



Universidad Nacional de Misiones. Facultad de Ciencias Exactas,  
Químicas y Naturales. Secretaría de Investigación y Postgrado. Maestría  
en Salud Pública y Enfermedades Transmisibles.

Maestrando  
**Ricardo Gabriel Díaz Alarcón**

## Identificación molecular de las especies de *Leishmania spp.* en canes y humanos de la Provincia de Misiones (Argentina)

Tesis de Maestría presentada para obtener el título de “Magíster  
en Salud Pública y Enfermedades Transmisibles”

“Este documento es resultado del financiamiento otorgado por el Estado Nacional, por lo tanto  
queda sujeto al cumplimiento de la Ley N° 26.899”.

Directora  
**Dra. Lucrecia Acosta Soto**  
Co-Directora  
**Dra. Karina Salvatierra**

Posadas, Misiones 2016



Esta obra está licenciado bajo Licencia Creative Commons (CC) Atribución-NoComercial-  
CompartirIgual 4.0 Internacional. <https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

**Identificación molecular de las  
especies de *Leishmania spp.* en canes  
y humanos de la Provincia de Misiones  
(Argentina).**

Ricardo Gabriel Díaz Alarcón

Tesis de Maestría

Maestría en Salud Pública y Enfermedades  
Transmisibles

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE MISIONES**

**Misiones - Argentina 2016**

## **Dedicatoria**

A mis padres, que fueron los que me permitieron hacer mis estudios, y me incentivaron a hacer lo que me gusta sin importar lo que sea.

A mi hijo, que un día él también pueda realizar sus metas y conseguir sus objetivos como yo logré los míos.

## **Evaluadores**

Fueron evaluadores de este trabajo en primera instancia:

- Dr. Pedro Darío Zapata.
- Dr. Gustavo Cerutti.
- Dr. Julio Daviña.

En segunda instancia:

- Dr. Alfredo Zurita.
- Dr. Jorge Enrique Deschutter.

Los jurados de la evaluación final de este trabajo:

- Dr. Pedro Darío Zapata.
- Dra. Maria Assunta Busato.
- Dr. Jorge Enrique Deschutter.

## **Agradecimientos**

En primer lugar quiero agradecer a mis padres, que me dieron la vida y la posibilidad de realizar mis estudios.

Quiero agradecer enormemente a mis directoras, Lucrecia y Karina, que con tanto entusiasmo me han sabido acompañar en este camino. Por el tiempo y predisposición en compartir sus conocimientos para lograr esta Maestría.

A los directores de la Maestría, Fernando Bornay y Jorge Deschutter, por su guía y su paciencia.

También quiero agradecer a Gustavo Silva, por haberme acompañado en todo el trabajo y por los aportes que realizó para mejorar este proyecto.

Al Ministerio de Salud Pública de Misiones, la Dra. Piragine y Dr. Abel Gutiérrez por su ayuda para recabar los datos.

Al Laboratorio de Alta Complejidad Misiones, a Javier de Lima que me brindaron importantes datos para este estudio.

Muchas gracias a la gente del IMuSa, Gustavo Elizaincín y Federico Infrán que con muchas ganas de cooperar y mejorar la salud de los cachorros, me brindaron las muestras de canes y los datos necesarios para el análisis.

A mi compañera de Mundo Sano, Gladys Fattore, que aportó las muestras clínicas de perros de Puerto Iguazú y sus datos.

Quiero agradecer a Graciela Jordá, por su ayuda en el laboratorio de Parasitología.

Muchísimas gracias a mi mujer, que me acompañó durante todo desarrollo de este trabajo, escuchando mis alegrías y dificultades aunque no entendía de qué le estaba hablando.

## Resumen

Las leishmaniosis comprenden un conjunto de formas clínicas producidas por parásitos del género *Leishmania* que puede afectar al ser humano y otros hospedadores. En Misiones podemos encontrar principalmente la forma cutánea y visceral de esta patología. El presente trabajo determinó, mediante técnicas moleculares (PCR-RFLP y secuenciación), el agente etiológico de una serie de casos humanos y caninos, así como la descripción de características clínico-epidemiológicas.

En la serie canina se encontró como único agente a *L. infantum*. La serie de humanos, estaba constituida por casos de leishmaniosis visceral y casos de leishmaniosis cutánea. Los casos de leishmaniosis visceral tenían como agente etiológico a *L. infantum*, mientras que de los 4 casos de leishmaniosis cutánea *L. braziliensis* resultó el agente identificado en 2 casos y *L. infantum* en dos. Entre los pacientes se incluyó a una mujer embarazada que resultó caso confirmado de leishmaniosis visceral. Al neonato se le realizaron los estudios para diagnóstico de la enfermedad, resultando positivo por microscopía de aspiración de médula ósea. Sin embargo, la falta de signos clínicos y los resultados moleculares negativos plantean la posibilidad de que este no sea un caso de transmisión vertical.

Estos serían los primeros estudios de caracterización molecular a nivel de especie en estos pacientes y en la provincia.

## **Abstract**

Leishmaniasis comprises a set of clinical forms produced by parasites of the genus *Leishmania* that can affect humans and other hosts. In Misiones we can mainly find the cutaneous and visceral form of this pathology. The present work determined, through molecular techniques (PCR-RFLP and sequencing), the etiological agent of a series of human and canine cases, as well as the description of clinical and epidemiological characteristics.

In the canine series only *L. infantum* was found as agent. The human series consisted of cases of visceral leishmaniasis and cases of cutaneous leishmaniasis. The cases of visceral leishmaniasis had as etiologic agent to *L. infantum*, whereas of the 4 cases of cutaneous leishmaniasis *L. braziliensis* the agent was identified in 2 cases and *L. infantum* in 2. Patients included a pregnant woman who was a confirmed case of visceral leishmaniasis. The newborns underwent the studies to diagnose the disease, being positive by microscopy of aspiration of bone marrow. However, the lack of clinical signs and negative molecular results raise the possibility that this is not a case of vertical transmission.

These would be the first studies of molecular characterization at species level in these patients and in the province.

# Tabla de contenidos

Lista de figuras.....	1
Lista de tablas .....	2
Nomenclatura .....	3
<b>CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>4</b>
<b>I.1. Leishmaniosis en Misiones.....</b>	<b>4</b>
I.1.1. Leishmaniosis en Misiones: Manejo de casos.....	4
I.1.2. Estudios realizados en Misiones sobre LV .....	4
I.1.3. Introducción sobre técnicas diagnósticas de LV .....	5
I.1.4. Utilidad de las herramientas moleculares en epidemiología .....	6
<b>I.2. Alcances y definición del problema de investigación .....</b>	<b>8</b>
I.2.1. Revisión sobre la importancia de la identificación de especies .....	9
<b>I.3. Objetivos.....</b>	<b>11</b>
I.3.1. Objetivo General: .....	11
I.3.2. Objetivos Específicos:.....	11
<b>I.4. Justificación .....</b>	<b>12</b>
I.4.1. Justificación epidemiológica .....	12
I.4.2. Importancia genética.....	13
<b>CAPÍTULO II: ANTECEDENTES.....</b>	<b>15</b>
<b>II.1. Formas clínicas.....</b>	<b>15</b>
II.1.1. Leishmaniosis visceral .....	16
II.1.2. Leishmaniosis cutánea .....	17
II.1.3. Leishmaniosis mucocutánea .....	18
II.1.4. Leishmaniosis cutánea difusa .....	19
II.1.5. Leishmaniasis cutánea recidivante o diseminada .....	19
<b>II.2. Taxonomía .....</b>	<b>20</b>
<b>II.3. Morfología .....</b>	<b>21</b>
<b>II.4. Reservorios .....</b>	<b>22</b>
<b>II.5. Ciclo de vida.....</b>	<b>22</b>
<b>II.6. El genoma de Leishmania .....</b>	<b>24</b>
<b>II.7. Respuesta Inmune frente a <i>L. braziliensis</i> .....</b>	<b>25</b>
<b>II.8. La respuesta inmune frente a <i>L. infantum</i>.....</b>	<b>27</b>
<b>II.9. Coinfección VIH-<i>Leishmania</i>.....</b>	<b>28</b>
<b>II.10. Epidemiología de LV .....</b>	<b>29</b>
II.10.1. Epidemiología de LV en Argentina .....	29

II.10.2. Epidemiología de LV en Misiones .....	30
II.11. Epidemiología de LC .....	32
II.11.1. Epidemiología de LC en Argentina .....	32
II.11.2. Epidemiología de la LC en Misiones .....	34
II.12. Diagnóstico .....	34
II.12.1. Diagnóstico clínico de LV en humanos .....	34
II.12.2. Diagnóstico clínico de LC en humanos .....	35
II.12.3. Diagnóstico clínico en canes .....	36
II.13. Técnicas de laboratorio .....	36
II.13.1 Métodos directos .....	36
II.13.2. Técnicas indirectas .....	38
II.14. Caracterización molecular de especies .....	40
II.14.1. PCR-RFLP .....	40
II.14.2. Tipificación por microsatélites (MLMT) .....	41
II.14.3. Electroforesis de isoenzimas (MLEE) .....	41
<b>CAPÍTULO III: CUERPO DE DESARROLLO DEL TRABAJO DE INVESTIGACIÓN</b>	<b>42</b>
III.1. Propuesta metodológica o Metodología de investigación .....	42
III.2. Materiales y métodos .....	42
III.2.1. Área de estudio .....	42
III.2.2. Canes .....	43
III.2.2.1. Poblaciones canina de estudio .....	43
III.2.2.2. Criterio de inclusión de canes .....	43
III.2.2.3. Encuesta epidemiológica canes .....	44
III.2.2.4. Muestras clínicas de canes .....	44
III.2.2.5. Consideraciones éticas con canes .....	44
III.2.3. Humanos .....	45
III.2.3.1. Población de pacientes estudiados .....	45
III.2.3.2. Criterios de inclusión humanos .....	45
III.2.3.3. Encuestas epidemiológicas humanos .....	45
III.2.3.4. Muestras clínicas de humanos .....	46
III.2.3.5. Consideraciones éticas con humanos .....	46
III.2.4. Diagnóstico de laboratorio .....	46
III.2.4.1. Métodos serológicos .....	47
III.2.4.2. Observación microscópica .....	47
III.2.4.3. Métodos moleculares .....	47
III.2.4.3.1. Rehidratación de las muestras en etanol .....	48

III.2.4.3.2. Extracción de ADN de muestras de canes .....	48
III.2.4.3.3. PCR ITS-1 .....	49
III.2.4.3.4. Digestión enzimática (PCR-RFLP).....	49
III.2.5. Procesamiento y análisis de datos .....	50
III.3. Resultados y discusión .....	50
III.3.1. Canes.....	50
III.3.1.1 Datos clínico epidemiológicos de los canes.....	50
III.3.1.2. Resultados de laboratorio en canes .....	52
III.3.2. Humanos.....	56
III.3.2.1. Datos clínico epidemiológicos de los humanos .....	56
III.3.2.2. Resultados de laboratorio de humanos .....	59
III.3.3. Discusión final.....	62
III.4. Conclusiones.....	64
III.5. Referencias Bibliográficas .....	65
<b>CAPÍTULO IV: PROPUESTAS DE TRABAJOS FUTUROS Y/O</b>	
<b>RECOMENDACIONES .....</b>	<b>81</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>82</b>
<b>ANEXO I. Ficha clínica de Perros. ....</b>	<b>82</b>
<b>ANEXO II. Modelo de consentimiento informado utilizado en el muestreo de Puerto</b>	
<b>Iguazú.....</b>	<b>83</b>
<b>ANEXO III. Modelo de consentimiento informado utilizado en el IMuSA. ....</b>	<b>84</b>
<b>ANEXO IV. Ficha clínica de pacientes humanos.....</b>	<b>85</b>
<b>ANEXO V: Modelo de consentimiento informado utilizado en el Hospital Escuela de</b>	
<b>Agudos “Ramón Madariaga” para estudios de LV. ....</b>	<b>86</b>
<b>ANEXO VI: Test inmunocromatográfico rápido basado en el antígeno recombinante K39</b>	
<b>(ICT).....</b>	<b>88</b>
<b>ANEXO VII. Protocolo de Inmunofluorescencia indirecta.....</b>	<b>89</b>

## **Lista de figuras**

<b>Figura 1.</b> Ubicación taxonómica del género <i>Leishmania</i> aceptada actualmente .....	20
<b>Figura 2.</b> Tinción con Giemsa de protozoos del género <i>Leishmania</i> .....	21
<b>Figura 3.</b> Ciclo de vida de <i>Leishmania</i> .....	24
<b>Figura 4.</b> Ubicación de la Provincia de Misiones en la región .....	43
<b>Figura 5.</b> Signos clínicos observados en perros y sus frecuencias en porcentaje .....	52
<b>Figura 6.</b> Patrón de bandas resultado de la digestión enzimática .....	53
<b>Figura 7.</b> Patrones de bandas utilizados como referencia pertenecientes a varias especies .....	53
<b>Figura 8.</b> Distribución porcentual de los positivos de las técnicas de laboratorio utilizadas en perros ....	55
<b>Figura 9.</b> Distribución porcentual de los pacientes y sus localidades .....	57
<b>Figura 10.</b> Signos y síntomas observados en los pacientes estudiados .....	58
<b>Figura 11.</b> Distribución porcentual de los positivos de las técnicas de laboratorio utilizadas en humanos.....	59
<b>Figura 12.</b> Resultados positivo y negativo de ICT .....	88
<b>Figura 13.</b> Resultados positivo y negativo de la Inmunofluorescencia indirecta .....	90

## **Lista de tablas**

**Tabla 1.** Resultados de las pruebas de laboratorio por can estudiado .....55

**Tabla 2.** Resultados de las técnicas de laboratorio en cada paciente .....62

## **Nomenclatura**

ADNk: Ácido desoxirribonucleico del kinetoplasto.

