenidas mediante graficas digitales.			

\* Aumento de la temperatura cada 0.5°C en un tiempo determinado.

\*\* Temperatura de anillamiento o hibridación, da lugar a la unión de los cebadores de forma específica, ayudando al comienzo de la elongación del ADN diana.

\*\*\* Temperatura de Fusión, es donde se produce la elongación del ADN diana por acción de la polimerasa, utilizando como materia prima los dNTPs (desoxirribonucleótidos fosfatados)



## **Anexo N°2: Consentimiento Informado**

### **Estimado Propietario:**

Somos médicos veterinarios egresados de la UNAN-León. Nos encontramos realizando una investigación sobre leishmaniasis canina en áreas endémicas para leishmaniasis humana. El objetivo de este estudio es identificar la presencia del agente causal de esta enfermedad en los perros mediante algunas pruebas de laboratorio y determinar si son portadores del parásito.

Por medio de la presenta le solicitamos su participación y permiso voluntario para realizar una serie de actividades, que incluyen:

- Llenado de una encuesta para la obtención de sus datos como propietario y del canino participante;
- Extracción de 5 mL de sangre de una de las extremidades delanteras del perro y aproximadamente una gota de sangre de la oreja;

Las molestias causadas serian:

- Por la toma de sangre: dolor o malestar y un posible hematoma en la zona del pinchazo.

Mencionado lo anterior, si se encuentra usted de acuerdo con este estudio se le solicita rellenar lo siguiente:

Los beneficios serian:

- Revisión del estado general de su mascota.
- Conocer la situación epidemiológica de la enfermedad en la zona.

Nombre: \_\_\_\_\_

Dirección: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

**Firma**



**Anexo N°3: Ficha**

**Código:** \_\_\_\_\_

**Datos Generales del Área:**

**Coordenadas:** Latitud \_\_\_\_\_ Longitud \_\_\_\_\_

**Ambientales:** Altitud \_\_\_\_\_ Humedad \_\_\_\_\_ Temperatura \_\_\_\_\_

**Habitad:** Maleza  Causes  Charcas  Patios compartidos

**Área:** urbana  semiurbana  rural

**Datos del Propietario:**

- ❖ Nombre y Apellido: \_\_\_\_\_
- ❖ Edad: \_\_\_\_\_
- ❖ Sexo: F  M
- ❖ Ocupación: \_\_\_\_\_
- ❖ Fecha de detección de la enfermedad: \_\_\_\_\_
- ❖ Tratamiento: Si  No
- ❖ En respuesta positiva al ítem anterior, tratamiento utilizado: \_\_\_\_\_
- ❖ Fin del Tratamiento: Si  No
- ❖ Presencia de caninos durante la enfermedad: Si  No

**Datos del animal:**

- ❖ Nombre: \_\_\_\_\_
- ❖ Edad: \_\_\_\_\_
- ❖ Raza: \_\_\_\_\_
- ❖ Sexo: H  M
- ❖ Peso aproximado: \_\_\_\_\_
- ❖ Coloración de mucosas: \_\_\_\_\_
- ❖ TRC: \_\_\_\_\_
- ❖ T°: \_\_\_ FC: \_\_\_ FR: \_\_\_

**Datos Específicos:**

- ❖ Condición corporal: 1  2  3  4  5

**Hallazgos Clínicos:**

Anorexia	Onicogriposis	
Apatía	Paresia en extremidades posteriores	
Astenia(Debilidad)	Hepatomegalia	
Polidipsia	Adenopatías	
Alopecia periorbitaria	Conjuntivitis mucosa o mucopurulenta	
Alopecia Auricular	Otras afecciones oculares	
Ulceras en puntos de presión	Rinitis serosa o mucopurulenta	
Ulceras en uniones moco-cutáneas	Cifosis	
Dermatitis descamativa	Epistaxis	



❖ Observaciones: \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

**Información de la Muestra:**

Tipo de muestra:

Sangre venosa\_\_\_\_ Sangre Periférica\_\_\_\_

❖ Hora de la toma: \_\_\_\_\_  
❖ Exámenes a realizar: Extendido \_\_\_\_\_ PCR cualitativa\_\_\_\_ PCR  
cuantitativa\_\_\_\_  
❖ Observaciones: \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