AFLP: Amplificación de fragmentos polimórficos.

IFI: Inmunofluorescencia indirecta.

IMuSA: Instituto Municipal de Sanidad Animal.

ICT: Test inmunocromatográfico rápido basado en el antígeno recombinante K39.

ITS-1: Espaciador transcripcional interno 1.

LC: Leishmaniosis cutánea.

LCan: Leishmaniosis canina.

LV: Leishmaniosis visceral.

LVA: Leishmaniosis visceral antroponótica.

LVZ: Leishmaniosis visceral zoonótica.

MLEE: Electroforesis de isoenzimas.

MLMT: Tipificación por microsátélites.

OMS: Organización mundial de la salud.

PAMO: Punción aspiración de médula ósea.

pb: Pares de bases.

PCR: Reacción en cadena por la polimerasa.

PCR-RFLP: Polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción.

RAPDs: Amplificación aleatoria de ADN polimórfico.

Taq polimerasa: Polimerasa de *Thermus aquaticus*.

VIH: Virus de la inmunodeficiencia humana.

# **CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN**

## **I.1. Leishmaniosis en Misiones.**

### **I.1.1. Leishmaniosis en Misiones: Manejo de casos.**

Este trabajo propone una metodología para la identificación de especies de *Leishmania* mediante técnicas de biología molecular. Generalmente, las muestras de los casos sospechosos de leishmaniosis cutánea (LC) o leishmaniosis visceral (LV) son sometidas a evaluación microscópica (frotis), método patrón para diagnóstico de infección por *Leishmania* spp.

Una vez diagnosticado el caso no se realizan estudios para determinar la especie infectante.

### **I.1.2. Estudios realizados en Misiones sobre LV**

En el 2006 se realizó en la ciudad de Posadas un estudio piloto de leishmaniosis visceral canina (LCan), el cual encontró que el 57,8% resultó positivo por alguna de las pruebas empleadas. En ese estudio el 75% de los animales vivían en condiciones de hacinamiento (perreras), lo que supone un sesgo para el estudio, pero esta información confirmó el foco emergente de LCan en Posadas (Cruz y col., 2010).

En el 2009 se llevó a cabo un estudio de prevalencia de leishmaniosis en canes de la ciudad de Posadas, el cual se realizó en base a un muestreo aleatorio simple, y reveló una prevalencia del 22,3% de LCan en los perros de la ciudad (Acosta, 2013).

En el 2011 se llevó a cabo en la ciudad de Puerto Iguazú un estudio de la situación de la LCan en esa ciudad y se realizó un primer diagnóstico de este problema de salud pública. En este estudio se encontró una prevalencia de LCan del 5,26% (Acosta y col., 2015).

En el 2013 se realizó en Bonpland un estudio para estimar la seroprevalencia de *L. infantum* en canes de este municipio. Se estudiaron mediante Test inmunocromatográfico rápido basado en el antígeno recombinante K39 (ICT) e Inmunofluorescencia indirecta (IFI) 99 canes distribuidos aleatoriamente en cuatro estratos del centro del municipio. En este estudio se encontró que el 22,2% de los canes incluidos presentaban reactividad para alguna de las técnicas utilizadas (Gutiérrez y col., 2013).

### I.1.3. Introducción sobre técnicas diagnósticas de LV

El diagnóstico de LV es complejo debido a la falta de signos clínicos patognomónicos, esto quiere decir, signos que se correlacionan fuertemente con esta enfermedad. Si bien hay signos o síntomas que aparecen muy frecuentemente en esta enfermedad en humanos, como la fiebre, no son indicadores específicos, y no alcanzan para diferenciarla de la malaria, esquistosomiasis u otra infección sistémica. Lo mismo ocurre en canes.

A su vez, hay signos que tienen una fuerte correlación con esta patología, pero que aparecen en baja frecuencia, como la esplenomegalia en humanos o la onicogrifosis en perros (OMS, 2010). Por esta razón son necesarias las pruebas de laboratorio.

Las pruebas serológicas basadas en IFI, enzimoimmuno ensayo o Western Blot han mostrado eficiencia en el diagnóstico de la enfermedad en la mayoría de los estudios, pero requieren un equipo que no está adaptado al uso en campo (Boerlaert y col., 2007; OMS, 2010).

La aglutinación directa y el ICT fueron desarrollados específicamente para el uso en campo y han mostrado una buena precisión diagnóstica en las zonas endémicas (Boerlaert y col., 2007; OMS, 2010).

El ICT es un test fácil, rápido, barato y da resultados reproducibles y por lo tanto pueden ser de utilidad para el diagnóstico precoz de la LV tanto en zonas periféricas como centrales. Estas técnicas se desarrollaron para mejorar el acceso de los pacientes con LV a un diagnóstico, inclusive los de áreas rurales pobres, que es donde vive la mayoría de ellos. Esta técnica es específica para detectar anticuerpos contra el complejo *Leishmania donovani* (Boerlaert y col., 2007; OMS, 2010).

Actualmente los estudios moleculares han demostrado ser útiles para un diagnóstico rápido, temprano, de alta sensibilidad y especificidad (Cortes y col., 2004; Cruz y col., 2013). Esta técnica también es recomendada por el Ministerio de Salud de la Nación para el diagnóstico de LV (Ministerio de Salud de la Nación, 2010). El espaciador transcripcional interno 1 (ITS-1) es un blanco genético eficaz, este se encuentra en el operón ribosomal de *Leishmania*, es altamente repetitivo y capaz de amplificar todas las especies de *Leishmania*. Esta región es suficientemente conservada para realizar una amplificación por PCR y a la vez presenta suficiente polimorfismo para facilitar

la tipificación de especie. Se encuentra en la bibliografía numerosas recomendaciones para la utilización de dicha región debido a su alta variabilidad, lo que facilita su posterior identificación de especie (Aransay y col., 2000; Schönian y col., 2003; Cruz y col., 2013).

#### **I.1.4. Utilidad de las herramientas moleculares en epidemiología**

La elección de método de genotipificación depende no solo del poder discriminatorio y de las aplicaciones epidemiológicas, sino además de sus características operacionales (Botilde y col., 2006).

En los focos endémicos de LV del mediterráneo, la principal zimodema encontrada para *Leishmania infantum* es MON-1. En estos focos, el bajo poder discriminativo de la técnica Electroforesis de isoenzimas (MLEE) impide a los investigadores encontrar correlaciones entre características clínicas, preferencia entre hospederos (perros, niños normo-inmunes y personas con inmunodeficiencias), y grupos particulares de variantes genéticas (Bulle y col., 2002).

En otro estudio se encontró que la técnica de Polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción (PCR-RFLP) del ADN del cinetoplasto (ADNk) combinado Tipificación por microsatélites (MLMT) tiene un poder de resolución mayor y reveló ser más adecuado para identificación genética que la Amplificación aleatoria de ADN polimórfico (RAPDs) o una PCR-RFLP de genes antigénicos. Además, los resultados del análisis que realizaron sobre diferentes muestras de la Península Ibérica, apuntaban que esas poblaciones de parásitos son homogéneas con una dispersión muy reciente. Sin embargo, realizar ambas tareas resulta más laborioso y requiere mayor tiempo para la obtención de resultados (Kuhls y col., 2008).

En una revisión sobre MLMT, se menciona tres estudios donde hubo asociación entre los perfiles de MLMT y las características clínicas de los pacientes estudiados, dos en *L. infantum* y uno en *Leishmania tropica*; en los demás estudios mencionados de la recopilación no se encontró asociación. Tampoco se encontró asociación entre los perfiles y la resistencia a drogas. Adicionalmente discuten la posibilidad de diferenciar con esta herramienta infecciones nuevas de recaídas relacionadas a fallo terapéutico. Esto sería

posible siempre y cuando la nueva infección se produzca con una cepa de genotipo distinto (Aluru y col., 2015).

La caracterización de variantes genéticas por MLMT demuestra que un amplio espectro de cuadros clínicos pueden obtenerse de variantes genéticas estrechamente relacionadas, y en general las manifestaciones clínicas de pacientes infectados no puede predecirse mediante MLMT (Laurent y col., 2007; Aduadi y col., 2011; Subba y col., 2012; Aluru y col., 2015).

Se ha utilizado MLMT para estudiar variantes genéticas en pacientes con fallo terapéutico con el fin de esclarecer si genotipos específicos se asocian con fallo terapéutico. Se han llevado a cabo estudios con variantes genéticas de *Leishmania donovani* y *L. braziliensis* resistentes a los antimoniales pentavalentes. No se encontró asociación entre variantes genéticas y resistencia a drogas o al cuadro clínico que producían (Laurent y col., 2007; Aduadi y col., 2011; Subba y col., 2012; Jeddi y col., 2014; Aluru y col., 2015).

En un estudio realizado en el 2010, donde se compararon muestras de distintos focos de América del sur mediante MLMT, se encontró que todos los aislados de *L. infantum* estudiados se correspondían con MON-1 presentando alta homogeneidad. Pero, no se observó una correlación estricta entre los cuadros clínicos y la asignación de la población (Kuhls y col., 2011).

## **I.2. Alcances y definición del problema de investigación**

La LV es la forma clínica más grave de Leishmaniosis y en ausencia de tratamiento resulta mortal (OMS, 2015). Según la OMS, esta enfermedad está ligada a factores como condición socioeconómica, desnutrición, cambios climáticos y ambientales, movimientos poblacionales, inmunosupresión y, en algunas zonas, a la rápida urbanización o establecimientos de nuevos asentamientos. La distancia que deben recorrer los pacientes es descrita por la OMS como una de las causas principales de las limitaciones del acceso al diagnóstico y tratamiento (OMS, 2015).

La evolución de la enfermedad depende de la interacción entre el parásito y el sistema inmune del hospedador y las intervenciones sanitarias. Por tanto, es necesario conocer la especie del parásito infectante, su virulencia, si produce síntomas graves o leves, si presenta resistencia a drogas, y otras informaciones que podrían estar disponible lo que permitiría tener un pronóstico definido (Herwaldt, 1999; Murray, 2005).

Actualmente en nuestra región no es posible diferenciar entre una recaída o fallo terapéutico y una reinfección. En un estudio se logró distinguir las reinfecciones de las recaídas en ciclos de enfermos coinfectados por Leishmania/VIH mediante técnicas moleculares (PCR-RFLP), una información de suma importancia para los médicos al momento de elegir el tratamiento adecuado de la enfermedad (Morales, 2004). Esto resulta de gran importancia epidemiológica debido a que ciertos casos en los que se asume que el paciente se re infecta (se expone a una nueva introducción del parásito a su organismo), podría tratarse de un caso de un fallo terapéutico, esto podría deberse a que el parásito es resistente al tratamiento, al abandono del tratamiento u otros factores. Esto sería posible determinar con estas técnicas de biología molecular y genética (Morales, 2004).

Así, también podría estar ocurriendo que en áreas donde estas enfermedades son endémicas, la tasa de reinfección puede ser más alta que la esperada. Esto puede llevar a los médicos a pensar en una recaída cuando de hecho, el paciente ha adquirido una infección nueva. Por lo tanto, la incapacidad para distinguir recaídas de reinfecciones puede ser un

impedimento importante para la evaluación de protocolos de tratamiento de Leishmaniosis (Morales y col., 2002; Botilde y col., 2006).

Al ser los canes el reservorio urbano de esta parasitosis, es importante poder detectar los casos y tomar medidas que establece el organismo de salud de cada región. Sin embargo, existen inconvenientes al momento de detectar los casos de LCan, debido a que las técnicas de laboratorio deben aplicarse sobre los casos sospechosos, y el cuadro clínico es de difícil interpretación. Esto se debe a que no existen signos específicos (patognomónicos).

Se pueden presentar determinados signos inespecíficos que son de alerta para los veterinarios, como alopecia y costras especialmente alrededor de los ojos, seborrea, dermatitis, úlceras que no cicatrizan, onicogriposis, signos oculares como queratoconjuntivitis y uveítis, pérdida de apetito, astenia, adenomegalia, El avance de la enfermedad puede llevar a: fiebre, diarrea, hepato-esplenomegalia, fallo renal y sangrado espontáneo, signos que sin consulta con el veterinario pueden conducir al óbito (Ministerio de Salud de la Nación, 2010).

### **I.2.1. Revisión sobre la importancia de la identificación de especies**

En uno de sus trabajos Schonian y colaboradores, discuten acerca de la caracterización molecular de especies de *Leishmania* en infecciones clínicas y su importancia, debido a que diferentes especies pueden requerir distintos regímenes de tratamientos. Además, esta información es de valor en estudios epidemiológico, donde conocer la distribución de las especies de *Leishmania* en humanos, reservorios y vectores, es un prerrequisito para el diseño apropiado de medidas de control (Schonian y col., 2003). A su vez, Montalvo y colaboradores agregan que el monitoreo epidemiológico y el manejo de los reservorios y/o vectores recae en una discriminación precisa de los parásitos involucrados (Montalvo y col., 2012).

Se han estudiado casos de resistencia a las drogas de primera línea contra LV, por ejemplo resistencia contra la paramomicina desarrollada por ciertas especies de *Leishmania*, debido a cambios en la membrana que reducen la absorción. Este autor recomienda “tener información acerca de la endemidad de las especies de *Leishmania*, el estado inmunológico y

nutricional de la población, el nivel y patrón de resistencia a drogas del parásito” (Cruz y col., 2006a).

Algunas cepas de *L. infantum* pueden causar LC sin afectar los órganos internos, y el tipo de lesiones cutáneas, la eficacia del tratamiento, la rapidez en la cicatrización y otros factores varían según las especies (Universidad de Iowa, 2010).

### **I.3. Objetivos**

#### **I.3.1. Objetivo General:**

Identificar las especies de *Leishmania* en una serie de canes y humanos diagnosticados como casos sospechosos de leishmaniosis en Misiones.

#### **I.3.2. Objetivos Específicos:**

- Poner a punto la técnica de PCR para identificar las especies de *Leishmania*.
- Describir características clínicas y epidemiológicas de los pacientes humanos y caninos estudiados.

## **I.4. Justificación**

### **I.4.1. Justificación epidemiológica**

La zona norte de la provincia de Misiones es históricamente endémica para LC. Por esta razón, precisamos disponer de herramientas que permitan un diagnóstico preciso y rápido, que identifique la especie infectante para poder determinar si se trata de LV por *L. infantum* o de la visceralización de otra especie de *Leishmania* y diseñar el tratamiento adecuado (Sanchez-Saldaña, 2004).

Actualmente poco se sabe sobre la introducción de la leishmaniosis en la provincia de Misiones, aunque el primer caso humano apareció en el 2006, el vector ya había sido reportado en el 2001 y la situación de los reservorios no fue estudiada hasta el 2006, tras aparecer el primer caso humano (Salomón y col., 2001; Cruz y col., 2010).

En varios estudios realizados recientemente se ha encontrado que la especie circulante predominante en canes y asociado a casos humanos de LV en las ciudades de Posadas y Puerto Iguazú es *L. infantum*. Sin embargo, solo se han realizado estudios en perros de estas dos ciudades (Acosta, 2013; Acosta y col., 2015).

Recientemente se han realizado estudios a partir de muestras clínicas de canes de Posadas que identificaron la especie *L. infantum* y además permitieron la primera descripción de dos variantes génicas para este parásito en la ciudad de Posadas, Misiones (Acosta, 2013; Barroso y col., 2015).

La información sobre el comportamiento del parásito, las especies circulantes y su asociación con variables epidemiológicas en humanos y canes permitirían diseñar acciones de mayor eficacia en el control atendiendo a las condiciones locales (Talmi-Frank y col., 2010).

Esta información permitiría conocer la historia natural del parásito en la provincia, y sería de gran utilidad para comprender la distribución y la circulación de la especie en diferentes reservorios de la región (Cortés y col., 2011).

El conocimiento de las especies de LV es importante cuando se identifica la emergencia de esta enfermedad y posteriormente la región se torna endémica para esta parasitosis, hecho ocurrido en Misiones hace 10 años, ya que el primer caso autóctono se reportó a principios del 2006 en la ciudad de Posadas (Salomón y col, 2008; Salomón y col., 2011).

La información sobre especies circulantes de *Leishmania* sería de importancia epidemiológica para realizar un análisis geográfico de la enfermedad, contribuyendo a determinar la magnitud de su distribución así como también identificar la especie en diferentes reservorios a fin de establecer medidas de control.

Un ejemplo de ello fue un brote de LC acontecida en el municipio de Fuenlabrada (Madrid, España) donde fueron afectadas 560 personas desde el 2009. Madrid es una zona endémica para leishmaniosis con una tasa estable de LC 0,2 por 100.000 habitantes/año (Aguado, y col., 2013; Horrillo y col., 2015). Las herramientas moleculares permitieron determinar que la superpoblación de liebres (Molina y col., 2012) y ratones silvestres (Jiménes y col., 2014) en las zonas verdes fue uno de los condicionantes del aumento de casos de LC debida a la especie *L. infantum* (Chicharro y col., 2012).

El hecho de que *L. infantum* haya causado el brote de LC mencionado arriba, resalta la importancia epidemiológica de la identificación de especies para conocer el agente etiológico causante del brote epidémico.

Por las razones mencionadas, es necesario desarrollar herramientas con alta sensibilidad y especificidad para la identificación de especies de *Leishmania*. Identificar y tratar (si corresponde) a todos los actores presentes en el ciclo de vida de la leishmaniosis en cada zona en particular sería de gran ayuda en el control de la enfermedad.

#### **1.4.2. Importancia genética**

El estudio de los perfiles enzimáticos mediante la técnica de zimodemas, y posteriormente estudios genéticos, hizo posible determinar que *L. infantum* y *L. chagasi* en realidad son de la misma especie. He aquí la importancia epidemiológica del estudio de las especies de este género (Mauricio y col., 2000).

Varias especies de *Leishmania* han sido aisladas y caracterizadas molecularmente en perros de América del Sur, entre las que se incluyen *L. amazoniensis*, *L. braziliensis*, *L. colombiensis*, *L. infantum*, *L. mexicana*, *L. panamensis*, *L. guyanensis*, *L. peruviana* y *L. pifanoi*. Esta diversidad acentúa la necesidad de mantener la vigilancia epidemiológica de las especies que infectan canes en la región, para prever futuros ingresos de otras especies y posibles brotes de casos humanos (Dantas-Torres, 2009).

Las distintas especies de *Leishmania*, indistinguibles morfológicamente, producen lesiones que evolucionan de forma diferente. Se ha observado que algunos pacientes desarrollan una enfermedad muy severa, que puede incluso conducir a la muerte, mientras que otros no presentan complicaciones graves. Esta diferencia en la patogenicidad podría estar relacionada con las variaciones genéticas del parásito (Segatto y col., 2011).

La OMS propone como prioridad la investigación de los aspectos epidemiológicos y patrones de distribución de las leishmaniosis. También prioriza líneas de investigación sobre el diagnóstico, tratamiento y prevención, sugiriendo investigar mejores técnicas diagnósticas para detectar *Leishmania spp.* y herramientas para monitorear la resistencia a drogas y evaluar la cura (OMS, 2015).

## CAPÍTULO II: ANTECEDENTES

Las leishmaniosis engloban a un grupo de enfermedades parasitarias de transmisión vectorial, caracterizadas por su diversidad y complejidad, que afectan tanto al ser humano como a otros vertebrados. El perro es el principal reservorio en medio urbano. Otros reservorios son: zorros, lince, coatíes, ratas, comadrejas, osos hormigueros, entre otros. Están causadas por diferentes especies de protozoos flagelados del género *Leishmania*, que son transmitidos por picaduras de las hembras hematófagas de alrededor de 93 especies de flebotomos; género *Phlebotomus* en el Viejo Mundo (África, Asia y Europa), y *Lutzomyia* en el Nuevo Mundo o América (OMS, 2010, Ministerio de Salud de la Nación, 2010).

### II.1. Formas clínicas

Las manifestaciones clínicas de la infección por *Leishmania* en humanos son muy diversas en cuanto a forma y severidad, y van a depender de la interacción entre la especie de parásito que la causa y el sistema inmune del hospedador (Herwaldt, 1999; Murray y col., 2005). Esta variabilidad en la expresión de la enfermedad en humanos también se ha demostrado en animales infectados naturalmente y, especialmente, en animales infectados experimentalmente (Alvar y col., 2004; McMahon-Pratt y Alexander, 2004). Clínicamente la enfermedad se puede agrupar en dos manifestaciones principales: **Leishmaniosis cutánea (LC)** y **Leishmaniosis visceral (LV)** o **Kala-azar**, si bien hay una serie de evoluciones tórpidas que conducen a otros cuadros clínicos: **Leishmaniosis cutánea recidivante o diseminada (LCR)**; **Leishmaniosis cutánea difusa (LCD)**, **Leishmaniosis mucocutánea (LMC)** y **Leishmaniosis dérmica post-kala-azar (LDPK)**.

Sin embargo, todas las presentaciones asociadas a la infección por *Leishmania* comparten tres características comunes: i) macrófagos residentes en los tejidos infectados con multiplicación intracelular del parásito; ii) respuesta inmunoinflamatoria del hospedador que regula la expresión y resultado de la enfermedad; y iii) persistencia de la infección tisular. (Zwingenberger y col., 1990; Zambrano-Villa y col., 2002; Awasthi y col., 2004;

Liese y col., 2008). Entre el 80 y el 90 % de las infecciones humanas cursan de manera subclínica o asintomática (Badaró y col., 1986; Albrecht, 1998).

### II.1.1. Leishmaniosis visceral

La LV es causada por parásitos del complejo *L. donovani* (*L. donovani*/*L. infantum*) y si no es tratada posee una tasa de mortalidad del 75-95%. *L. donovani* es la especie causante de Leishmaniosis visceral antroponótica (LVA) o “Kala-azar” en el Subcontinente Indio, y África oriental (tanto en adultos como en niños). *L. infantum*, causa la llamada Leishmaniosis visceral zoonótica (LVZ) en la cuenca Mediterránea, norte de África, Oriente Medio, Asia central, China y América Latina.

Aunque otras especies pueden ser ocasionalmente viscerotrópicas (*L. trópica*, *L. amazonensis* o *L. braziliensis*) (Guerin y col., 2002).

La diferencia entre LVA y LVZ se debe a que epidemiológicamente se pueden diferenciar dos tipos de ciclos considerando la presencia o no de reservorios animales. La LVZ se caracteriza por presentar un ciclo zoonótico donde juegan un papel importante reservorios mamíferos, tanto domésticos (el perro principalmente) como silvestres (otros cánidos y roedores). En cambio, en la LVA el humano se comporta como reservorio principal de la enfermedad.

El parásito infecta principalmente a los macrófagos de órganos hematopoyéticos (hígado, bazo y médula ósea), causando graves disfunciones orgánicas. Resulta una infección generalizada del sistema retículoendotelial con episodios irregulares de fiebre, pérdida sustancial de peso, anemia, hepatomegalia, y esplenomegalia. Leucopenia, trombocitopenia e hipergammaglobulinemia también son características. Pudiéndose observar en los casos más avanzados caquexia, fallo multisistémico, hemorragia derivada de la trombocitopenia, susceptibilidad a infecciones secundarias, y muerte. (Herwaldt, 1999; Solbach y Laskay, 2000; Desjeux, 2001; Desjeux, 2004). Las adenopatías pueden estar presentes, y en algunos casos es la única manifestación clínica. Cabe destacar que todos los agentes causales de LV pueden dar lugar también a manifestaciones cutáneas.

En áreas endémicas, la enfermedad tiende a ser crónica, afectando principalmente a niños entre 0 y 4 años. En Brasil, las infecciones

asintomáticas o las formas leves de la enfermedad son más comunes que las manifestaciones completas (OMS, 2010).

La desnutrición y la inmunosupresión, especialmente la causada por el VIH, han demostrado ser factores que predisponen a la enfermedad. La coinfección con VIH cambia el cuadro clínico descrito anteriormente, tanto en la LV como en las otras formas de leishmaniosis (OMS, 2010). Desde el advenimiento del VIH, trasplantes, quimioterapia, han aumentado el número de casos adultos asociado a inmunosupresión. En algunos países se reportan mayor cantidad de casos en individuos masculinos (OMS, 2010).

### II.1.2. Leishmaniosis cutánea

La LC, también se denomina “botón de oriente” (cuenca Mediterránea), “uta” (Perú), “úlceras de los chicleros” (México), o “pian bois” (Guayana). Comienza generalmente con una pápula localizada en la zona de inoculación de los promastigotes, que se convierte en un nódulo y que se puede ulcerar en 1 a 3 meses (Dowlati, 1996; Machado y col., 2002; Magill, 2005). A pesar de que algunas manifestaciones clínicas son más frecuentemente asociadas con una especie particular o algún subgénero, ningún cuadro clínico es único para una especie. Además, una gran parte de las infecciones son asintomáticas, aunque esto varía dependiendo de la región (OMS, 2010). Las lesiones aparecen principalmente en cara, brazos y piernas, pudiendo curar espontáneamente en un tiempo comprendido entre dos meses y un año. Sin embargo, si ocurren sobreinfecciones secundarias, estas pueden evolucionar a lesiones desfigurantes que dejan marcas permanentes en la piel y originan una grave discapacidad (Roberts y Janovi, 1995; Hepburn, 2003). Esta manifestación la originan unas 17 especies diferentes de *Leishmania* en todo el mundo, principalmente *L. major*, *L. tropica*, y *L. aethiopica* (denominadas comúnmente como LC del Viejo Mundo); *L. infantum* (Regiones del Mediterráneo, Mar Caspio y América Latina); y *L. mexicana*, *L. amazonensis*, *L. braziliensis*, *L. panamensis*, *L. peruviana*, y *L. guyanensis* (LC del Nuevo Mundo) (Reithinger y col., 2007).