**Anexo N°4: Comarca Rota**



**Anexo N°5: Toma de muestras**

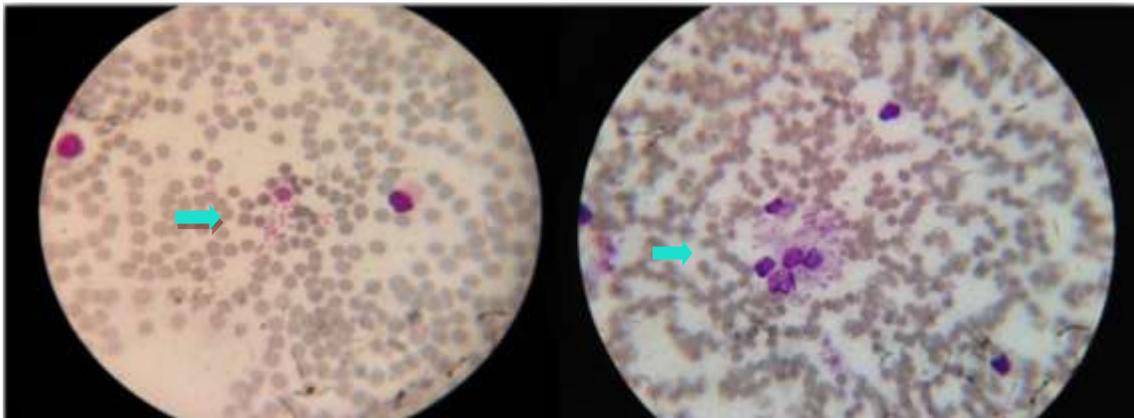


**Anexo N°6: Frotis citológicos**

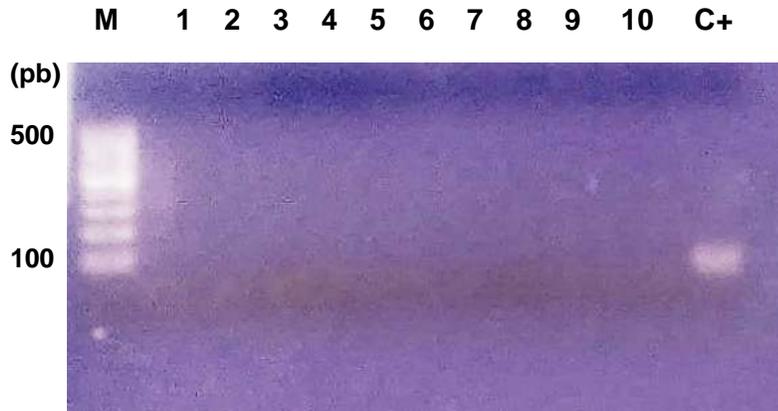


**Tinción de Giemsa**

**Anexo N°7: Amastigotes de *Leishmania* spp.**

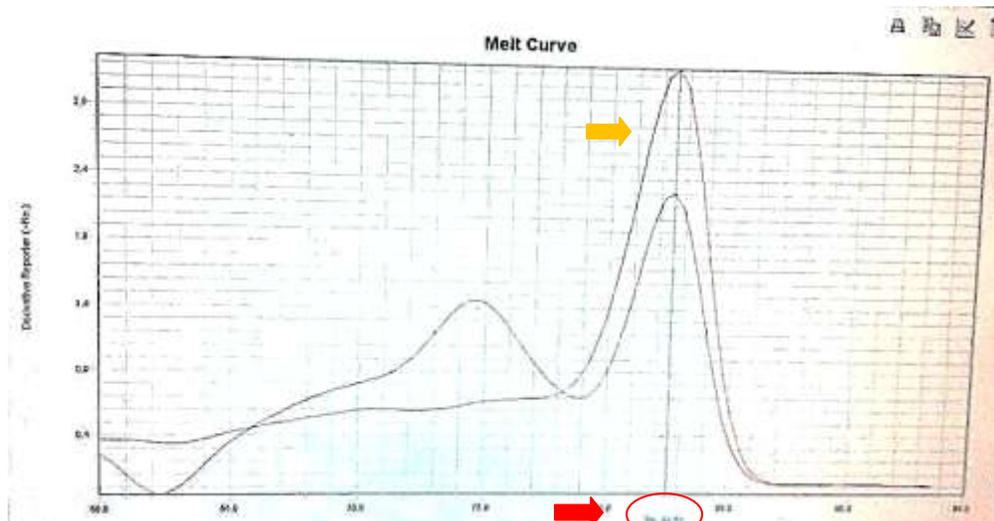


### Anexo N°8: PCR convencional, banda de control positivo (*L. mexicana*)



Electroforesis en gel de Agarosa, en TAE, teñido con bromuro de Etidio, en el que se observa amplificación del ADN de *Leishmania* spp. (M) Marcador molecular, (1-10) muestras de caninos y (C+) control positivo de *L. mexicana*.

### Anexo N°9: PCR Tiempo Real



La flecha naranja indica la curva de la cepa control *L. mexicana* a una temperatura de amplificación de 83.1 °C como indica la flecha roja.