Las lesiones causadas por *L. mexicana* suelen curar espontáneamente a los 3 o 4 meses, mientras que las lesiones causadas por *L. braziliensis*, *L. panamensis*, *L. guyanensis* y *L. peruviana* puede curar sin tratamiento luego de

6 meses. Pueden aparecer lesiones secundarias mucosas o cutáneas; las manifestaciones mucosas en general están asociadas a *L. braziliensis* y *L. panamensis*, pero pueden ser causadas por otras especies (OMS, 2010).

Puede ocurrir casos atípicos de LC causados por *L. infantum*, que es la especie generalmente asociada a LV. Las lesiones son nódulos localizados o placas que están dentro de las manifestaciones clínicas causadas por las especies dermatrópicas del nuevo mundo. Los casos de LC por *L. infantum* generalmente se encuentran en América central, y ocurre en áreas endémicas para LV, entre niños jóvenes y jóvenes adultos, mientras que LV ataca principalmente a niños menores de 5 años (OMS, 2010).

### **II.1.3. Leishmaniosis mucocutánea**

La LMC es denominada comúnmente como “espundia”. A partir de una lesión cutánea primaria, puede haber diseminación metastásica del parásito a las mucosas que conlleva a la destrucción del cartílago y tejidos blandos (Roberts y Janovi, 1995; Hepburn, 2003). Es frecuente la linfadenopatía local (OMS, 2010). Las lesiones nasales siempre están presentes, y comienza con eritema y ulceraciones en los orificios nasales, causando destrucción progresiva de la cavidad oronasal llevando a la obstrucción de las fosas nasales y posterior perforación del septo con colapso y ampliación de la nariz (“nariz de tapir”) pudiendo producir una desfiguración notable (OMS, 2010).

Inicialmente se observan lesiones inflamatorias destructivas con posterior necrosis de los labios, nariz, paladar blando y cuerdas vocales que pueden obstruir la faringe o laringe (Franke y col., 1994). La LMC no suele curar espontáneamente. Infecciones bacterianas secundarias aparecen con frecuencia, neumonía intercurrente es la causa más común de muerte (OMS, 2010).

Aunque está relacionada con las especies de *Leishmania* que causan LC en el Nuevo Mundo (*L. braziliensis*, *L. panamensis*, y *L. guyanensis* principalmente) y (*L. tropica*) en el Viejo Mundo, también hay descripciones esporádicas por *L. donovani*, *L. major* (Reithinger y col., 2007) y en pacientes inmunocomprometidos por *L. infantum* (Murray y col., 2005).

El término leishmaniasis mucocutánea es correctamente aplicado únicamente en la forma clínica presente en las Américas, la mayoría de los

casos son reportados en Bolivia, Brasil y Perú. Es característica sobresaliente de las especies que causan LMC que causan metástasis a los tejidos mucosos de la boca y tracto respiratorio superior por diseminación hemática o vía linfática. Se ha reportado condiciones similares causadas por otras especies de *Leishmania* en pacientes inmunosuprimidos (OMS, 2010).

Estudios realizados en Brasil han mostrado que la LMC puede presentarse varios meses luego de la lesión cutánea e inclusive 20 o más años después. Hombres jóvenes migrantes desnutridos son de especial riesgo. Otros factores de riesgo incluyen el sitio de la lesión primaria, lesiones primarias múltiples o grandes, y el tiempo de cicatrización de la LC primaria (OMS, 2010).

#### **II.1.4. Leishmaniosis cutánea difusa**

La LCD está caracterizada por lesiones diseminadas lepromatosas o acneiformes que no se ulceran, y que se asocian a estados inmunes anérgicos frente a *Leishmania* (Barral y col., 1995). Es causada por *L. aethiopica* en el viejo mundo y por *L. mexicana* y *L. amazonensis* en el nuevo mundo. Se caracteriza por máculas, pápulas, nódulos o placas cutáneas ampliamente diseminadas o por infiltración difusa de la piel, especialmente en superficies extensoras de las extremidades y en la cara, donde el engrosamiento de las cejas y las orejas lóbulos pueden parecerse a la lepra lepromatosa. No aparecen ulceraciones. La implicación mucosa está confinada a los bordes de las fosas nasales o labios. La inmunosupresión asociada a la leishmaniosis cutánea difusa causada por otra especie de *Leishmania* puede ocurrir en coinfección con VIH o en personas con otras formas de inmunosupresión (por ejemplo pacientes trasplantados). Pueden aparecer manifestaciones atípicas, como ulceraciones (OMS, 2010).

Esta forma de la enfermedad no cura espontáneamente y los relapsos son frecuentes luego del tratamiento. Inicialmente, la enfermedad responde al tratamiento estándar, pero las recaídas no (OMS, 2010).

#### **II.1.5. Leishmaniasis cutánea recidivante o diseminada**

Se trata de una forma cutánea crónica debida generalmente a *L. tropica*, aunque raramente, también ha sido descrita en el Nuevo Mundo causada por

las especies del subgénero *Viannia* (Oliveira-Neto y col., 1998; Calvopina y col., 2006), y por *L. amazonensis* (Bittencourt y col., 1993). Se ha descrito en asociación con *L. braziliensis*, *L. panamensis*, *L. guyanensis* y *L. amazonensis* (OMS, 2010). Presenta numerosas lesiones extensas, papulares y/o nodulares o ulceradas que aparecen después de la cura clínica, crecen y tienden a curar en el centro, pudiendo aparecer nuevas pápulas alrededor de la lesión principal, que persisten durante varios años.

Más de 20 y hasta cientos de lesiones cutáneas pueden ocurrir con o sin afectación de la mucosa. La respuesta de hipersensibilidad de tipo retardado a antígeno de *Leishmania* y respuesta de anticuerpos están intactos, y las lesiones responden parcialmente al tratamiento con medicamentos antimoniales y miltefosina (OMS, 2010).

## II.2. Taxonomía

Dentro del género *Leishmania* se describieron dos subgéneros en función del sitio de reproducción en el tracto digestivo del vector. El subgénero *Leishmania* fue descrito por Saf'janova, y su característica es que los parásitos se desarrollan en la parte superior media del aparato digestivo del vector (supra pilórico); mientras que el subgénero *Viannia* (descrito por Lainson y Shaw) necesita una maduración adicional en la región final del sistema digestivo de los dípteros (peripilórica). En la Figura 1 se observa la clasificación propuesta por Cavalier-Smith en 1998, aceptada actualmente (Saf'janova, 1982; Lainson y Shaw, 1987; Lainson y Shaw 1989).

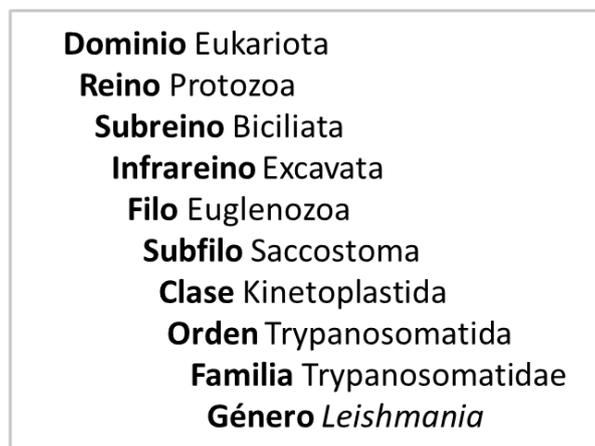


Figura 1. Ubicación taxonómica del género *Leishmania* aceptada actualmente (Cavalier-Smith, 1998).

### II.3. Morfología

Los protozoos del género *Leishmania* son digénico, es decir que presenta dos morfologías a lo largo de su ciclo biológico: una intracelular o amastigote (cuerpo de Leishman-Donovan), forma que adopta en las células del sistema retículo-endotelial del hospedador vertebrado y una forma extracelular o promastigote que se encuentra generalmente en el hospedador invertebrado o en cultivos "in vitro" (Chang, 1956; González y col., 1976). En la Figura 2 se pueden observar ambos estadios del parásito.

El amastigote es inmóvil (sin flagelo), de forma ovalada. En el citoplasma se observa un núcleo esférico, voluminoso, generalmente excéntrico y un kinetoplasto próximo al núcleo de aspecto bacilar (Chang, 1956; González y col., 1976).

El promastigote es fusiforme, extracelular y móvil. Es de mayor tamaño que el amastigote. Posee un largo flagelo libre en la región anterior, un núcleo ovalado situado en la región central y un kinetoplasto bastoniforme (Chang, 1956; González y col., 1976).

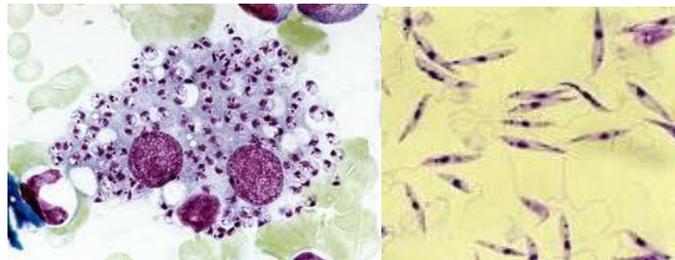


Figura 2. Tinción con Giemsa de protozoos del género *Leishmania*. Izquierda, amastigotes de *Leishmania* spp. Derecha, promastigotes de *Leishmania* spp.

Son parásitos intracelulares obligados. Algunas especies son viscerotrópicas, produciendo las variantes viscerales de la enfermedad (*L. infantum*, *L. donovani*, etc.) y otras son dermatrópicas, responsables de las variantes cutáneas (*L. braziliensis*, *L. tropica*, etc.). Se han descrito casos en los que especies que se asocian con las variantes cutáneas producen una visceralización de la enfermedad, con un cuadro muy similar al de LV; así como también casos en los que especies asociadas a la forma visceral de la enfermedad dermatizan y producen un cuadro de LC (OMS, 2010; Khatri y col., 2016; Ramírez y col., 2016; Diatta y col., 2016; Taquin y col., 2016).

A su vez, la co-infección *Leishmania*/VIH aumenta el riesgo de la visceralización de la enfermedad y afecta su epidemiología. El reporte de

coinfecciones ha aumentado en los últimos años, llegando en Brasil, de un 2,5% (en el 2005) a un 6,6% en el 2011, y en Etiopía pasó del 19% a 34% solo entre el 1998 y 1999 (Cruz y col., 2010; OMS, 2015).

#### **II.4. Reservorios**

Se define como reservorio de una enfermedad a aquel animal que garantiza tanto la existencia del agente etiológico como su posterior transmisión (OMS, 2010). Por regla general, en las leishmaniosis zoonóticas existe un ciclo selvático mantenido entre un reservorio salvaje y los flebotomos del entorno. Por sinantropía, bien del reservorio o del vector, el ciclo se aproxima al ámbito peridoméstico para finalmente arraigarse entre los animales y vectores doméstico (OMS, 2010).

Los perros domésticos (*Canis familiaris*) son los principales reservorios de estos parásitos, debido al elevado número de individuos presentes en el nicho ecológico y a su estrecha relación con el ser humano (Alvar y col., 2004; Alvar y col., 2006; OMS, 2010). El ciclo selvático, es mantenido principalmente por cánidos silvestres como el zorro común (*Vulpes spp*), zorro de monte (*Cerdocyon thous*), osito lavador (*Procyon cancrivorus*), entre otros (OMS, 2010). También han sido descritos otros carnívoros silvestres como el hurón (Sobrino y col., 2008), aunque el coatí de cola anillada (*Nasua nasua*) se ha encontrado infectado ocasionalmente (OMS, 2010).

Se ha descrito en los perezosos de las selvas centro y sudamericanas (*Choelopus sp.* y *Bradypus sp.*), comadrejas (*Didelphis spp.*) y en el oso hormiguero (*Tamandua tetradactyla*) (OMS, 2010).

En roedores se ha descrito el papel de reservorio en varios géneros, como *Oryzomys*, *Dasyprocta*, *Meriones*, *Mastomys*, *Arvicanthis*, *Akodon*, *Bolomys*, *Nectomys*, *Rattus*, *Tatera*, *Nesokia*, *Heteromys*, *Nyctomys*, *Sigmodon*, *Proechimys* y *Neotoma* (Papadogiannakis y col., 2010; OMS, 2010).

#### **II.5.Ciclo de vida**

La Figura 3 muestra un esquema del ciclo de vida de *Leishmania*. Este cumple su ciclo en un hospedador vertebrado y uno invertebrado (diheteroxeno). Cuando el mosquito se alimenta de un animal infectado, junto

con la sangre ingiere parásitos en forma de amastigotes que se encuentran dentro de los macrófagos [1 en la Figura] (Sánchez-Saldaña, 2004).

Los amastigotes son de forma ovalada, sin flagelo, con un gran núcleo esférico excéntrico próximo al kinetoplasto. Estos se adhieren al tracto digestivo del insecto y pasan al estadio de promastigote [2 en la Figura].

Los promastigotes son piriformes y fusiformes con un flagelo del mismo largo que el cuerpo del parásito. En este estadio se reproducen activamente por división binaria y migran hacia faringe y esófago donde al cabo de varios días maduran a promastigotes metacíclicos, los cuales son infectivos para los vertebrados [3 en la Figura].

Cuando el vector pica a otro huésped inocula entre 10 y 100 promastigotes metacíclicos, los que penetran en la dermis y activan el complemento por vía alternativa, iniciando la acumulación de neutrófilos y macrófagos [4 en la Figura].

Los macrófagos fagocitan al promastigote y lo envuelven en una vacuola parasitófora [5 en la Figura]. El promastigote pasa al estadio de amastigote, que es resistente a la actividad antimicrobiana y digestiva del macrófago. Este libera dentro de la vacuola parasitófora una cascada de metabolitos derivados del oxígeno, como el óxido nítrico e hidrolasas lisosomales.

El amastigote se multiplica por fisión binaria dentro del macrófago [6 en la Figura]. Cuando la cantidad de parásitos es muy alta, se produce la lisis del macrófago y los amastigotes quedan libres en la sangre [7 en la Figura].

Este estado puede continuar durante meses o años sin la aparición de síntomas o signos clínicos visibles, dependiendo del sistema inmune del hospedador y su susceptibilidad a la enfermedad. Los amastigotes circulantes o los macrófagos infectados pueden ser ingeridos por otro mosquito, reiniciando el ciclo [8 en la Figura] (Sánchez-Saldaña, 2004).

Generalmente se acepta que el principal mecanismo de reproducción de *Leishmania* es asexual o clonal. Esto quiere decir que los parásitos descendientes son idénticos a sus parentales (Sánchez-Saldaña, 2004; Rougeron y col., 2010).

Sin embargo, recientemente se ha publicado que los promastigotes pueden realizar intercambio meiótico a través de la reproducción sexual dentro del hospedero invertebrado. No obstante, no se ha logrado dilucidar la

frecuencia de este evento ni su ocurrencia en los hospederos vertebrados (Akopyants y col., 2009, Segatto, 2012; Kuhls y col., 2013; Rougeron y col., 2015).

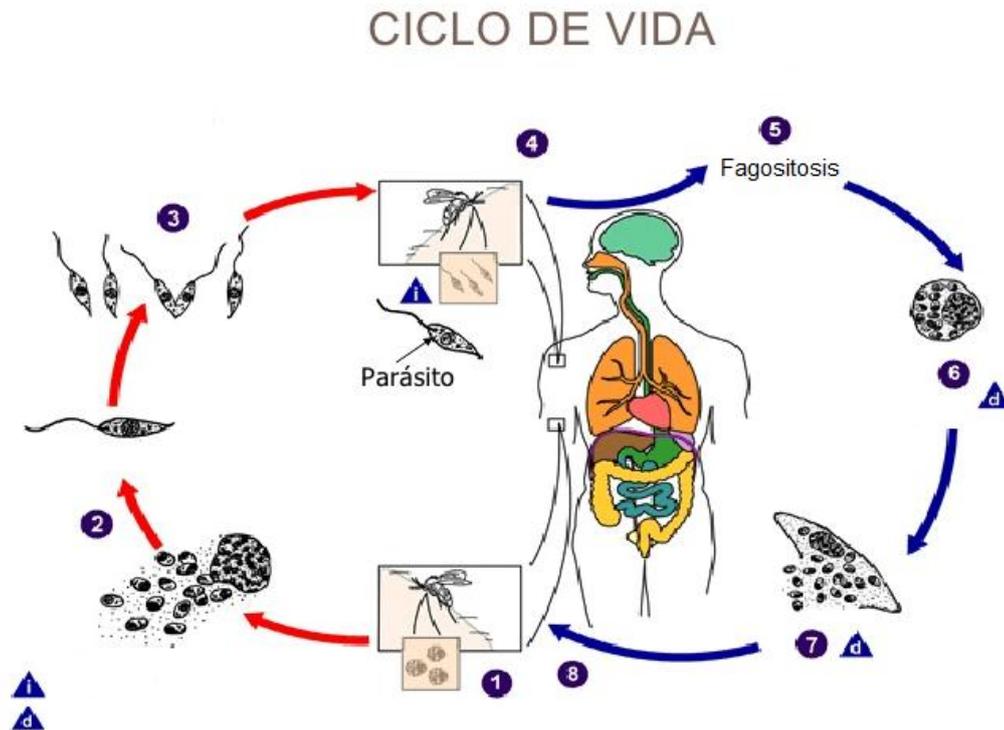


Figura 3. Ciclo de vida de *Leishmania*. Referencias en el texto.

## II.6. El genoma de *Leishmania*

Los parásitos pertenecientes a *Leishmania* poseen 36 cromosomas, todos lineales entre 200 y 4000 kb, y poseen telómeros aunque centrómeros todavía no han sido identificados (Kazemi, 2011; Bañuls y col., 2007). Los parásitos del género *Leishmania* tienen una organización genómica única entre los eucariotas: estos protozoos no poseen intrones en sus genes, por lo tanto sus cromosomas son más pequeños con un número de genes proporcionalmente mayor (Kazemi, 2011).

El genoma de los protozoos pertenecientes al género *Leishmania*, se compone del ADN nuclear, y el ADN del mitocondrion (mitocondria modificada característica de la clase kinetoplastida, se encuentra una por célula en una posición definida de la célula), que representa entre el 10 - 20% de su genoma. El ADNk se compone de una extensa red de moléculas circulares, maxicírculos y minicírculos (Jiménez, 1994; Morales y col., 2002; Morales, 2004; Kazemi, 2011).

En *Leishmania*, los maxicírculos pesan entre 20 y 40 kilobases y aparecen en número de 25 a 50. Los maxicírculos están formados por una región conservada y otra variable. Contienen secuencias de ADN a las que por homología se les atribuye el mismo papel que el ADN mitocondrial en otros sistemas celulares (Jiménez, 1994; Kazemi, 2011).

Los minicírculos de *Leishmania* están presentes en 10 a 20 mil copias por célula con un peso de entre 500 y 2500 pares de bases (pb). La mayor parte de su secuencia es variable, esto los convierte en blancos eficaces para la determinación de variabilidad genética dentro de una especie. Los minicírculos contiene los genes para los ARN guías, quienes dirigen la edición de los ARN mensajeros codificados en los maxicírculos (Jiménez, 1994; Morales, 2004; Peres y col., 2010; Kazemi, 2011).

## **II.7. Respuesta Inmune frente a *L. braziliensis***

El proceso de infección comienza con la introducción de las piezas bucales del vector en los vasos sanguíneos de la unión dermo-epidérmica. Inmediatamente, el sistema inmune innato del hospedador vertebrado interviene con la llegada de macrófagos residentes y de neutrófilos sanguíneos al sitio de la lesión.

Una vez inoculados los promastigotes, se da la activación de la cascada del complemento que lisa aproximadamente al 90 % de los promastigotes metacíclicos inyectados; sin embargo, hay un 10 % que sobrevive. Esto ocurre porque el promastigote metacíclico es más resistente a la lisis por complemento que el promastigote procíclico debido a su grueso glicocálix. El parásito contiene cinasas que fosforilan a C3, C5 y C9 provocando su inactivación (De Almeida y col., 2003).

El parásito favorece su propia opsonización y posterior fagocitosis mediada por los receptores de complemento (CR). La activación de complemento ha favorecido la liberación de las anafilotoxinas C3a y C5a que son potentes agentes quimiotácticos para neutrófilos (PMN) y monocitos (Von Stebut, 2007a). Los mastocitos liberan sus gránulos de TNF- $\alpha$ , que es quimiotáctico para los PMN (Von Stebut, 2007b).

A pesar de esta gran liberación de sustancias quimiotácticas, las primeras células en infectarse son las que ya están en el sitio al momento de

darse la inoculación. Es por esto que los macrófagos residentes son los primeros en verse afectados.

Los macrófagos fagocitan los parásitos que resistieron la lisis por complemento mediante el receptor CD11b/CD18 y mediante el receptor de manosa-fucosa que se une a los residuos de manosa del lipofosfoglucono (LPG) (Oliver y col., 2005; Von Stebut, 2007b). El LPG también puede interactuar con la proteína C reactiva y favorecer la fagocitosis a través del receptor de dicha proteína. Este mecanismo no provoca la activación del macrófago (Oliver y col., 2005).

La entrada por el receptor CD11b/CD18 es una ventaja para el parásito porque la entrada a través de este receptor no provoca la activación del macrófago (Von Stebut, 2007a). Una vez en el interior del macrófago, los parásitos se transforman en amastigotes, inhiben además la producción de IL-12 por el macrófago y se dividen activamente.

Eventualmente lisan el macrófago e invaden otro. Hasta este momento la infección no muestra ninguna manifestación clínicamente detectable (Von Stebut, 2007b). Los PMN liberan IL-8 favoreciendo la llegada de un mayor número de estas células (Charmoy y col., 2010) y liberan quimiocinas como MIP-1 $\alpha$ / $\beta$  y MIP-2 que atraen a los monocitos al sitio de inoculación (Von Stebut, 2007b).

El PMN es utilizado por el parásito como un refugio contra la lisis mediada por complemento hasta el momento en que llega un mayor número de monocitos/macrófagos al sitio de la inoculación, los cuales son las células hospederas definitivas.

Con la llegada de los macrófagos, se favorece la apoptosis de los PMN. Normalmente, la fagocitosis de PMN apoptóticos por parte de los macrófagos no genera una respuesta inflamatoria. De esta forma, el parásito penetra en los macrófagos sin despertar una respuesta microbicida (Charmoy y col., 2010).

La llegada de las células dendríticas al sitio de inflamación marca el inicio de la respuesta adaptativa a la infección por *Leishmania*. Aproximadamente 6 semanas después de la inoculación, el número de células dendríticas que contienen CD11c en su membrana aumenta al igual que el número de células dendríticas parasitadas. La llegada de las células dendríticas se ha relacionado con el aumento de las concentraciones de IL-12,

la migración de los linfocitos T CD4+ y T CD8+ al compartimiento cutáneo, la muerte del parásito y la involución de la lesión clínica (Von Stebut, 2007b).

Las primeras interacciones de las células dendríticas con los parásitos se dan a través de los receptores “Toll-like” (TLR). Todos los TLR, con excepción del TLR-3, señalizan a través de la proteína adaptadora MyD88, que es codificada por el gen de respuesta de diferenciación primaria mieloide. Las células dendríticas de ratones que no poseen la proteína MyD88 se activan poco y producen menos IL-12p40 al ser infectadas por *L. braziliensis*. Esto se traduce clínicamente en lesiones más grandes y crónicas.

En contraste, las células dendríticas que carecían de TLR-2 mostraban una activación más fuerte y mayor producción de IL-12 cuando entraban en contacto con el parásito. De esta manera, eran muy eficientes para activar las células T CD4+ lo cual quedó evidenciado por los altos niveles de interferón gamma (IFN- $\gamma$ ) y por una mayor resistencia a la infección. De estos resultados se puede inferir que MyD88 es indispensable para generar una respuesta inmune contra el parásito; mientras que el rol del TLR-2 es regulador (Vargas-Inchaustegui y col., 2009).

Adicionalmente, los TLR también son importantes para la activación de las células *natural killer* (NK) (TLR9) y son necesarios para que el macrófago pueda destruir los amastigotes ante la estimulación con IFN- $\gamma$  (Vargas-Inchaustegui y col., 2009).

La participación de los LTc1 se da por dos mecanismos: por acción directa de los mecanismos citotóxicos y por la producción de las citocinas activadoras de macrófagos (TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ ) que favorecen la muerte de los parásitos intracelulares. Los mecanismos citotóxicos de los LTc provocan la lisis de los macrófagos infectados a través de la vía de la perforina/granzima o del CD95/CD95L o de ambas (Hernández-Ruiz y Becker, 2006).

## **II.8. La respuesta inmune frente a *L. infantum***

El desarrollo de la enfermedad está ligado tanto a la respuesta inmune del hospedador como a la persistencia y multiplicación del parásito (Reis y col., 2010).

Después de la infección, pueden desarrollarse dos tipos de respuesta inmune mediada por los linfocitos T, una respuesta celular (Th1) asociada a la

inmunidad protectora y otra respuesta humoral (Th2) asociada a la susceptibilidad o progresión de la enfermedad.

Los diferentes componentes de la respuesta inmune y las interacciones entre ambos tipos de respuesta son diversos y complejos, no observándose necesariamente uno u otro extremo de estas respuestas, sino más bien un espectro del balance entre las mismas (Alvar y col., 2004; Baneth y Aroch, 2008; Cabral y col., 1998; Reis, 2006; Reis, 2006).

La resistencia a la leishmaniasis va a estar asociada a la respuesta inmune celular (Th1), con la producción de citoquinas por parte de células T activadas (CD4+), como: interferón  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), interleukina-2 (IL-2) y factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), que estimulan la actividad leishmanicida de los macrófagos (Pinelli y col., 1994; Vouldoukis, 1996).

El producto utilizado para destruir al parásito es óxido nítrico producido por los macrófagos activados. IL-10 es considerada el regulador de la respuesta Th1, manteniendo el balance entre las respuestas Th1 y Th2. (Santos-Gómez y col., 2002; Holzmuller, 2006).

La susceptibilidad a la enfermedad va estar determinada por una respuesta humoral (Th2). La respuesta Th2 induce la aparición de interleukina-4 (IL-4) e interleukina-10 (IL-10) que promueven la estimulación de los linfocitos B generando elevadas concentraciones de  $\gamma$ -globulinas (Persechino y Oliva, 1986; Guarga, y col., 2000; Noben-Trauth y col., 2003; Barbieri, 2006).

## **II.9. Coinfección VIH-*Leishmania***

Han habido importantes cambios en los patrones epidemiológicos de la LV, tradicionalmente una enfermedad infantil, hoy la coinfección VIH-*Leishmania* afecta sobre todo a adultos: el 77% de los pacientes coinfectados tienen edades comprendidas entre los 31-50 años (Jiménez, 1994; Morales y col., 2002; Morales, 2004).

En los países del suroeste de Europa el 9% de los pacientes con SIDA sufren de LV como primoinfección o reactivada. Se propone que la transmisión del parásito se realiza a través de las jeringuillas compartidas por adictos a drogas por vía parenteral. Se ha propuesto un esquema de transmisión mixto de *L. infantum* en los países mediterráneos: existe un ciclo

zoonótico mantenido entre perros y a través de la picadura de dípteros y que de manera accidental infecta al humano, al que se asocia un ciclo antroponótico artificial, en el que el flebótomo ha sido sustituido por las jeringuillas compartidas (Jiménez, 1994; Morales y col., 2002; Morales, 2004).

## **II.10. Epidemiología de LV**

La LV es endémica en 62 países con más de 310 millones de personas viviendo en zonas de riesgo según reporte del 2015. En el 2004 poseía una incidencia de 300.000 casos por año, produciendo más de 20.000 muertes anuales. En seis países se reporta el 90% de los casos mundiales (Desjeux, 2004; OMS, 2015).

Aunque tradicionalmente ha sido considerada una enfermedad rural y asociada a la pobreza, hoy en día, se encuentra bien establecida en zonas urbanizadas (OMS, 2002; Alvar y col., 2006; Dantas-Torres, 2007).

Es mundialmente reconocida como una de las enfermedades infecciosas más importantes que afecta a la población pobre que vive principalmente en áreas rurales y suburbanas, siendo endémica en la mayoría de regiones tropicales y subtropicales tanto en el Nuevo como en el Viejo Mundo (Alvar y col., 2006).

### **II.10.1. Epidemiología de LV en Argentina**

En el periodo comprendido entre 1923 a 2004 fueron descritos 17 casos de LV, dentro del área endémica de LC por *L. braziliensis* (ninguno de ellos en Misiones); 4 se consideraron importados; uno desde Italia (Acuña y col 1924), otro desde Yugoslavia (Inda y col., 1934), un caso debido a *L. mexicana* en un paciente con SIDA (Nocito y col., 2002) y un caso debido a *L. infantum* en la provincia de Mendoza, de origen desconocido (Martin-Sanchez y col., 2004).

Los otros 13 se describieron como autóctonos de las Provincias de Salta, Jujuy, Tucumán, Santiago del Estero, Chaco y Formosa, que fueron considerados como visceralizaciones de una LC inicial (Borzzone, 1926; Benitez, 1967; Fernandez, 1941; Fonso e Ink, 1947; Mazza y Cornejo, 1926; Wilde y col., 1956; Salomon y col., 2001).

Por varios motivos, no se consideró una LV por *L. infantum* autóctona en el diagnóstico de los casos: i) la ausencia del vector de *L. infantum* en

Argentina, *Lu. Longipalpis*. ii) el solapamiento geográfico de los casos en zona endémica de LC por *L. braziliensis* (Córdoba-Lanús), iii) sintomatología simultánea con LC y iv) la ausencia de caracterización del agente causal en la mayoría de los casos, llevó a deducir que estos eran debidos a la visceralización de una LC (Grimaldi y col., 1989; Campanini y col., 1993; Torno y col., 1995; Sinagra y col., 1997; Salomón y col., 2001).

No se puede descartar que los casos de LV hayan sido debidos a *L. infantum* y que la transmisión sea debida a otras especies de *Lutzomyia* (Salomón y col., 2001). Se ha considerado también la existencia de focos enzoóticos de LV cuyo contacto con el hombre sea esporádico y excepcional (Salomón y col., 2001). En la comunidad internacional, se asume que en Argentina existen focos endémicos o esporádicos de LV zoonótica probablemente debidos a *L. infantum* y que tienen al perro como reservorio (OMS., 1990).

La primer captura de *Lu. Longipalpis* en el país data de 1951 en el municipio de Candelaria (Misiones) (Duret, 1952) y hasta 50 años después no se volvió a tener constancia de esta especie en la zona. El segundo hallazgo tuvo lugar en Corpus (Misiones) en el año 2000 (Salomón y col., 2001).

En 2006, se colectaron 4 machos y 24 hembras en la ciudad de Posadas (Misiones), y 2 hembras en Candelaria (Misiones) (Salomón y col., 2008). Recientemente, se ha encontrado en la ciudad de Posadas (Misiones) una tasa de infección por *L.infantum* del 3.4% en 211 hembras de *Lu. Longipalpis* estudiadas (Acardi y col., 2010).

La transmisión de LV y LCan hasta el momento se ha registrado en Misiones y Corrientes, mientras que en Santiago del Estero hubo casos de LV y en Formosa sólo LCan (Ministerio de Salud de la Nación, 2010).

### **II.10.2. Epidemiología de LV en Misiones**

El primer caso humano descrito de LV autóctona en la Argentina causado por *L. infantum* tuvo lugar en Misiones, ciudad de Posadas, en el año 2006. La transmisión ha sido asociada con perros enfermos e identificación del principal vector (*Lu. longipalpis*) en la misma zona (Salomón y col., 2008).

Esta Provincia es la más afectada por esta patología, habiéndose registrado desde 2006 a junio del 2016, 113 casos humanos, según datos del

Ministerio de Salud de la Provincia de Misiones (Ministerio de Salud de la provincia de Misiones, 2016). En el transcurso del presente año, se han registrado 4 casos humanos.

Misiones es un área endémica para LC causada por *L. braziliensis*, siendo ésta la única especie autóctona caracterizada hasta el 2009 en Argentina (No descrita en Posadas) (Marco y col., 2005). Aunque también han sido detectados casos humanos de LC por *L. amazonensis* y *L. guyanensis* (Aleixo y col., 2006).

En los últimos años, ha ocurrido en las inmediaciones de la ciudad de Posadas y en la ciudad misma, una serie de cambios tanto ecológicos como demográficos que pueden haber favorecido la aparición y establecimiento de este nuevo foco de LV. Como por ejemplo la deforestación indiscriminada sin políticas de reforestación y la construcción de una central hidroeléctrica (Yacyretá-apipé) en el Río Paraná, 100 km aguas abajo de Posadas.

Estos cambios han supuesto una subida de 87 m. sobre el nivel del mar en los últimos 37 años ([www.yacyreta.org.ar](http://www.yacyreta.org.ar)), que además de generar un gran anegamiento de áreas ribereñas en las zonas afectadas de Paraguay y Argentina, con una transformación del ecosistema local, han provocado el desplazamiento de una gran cantidad de población humana (relocalizaciones) hacia asentamientos periféricos, bajo condiciones de aislamiento y marginación.

La deforestación en las inmediaciones de la ciudad en estos últimos años puede haber sido la causa de los cambios en la biología del vector, provocando la urbanización del mismo.

En este contexto ambiental degradado, se encuentra una enorme población de perros callejeros o de vida semilibre sin ningún control sanitario. Estos cambios han podido favorecer la urbanización del vector, y junto con la existencia de reservorios susceptibles (perros) y la proximidad de la enfermedad en Paraguay y Brasil, pueden haber propiciado el establecimiento de la LV en Posadas.

En la Provincia de Misiones, esta enfermedad tiene una mortalidad del 10% tal como se ha observado en otros lugares del mundo (Alvar y col., 2012).

## II.11. Epidemiología de LC

La LC es endémica en más de 70 países, pero el 90% de los casos ocurren en Afganistán, Algeria, Brasil, Pakistan, Peru, Saudi Arabia, and Syria (Desjeux, 2004).

Sin embargo, en la década pasada, incrementaron el número de casos en Afganistán, Bolivia, Brasil, Colombia, Perú, y Siria. Este incremento puede explicarse en parte por una mejora en eficiencia en el diagnóstico y notificación de casos, pero también son resultado de un inadecuado control del vector y reservorios, incremento en la detección de LC asociada con infecciones oportunistas (como el VIH), y la emergencia de la resistencia contra el tratamiento (Yadon y col., 2001; Molina y col., 2003; Croft y col., 2006).

Además, muchas infecciones son asintomáticas o reciben un diagnóstico erróneo, razón por la que la distribución global de la LC es muy probable que esté subestimada (Escobar y col., 1992; Reithinger y col., 2007).

En áreas endémicas, la prevalencia de LC se incrementa con la edad hasta los 15 años, tras lo cual la prevalencia decrece, posiblemente por la adquisición de inmunidad.

Los focos de infección son los hogares, lo que podría estar determinado por el corto rango de vuelo de los vectores, la transmisión antropogénica o susceptibilidad genética. Los factores de riesgo más comunes incluyen: sexo (el sesgo sexual suele apuntar a patrones de comportamiento que aumentan la exposición del vector), edad, diseño del hogar y material de construcción y la presencia de animales domésticos (Killick-Kendrick, 1999; Reithinger y col., 2003; Brooker y col., 2004; Castellucci y col., 2005).

### II.11.1. Epidemiología de LC en Argentina

La primer descripción de LC en Argentina fue hecha en 1915 (Bernasconi, 1928). Se ha aislado *L. braziliensis* de casos humanos, aunque también se ha encontrado *L. amazonensis* y *L. guyanensis* (Salomón y col., 2006).

El área endémica argentina de LC comprende unos 500.000 km<sup>2</sup> distribuidos en 9 provincias políticas y 4 regiones ecológicas: la selva subtropical del noroeste (Yungas) y su piedemonte, la selva subtropical del noreste (Paranaense) y la selva en galería asociada a la cuenca Paraná-

Uruguay, y entre ambas la región chaqueña húmeda y la región chaqueña seca (Salomón y col., 2004).

Se determinó la presencia de 20 especies de *Phlebotominae* en el país; *Lutzomyia neivai*, la más abundante en situaciones de brote, se encontró con infección natural por *L. braziliensis* (Salomón, 1998; Spinelli y col., 1999; Córdoba-Lanús y col., 2003). Esta especie está usualmente acompañada por *Lu. migonei* en todo el territorio, o *Lu. whitmani* en el este (Salomón y col., 2002a; Salomón y col., 2004).

La notificación de las leishmaniosis al Sistema de Salud es obligatoria (ley 15.465), y los registros nacionales a partir de la década de los '80 indica que el número promedio de casos oscila entre 40 y 90 por año, distribuido entre las 9 provincias (Bernasconi, 1930; Cedillo y col., 1988).

Un brote de LC por *L. braziliensis* ocurrió en Salta (localidad de Pichanal), entre el 1984 y el 1987, involucrando áreas periurbanas y rurales, con incidencia similar en hombres y mujeres, así como en los jóvenes (Villafañe y col., 1988; Sosa y col., 1993; Sosa y col., 1994).

En 1997 ocurrió un nuevo brote de LC en Salta. La prevalencia de la infección (reactivo al test de Montenegro) resultó de 171/1000 habitantes en Paraje Las Carmelitas y 790/1000 en Río Blanco, mientras que la prevalencia de las úlceras activas por LC resultaron 72/1000 y 790/1000 respectivamente. Los patrones clínicos y epidemiológicos coincidieron con los de *L. braziliensis* y el género *Lutzomyia* fue identificado como vector (Villafañe y col., 1988; Sosa y col., 1993).

El brote ocurre luego de una intensa deforestación, por lo que se hipotetiza que esto empujó al vector a zonas suburbanas. Además, se establecieron asentamientos humanos en las proximidades de las zonas deforestadas (Salomón y col., 2001b). Si se consideran los casos publicados en la primera mitad del siglo veinte se observa una tendencia al aumento relativo de la incidencia en el sexo femenino y en menores de 14 años, sugiriendo transmisión peri doméstica (Salomón, 2002a; Sosa y Salomón, 2002).

### **II.11.2. Epidemiología de la LC en Misiones**

Desde 1977 hasta 1997, la provincia de Misiones no contaba con antecedentes epidémicos de esta patología: en ese período se habían registrado en la provincia un total de 9 casos (Salomón y col., 2001c; Salomón y col., 2002). En 1998 aparece en una localidad del departamento Iguazú, Puerto Esperanza, el primer brote de LC. Ese año se notificaron en esa localidad 109 casos, de los cuales 77 pertenecían a un mismo barrio (Salomón y col., 2006).

En 2004 aparece un nuevo brote en esa zona, asociado a la deforestación en la represa de Urugua-í. De los 20 casos notificados en ese brote, el total eran hombres mayores de edad, y 18 habían estado realizando trabajos de desmalezamiento y deforestación (Salomón y col., 2006).

Durante el 2004 y 2005, 36 casos de LC fueron notificados en el Hospital de Puerto Iguazú (departamento Iguazú). El brote fue asociado principalmente con *L. braziliensis*, transmitido por *Lu. whitmani*, el cual estaba relacionado con actividades de los colonos que criaban gallinas y cerdos en parches recientemente deforestados (Salomón y col., 2009).

## **II.12. Diagnóstico**

### **II.12.1. Diagnóstico clínico de LV en humanos**

Las manifestaciones clínicas más frecuentes de la LV en humanos se caracterizan por episodios irregulares de fiebre que se prolongan en el tiempo, pérdida sustancial de peso, anemia, hepatomegalia y esplenomegalia, siendo también característicos la leucopenia, trombocitopenia e hipergammaglobulinemia. Estas manifestaciones pueden ser muy diversas en cuanto a la forma e intensidad. Esta variabilidad en la expresión de la enfermedad en humanos también se ha demostrado en canes infectados naturalmente y experimentalmente (Alvar y col., 2004; McMahon-Pratt y Alexander, 2004). Por esta razón, es importante disponer de técnicas diagnósticas para confirmar los casos sospechosos de LV o descartarlos y poder continuar con la búsqueda del diagnóstico.

Según el Ministerio de Salud de la Nación los casos de LV pueden clasificarse de la siguiente manera (Ministerio de Salud de la Nación, 2010).

LV en Humanos:

Paciente asintomático: paciente infectado que luego del período de incubación no desarrolla sintomatología y es posible diagnosticar por la presencia de serología positiva.

Paciente oligosintomático o subclínico: paciente infectado que presenta característicamente un cuadro febril prolongado conjuntamente con síntomas inespecíficos como tos seca, adinamia, diarrea, leve engrosamiento del hígado o del bazo.

El paciente sintomático es un paciente infectado que puede presentarse como:

- Forma aguda: El paciente presenta un cuadro febril, alteraciones hematológicas, agrandamiento de hígado y del bazo. En el paciente presenta un buen estado general.
- Forma clásica: la fiebre se torna persistente y ondulante. Hay hepatoesplenomegalia masiva presentado una distensión importante del abdomen. Además se presentan adenopatías generalizadas, signos de sangrado (epistaxis, hemorragia gingival), anorexia, pérdida de peso, caquexia, debilidad progresiva, y signos de desnutrición calórico-proteica, edemas y ascitis. Hay alteraciones en la piel, que puede ser grisácea, oscura o pálida, reseca y escamosa.

Se considera caso sospechoso de LV a toda persona que proviene de un área endémica o de otra donde esté ocurriendo un brote y presente alguno de los siguientes síntomas: síndrome febril prolongado (más de dos semanas), esplenomegalia, hepatomegalia, adenomegalia, edema, ascitis, anorexia, caquexia, anemia o pérdida de peso.

Es caso confirmado todo paciente sospechoso que tenga un diagnóstico confirmatorio de LV por serología o por confirmación parasitológica en tejidos (Ministerio de Salud de la Nación, 2010).

### **II.12.2. Diagnóstico clínico de LC en humanos**

El espectro clínico de la leishmaniasis cutánea es amplio y puede simular el de otras enfermedades cutáneas, como las infecciones estafilocócicas o estreptocócicas, las úlceras micobacterianas, la lepra, las infecciones fúngicas, el cáncer, la sarcoidosis o la úlcera tropical. Como la presentación clínica de la

leishmaniasis cutánea no es específica y el tratamiento es caro, complejo o tóxico, se requiere confirmación diagnóstica (OMS, 2010).

### **II.12.3. Diagnóstico clínico en canes**

Es caso sospechoso de LCan todo can proveniente de un área endémica con manifestaciones clínicas compatibles con la enfermedad (fiebre irregular, apatía, caquexia, descamaciones y úlceras en la piel, principalmente del hocico, orejas y extremidades; conjuntivitis, parestesia de extremidades posteriores, heces sanguinolentas y onicogriposis).

Se considera caso confirmado de LCan a todo can sospechoso que tenga un diagnóstico confirmatorio de LCan por laboratorio. El criterio de laboratorio es que el can que presente más de una prueba serológica positiva o examen parasitológico positivo (Ministerio de Salud de la Nación, 2010).

### **II.13. Técnicas de laboratorio**

Los métodos de diagnóstico se clasifican según cómo demuestran la presencia del parásito. Pueden ser métodos directos, si determina presencia del parásito o parte de él (ADN) en el material clínico, o indirectos si se demuestra exposiciones previas del sujeto con el parásito (por ejemplo anticuerpos) en la muestra. Pero los pacientes pueden poseer los anticuerpos y no estar cursando la enfermedad o bien, deberse a una infección anterior (Solano-Gallego, 2009). Todas ellas van a tener unos márgenes de sensibilidad y especificidad, reacciones cruzadas con otros agentes infecciosos, así como una distinta relación coste/complejidad en la realización, la elección de una u otra prueba (o combinación de ellas) va a depender del objetivo planteado (Schallig y col., 2004; Baneth y Aroch, 2008; Gomes y col., 2008).

#### **II.13.1 Métodos directos**

Son los más fiables ya que evidencian el parásito por visualización directa (observación microscópica de frotis o cultivo) o mediante técnicas de biología molecular como la PCR. Es un método que goza de una alta especificidad, en cambio la sensibilidad está condicionada por factores como el tipo de muestra biológica elegida o la fase en la que se presente la

enfermedad, que va asociada a la carga parasitaria (Saridomichelakis y col., 2005; Mateo, 2007; Manna y col., 2009).

La técnica de referencia para el diagnóstico en LC es la demostración de parásitos en material de biopsia, aspiración o raspado de las lesiones cutáneas, pero su sensibilidad es muy variable dependiendo de la especie involucrada y el estadio de la lesión. Por consiguiente deberían realizarse varias pruebas parasitológicas en cada paciente (OMS, 2010).

La técnica de referencia para el diagnóstico de LV es la demostración de parásitos en material de punción esplénica, previo cultivo o no. Además de la punción esplénica, también es muy utilizada la muestra de PAMO, ambas son muestras obtenidas por métodos altamente invasivos (Boelaert y col., 2007).

En la punción esplénica, que muestra clínica de elección para este tipo de estudio, existe una probabilidad del 1% de producir una hemorragia fatal y varios autores han reportado morbilidad y mortalidad iatrogénico (Boelaert y col., 2007).

La observación de parásitos en muestras de paciente o en material de cultivo poseen una especificidad del 100%. Pero debido a la demora del cultivo (cuatro semanas), a la necesidad de personal con entrenamiento en la identificación de promastigotes al microscopio óptico y la baja sensibilidad de este método (42,3%), es necesario utilizar técnicas complementarias para el diagnóstico (Manna y col., 2004; Boelaert y col., 2007).

Los métodos moleculares han contribuido a una nueva expansión de la epidemiología, facilitando la identificación especies de *Leishmania*. La PCR es un método que goza de una alta especificidad, en cambio la sensibilidad está condicionada por factores como el tipo de muestra biológica elegida o la fase en la que se presente la enfermedad, que va asociada a la carga parasitaria (Saridomichelakis y col., 2005; Mateo, 2007; Manna y col., 2009). Esta técnica permite determinar la presencia e identificación de parásitos en los casos activos, también sirve para monitorear la cura parasitológica después de un tratamiento (Cortés y col., 2004).

Usando sangre periférica, la toma de muestras es más simple y menos invasiva, lo que facilita el diagnóstico y la aceptación por parte de los dueños. Pero la duración, constancia e intensidad de la parasitemia en los perros es todavía desconocida, pudiendo acontecer falsos negativos especialmente en

perros asintomáticos (Lachaud y col., 2002). Hay que destacar que un resultado PCR negativo en un perro clínicamente sospechoso, no es suficiente para descartar la infección (Baneth y Aroch, 2008).

La aplicación conjunta de la biología molecular y la biología evolutiva pueden ser usadas para definir, identificar y rastrear cepas de patógenos y evaluar el impacto de su diversidad genética en diferentes aspectos, como ser epidemiológico, patogenicidad, resistencia a drogas y comportamiento inmunológico (Botilde y col., 2006; Tibayrenc y col., 2009; Ministerio de Salud de la Nación, 2010; Cortés y col., 2011).

### **II.13.2. Técnicas indirectas**

En el diagnóstico de LC las técnicas serológicas son de uso limitado debido a su baja sensibilidad y especificidad variable. De manera general, debido a que los anticuerpos circulantes en LC tienen niveles muy bajos y la especificidad de los ensayos puede ser también variable, particularmente en áreas donde puedan ocurrir reacciones cruzadas con otros parásitos, como *Trypanosoma cruzi* (Reithinger y col., 2007).

Además, no hay acuerdo sobre la mayor utilidad de uno u otro, y a veces las recomendaciones de los autores son contradictorias. También se comunica una eficacia diferente entre el Viejo y el Nuevo Mundo, debido a la variación en la sensibilidad y la aparición de reacciones cruzadas (Kar, 1995).

La prueba cutánea de la leishmanina (reacción de Montenegro) puede ser útil en los estudios epidemiológicos, pero es de escaso valor en el diagnóstico de la leishmaniasis cutánea. Ni las pruebas serológicas ni la prueba cutánea de la leishmanina permiten distinguir las infecciones actuales de las pasadas (OMS, 2010).

Las técnicas serológicas para LV presentan una sensibilidad y especificidad aceptable y, a diferencia de la microscopía, pueden realizarse en suero (Ministerio de Salud de la Nación, 2010).

El Ministerio de Salud de la Nación recomienda también el uso de técnicas serológicas para el diagnóstico de la LV, tanto en canes como humano, y considera una prueba serológica positiva como criterio de infección y recomienda tratamiento.

El resultado de una prueba serológica es suficiente para la confirmación del caso según el Ministerio de Salud de la Nación. Sin embargo, el criterio de la OMS son dos pruebas positivas para confirmar la enfermedad, en caso de diferir el resultado se utiliza una tercer prueba que debe ser definida de antemano (Ministerio de Salud de la Nación, 2010; OMS, 2010).

Entre las técnicas serológicas disponibles, las más utilizadas para el diagnóstico de leishmaniosis son **Inmunofluorescencia indirecta (IFI)**, test **inmunocromatográfico rápido basado en el antígeno recombinante K39 (ICT)** o **enzimoinmunoensayo (ELISA)** y la **aglutinación directa** (Ministerio de Salud de la Nación, 2010).

Existe una correlación positiva clara entre la titulación de anticuerpos anti-Leishmania y la presencia de signos clínicos de la enfermedad, un elevado título de anticuerpos podría confirmar una LCan. (Solano-Gallego y col., 2001; Reis y col., 2006; Teixeira Neto y col., 2010). Así, un resultado claramente positivo por serología y un cuadro clínico compatible, puede ser suficiente para confirmar un caso, pero los resultado dudosos son más complicados de interpretar, especialmente porque la seroconversión en los perros puede ocurrir 1 a 22 meses tras la infección (Moreno y Alvar, 2002).

A pesar de lo mencionado anteriormente, todas las pruebas serológicas tienen las siguientes limitaciones: en primer lugar, los anticuerpos específicos permanecen detectables hasta varios años después de la cura clínica, por lo tanto, la recaída no puede ser diagnosticada por serología; en segundo lugar, una proporción significativa de personas sanas que viven en zonas endémicas, sin antecedentes de LV son positivos para anticuerpos contra leishmania debido a infecciones asintomáticas. Las pruebas basadas en anticuerpos siempre deben utilizarse en combinación con la definición de caso clínico estandarizado para LV (OMS, 2010). Además, los anticuerpos no permiten diferenciar entre una infección nueva y una reinfección, ni tampoco son un criterio de cura o éxito terapéutico (Ministerio de Salud de la Nación, 2010; Boelaert y col., 2007).

Adicionalmente, las pruebas serológicas no son eficaces para el diagnóstico en inmunodeprimidos (porque no producen anticuerpos en cantidad) ni tampoco en una infección reciente, donde tampoco se encuentran

anticuerpos suficientes circulantes (Ministerio de Salud de la Nación, 2010; Boelaert y col., 2007).

## **II.14. Caracterización molecular de especies**

### **II.14.1. PCR-RFLP**

La PCR-RFLP es una técnica que permite identificar especie de *Leishmania*. Esta técnica consiste en realizar una amplificación de una región altamente variable y luego realizar una digestión enzimática de estos productos y someterlos a separación por peso molecular en una electroforesis en gel de agarosa. Dependiendo de la diana genética que se elija, además se pueden obtener patrones o perfiles que identifican poblaciones (Aransay y col., 2000; Schonian y col., 2003).

Se propone a la PCR-RFLP del ADNk como una herramienta más apropiada para la identificación genética debido a que los minicírculos mitocondriales presenta mayor variedad: Esto no solo se debe al gran repertorio de variación en las secuencias de los minicírculos de kDNA, sino también al hecho que el ADN de los minicírculos tienen un papel crucial en la función genética de la mitocondria; así, estas secuencias de ADN son más propensas a una rápida respuesta a diversas condiciones ambientales y situaciones de estrés, y la aptitud parásito que confiere ventajas selectivas diferentes podría depender de las clases de minicírculos que prevalecen las clases en las diferentes variantes genéticas de *Leishmania* (Peres y col. 2010).

Por otro lado, hay autores que sugieren que la PCR-RFLP del ADNk no es apropiada como técnica de referencia. Ellos opinan que el polimorfismo observado podría deberse a la alta variabilidad de las secuencias de los minicírculos, presente en un número de 10.000 copias. De esta manera, esta heterogeneidad hace la interpretación de los patrones generados por PCR-RFLP relativamente difícil. El alto número de fragmentos de restricción, algunos de ellos en muy baja cantidad (variantes raras de los minicírculos), implica el uso de equipamiento de alta resolución (por ejemplo electroforesis capilar) y una operación estricta de los procedimientos estándar, lo cual impide comparaciones entre laboratorios. Otro punto débil de esta técnica es la propia naturaleza no genómica del ADN blanco. Como la segregación de los

minicírculos no es completamente conservada durante la división celular, esto hace que esté sometido a la deriva genética a corto término. Esto podría explicar la baja congruencia observada entre árboles filogenéticos de ADNk y árboles genómicos (Botilde y col., 2006).

#### **II.14.2. Tipificación por microsatélites (MLMT)**

En los últimos años se han utilizado cada vez más los microsatélites como marcadores moleculares para estudios taxonómicos de especie de *Leishmania*. Es una técnica rápida y confiable para la identificación de especie, muy utilizado para el estudio de la epidemiología y genética de poblaciones. Se utilizan alrededor de 15 marcadores que permiten diferenciar varias especies de *Leishmania* e incluso variantes dentro de estas especies. Estos marcadores poseen cebadores para amplificarlos por PCR y determinar el perfil de la muestra. Los cebadores utilizados en *Leishmania* se han difundido con el fin de lograr comparaciones entre estudio. La estructura de la población se infiere en base a modelos Bayesianos y análisis de la distancia genética (Kuhls y col., 2011; Baleela y col., 2014; Kayter y col., 2014; Ghawar y col., 2014; Aluru y col., 2015).

#### **II.14.3. Electroforesis de isoenzimas (MLEE)**

La técnica de referencia para estudios de especie de *Leishmania* es la técnica denominada MLEE. Esta técnica define “zimodemas” o poblaciones de parásitos con igual perfil enzimático (Lumsden, 1977; Alonso y col., 2010).

El fundamento de la técnica es detectar diferentes alelos de genes conservados, midiendo la movilidad electroforética de las enzimas codificadas por estos genes. La secuencia de aminoácidos es un marcador indirecto de la secuencia de nucleótidos. Así, un cambio en la secuencia de aminoácidos alteraría la movilidad electroforética de la proteína. Para el análisis, se considera que las proteínas con la misma movilidad electroforética están codificadas por el mismo alelo (Bañuls y col., 2007).

## **CAPÍTULO III: CUERPO DE DESARROLLO DEL TRABAJO DE INVESTIGACIÓN**

### **III.1. Propuesta metodológica o Metodología de investigación**

Se realizó un estudio de tipo descriptivo, y se correspondió con una serie de casos con análisis retrospectivos y prospectivos.

Debido al número de muestras estudiadas, resultó conveniente realizar un estudio descriptivo, debido a que no encontramos descripciones anteriores en la Provincia de Misiones. A su vez, parte de las muestras incluidas fueron colectadas años anteriores, y se continuó con la recolección de muestras nuevas, por lo que el análisis realizado fue retrospectivo y prospectivo.

### **III.2. Materiales y métodos**

#### **III.2.1. Área de estudio**

El presente estudio en humanos se realizó a partir de individuos residentes en la provincia de Misiones. Según el censo de INDEC al año 2010, Misiones contaba con 1.101.593 habitantes, de los cuales el 49,68% eran hombres (INDEC, 2010).

Los canes pertenecían a dos ciudades de la provincia: Posadas y Puerto Iguazú. En la ciudad de Posadas se reportaron 324.756 habitantes y 93.120 viviendas en la ciudad según censo INDEC 2010.

En estudios veterinarios se estiman en promedio un perro por vivienda. En la ciudad de Puerto Iguazú se reportaron 82.227 habitantes y 21.466 viviendas en la ciudad según censo INDEC 2010.

La provincia posee un clima típicamente subtropical; caluroso con abundantes lluvias y alta humedad relativa. Esta comprende una superficie de 29.801 Km<sup>2</sup>, limitando al norte y al este con Brasil, y al oeste con Paraguay. En la Figura 4 se puede observar la ubicación de Misiones en la región.



Figura 4. Ubicación de la Provincia de Misiones en la región.

### III.2.2. Canes

#### III.2.2.1. Poblaciones canina de estudio

En el presente estudio se trabajó con dos grupos canes de dos regiones geográficas, Posadas y Puerto Iguazú. Los perros de Posadas fueron diagnosticados en el Instituto Municipal de Sanidad Animal (IMuSA) en el año 2016 mediante signos clínicos y estudios serológicos, y los de Puerto Iguazú fueron seleccionados de un estudio realizado anteriormente (Acosta y col., 2015).

#### III.2.2.2. Criterio de inclusión de canes

Canes que residían en la Provincia de Misiones y fueron evaluados por médicos veterinarios entre el 2011 y 2015 y resultaron caso sospechoso de LCan. Canes de los cuales se logró amplificar mediante PCR ADN compatible con el género *Leishmania*.

- Los canes incluidos pertenecientes a propietarios que residían en Misiones y que no habían salido de la provincia.
- Sus respectivos dueños firmaron un consentimiento para el estudio.
- Fueron sometidos a evaluación veterinaria y fue confeccionada una ficha epidemiológica.
- A todos los canes se les extrajo una muestra de sangre y una de ganglio poplíteo.

- Resultaron positivos en al menos uno de los siguientes estudios: a) Test inmunocromatográfico rk39, b) Test de Inmunofluorescencia Indirecta, c) PCR.

### **III.2.2.3. Encuesta epidemiológica canes**

Los datos epidemiológicos registrados en las fichas de los canes estudiados fueron: la fecha de toma de la muestra, el nombre del propietario, su DNI y domicilio, número de teléfono, el nombre del perro, la raza, la edad, el lugar donde el perro habitaba en la casa, la presencia de más perros en la vivienda, clínica compatible y los siguientes signos clínicos: adenopatías, esplenomegalia, hepatomegalia, onicogriposis, alopecia, apatía, descamaciones epiteliales, ulceraciones, pérdida de peso, signos oculares y demodexia. Estos datos fueron ordenados en una base de datos para facilitar su lectura y análisis. En el Anexo I se encuentra un modelo de la ficha clínica utilizada para recoger los datos de los perros.

### **III.2.2.4. Muestras clínicas de canes**

Las muestras de los canes fueron extraídas por médicos veterinarios, así como los datos epidemiológicos y clínicos de cada perro, los datos de contacto del propietario y el consentimiento informado. Las muestras consistieron en:

a) aspirado de ganglio poplíteo colocado en un tubo de plástico con etanol absoluto.

b) un mililitro de sangre periférica en tubos de plástico, los tubos fueron centrifugados a 6.000 revoluciones por minuto por 5 minutos para separar el suero y este fue conservado a 4°C hasta su posterior utilización.

Los tubos, tanto los de suero como los de aspirado de ganglio poplíteo, fueron rotulados según el código con que se denominó al perro dentro del laboratorio y fueron conservados a 4°C hasta ser enviados en el Laboratorio de Parasitología de la Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales.

### **III.2.2.5. Consideraciones éticas con canes**

El consentimiento informado utilizado durante la toma de muestra de canes en los proyectos anteriores se encuentra en Anexo II. Las muestras provenientes del IMuSA poseen un consentimiento informado que se conserva

en dicho establecimiento. En el Anexo III se encuentra el modelo de consentimiento utilizado en el IMuSA.

### **III.2.3. Humanos**

#### **III.2.3.1. Población de pacientes estudiados**

Pacientes que residían en la Provincia de Misiones y que concurrieron a consulta clínica entre el 2010 y 2015 y resultaron caso sospechoso de leishmaniosis. Pacientes de los que logró amplificar por PCR ADN compatible con el género *Leishmania*.

#### **III.2.3.2. Criterios de inclusión humanos**

- Residentes de la provincia de Misiones que resulten caso sospechoso de leishmaniosis.
- Pacientes a los que se le extrajo muestras clínicas de sangre entera y PAMO o biopsia.
- Pacientes que presentaron autorización de uso del material clínico para estudios de caracterización molecular del agente etiológico.
- Sujetos con al menos un resultado positivo en alguna de las siguientes técnicas: inmunocromatografía, examen parasitológico directo y/o PCR.
- Pacientes que poseían una ficha clínico-epidemiológica cumplimentada por el profesional médico tratante.

#### **III.2.3.3. Encuestas epidemiológicas humanos**

Los médicos cumplimentaron las fichas clínico-epidemiológicas en las que asentaron los datos epidemiológicos y clínicos del paciente. Los datos epidemiológicos recogidos fueron los siguientes: Nombre y apellido del paciente, DNI, fecha de toma de la muestra, fecha de nacimiento del paciente, sexo, localidad en la cual reside. Los siguientes síntomas y signos clínicos recogidos fueron los que siguen: fiebre, pérdida de peso, hepatomegalia, esplenomegalia, palidez, ictericia, edema, ascitis, nódulos linfáticos. En el Anexo IV se encuentra un modelo de la ficha clínica utilizada para recoger los datos epidemiológicos de los pacientes.

#### **III.2.3.4. Muestras clínicas de humanos**

Las muestras de sangre fueron tomadas por el personal de salud de la institución a la cual acudió el paciente. Estas consistieron en tres mililitros de sangre periférica en tubos de plástico. Los tubos con sangre fueron centrifugados por 5 minutos a 6.000 rpm para recuperar el suero.

El médico tratante fue quién recolectó las muestras de PAMO en el caso de sospecha de LV o biopsia de úlceras en el caso de sospecha de LC. Para tomar la muestra de biopsia, se seleccionaron úlceras que presentaban bordes activos, y se realizó una pequeña incisión con bisturí estéril. La biopsia fue colocada en un tubo con etanol absoluto. Para la recolección de la muestra de PAMO, se tomó 1,5 ml de muestra en una jeringa con EDTA. Los recipientes con las muestras fueron enviados al Laboratorio de Parasitología.

Los tubos con ADN extraído fueron almacenados en congelador a -20°C hasta que fue realizada la amplificación.

Todos los tubos fueron rotulados según un código que se otorgó al paciente al llegar su material al Laboratorio de Parasitología, siendo desvinculados de los datos nominales.

#### **III.2.3.5. Consideraciones éticas con humanos**

El consentimiento informado de los pacientes avaló la realización de técnicas diagnósticas para la identificación de especie de *Leishmania*. El laboratorio recibió los datos de la clínica del paciente, así como estudios anteriores, tanto para leishmaniosis como otras patologías y datos de importancia epidemiológica. El laboratorio no recibió datos que identifiquen al paciente (nombre, DNI, dirección, teléfono, etc.). El modelo del consentimiento informado utilizado en el Hospital Escuela de Agudos "Ramón Madariaga" para estudios de LV se encuentra en el Anexo V.

#### **III.2.4. Diagnóstico de laboratorio**

En canes y humanos fueron utilizadas distintas técnicas para el diagnóstico. Las distintas técnicas fueron realizadas en doble ciego.

#### III.2.4.1. Métodos serológicos

En las muestras de suero de humanos se realizó una ICT (metodología en Anexo VI) “Kalazar Detect™ Rapid test” de InBIOS International, Seattle, WA para humanos.

Mientras que con suero de los canes se realizó IFI (metodología en Anexo VII) e ICT. Se utilizaron tiras reactivas “Kalazar Detect™ Rapid test”, InBIOS International, Seattle, WA para perros.

#### III.2.4.2. Observación microscópica

El diagnóstico parasitológico a través de la observación microscópica solo se realizó con las muestras humanas. En las muestras caninas no se realizaron observaciones al microscopio óptico.

Se realizaron extendidos de las muestras clínicas humanas coloreadas con Giemsa para visualización al microscopio óptico a 100x.

Los extendidos se realizaron en el Laboratorio de Parasitología de la siguiente manera: Del tubo con el material se tomó una gota con una pipeta Pasteur y se depositó sobre un portaobjetos limpio y desengrasado. Se colocó otro portaobjeto a 45° y se deslizó suavemente para realizar el extendido. Se dejó secar 15 minutos y se fijó la muestra con metanol absoluto diez minutos. Luego se cubrió con Giemsa por veinte minutos y tras un lavado, se dejó secar y se montó al microscopio.

En caso de visualización de amastigotes se consideró muestra positiva.

#### III.2.4.3. Métodos moleculares

Las muestras de ganglio poplíteo de los canes fueron rehidratadas y a continuación sometidas a extracción de ADN mediante el método de Fenol/Cloroformo. Las muestras clínicas de humanos fueron extraídas por columna de extracción (*Nucleic acid and protein purification de NucleoSpin® Tissue*), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Las muestras de ADN de humanos y canes fueron procesadas por el mismo método: se realizó una amplificación por PCR de la región ITS-1 para identificar género *Leishmania* y a continuación se realizó una digestión enzimática con la enzima *HaeIII* para determinar la especie.

#### **III.2.4.3.1. Rehidratación de las muestras en etanol**

Previa extracción de ADN la muestra fue rehidratada de la siguiente manera:

1. Se centrifugó el aspirado de ganglio con etanol a 6000 rpm por 10 min.
2. Se eliminó el etanol con pipeta.
3. Se resuspendió el sedimento en 1ml de PBS 1x.
4. Se centrifugó a 6000 rpm por 10 min.
5. Se eliminó el PBS 1x con pipeta.
6. Se repitió el lavado con PBS una vez.
7. Se resuspendió el sedimento en 400 µl de solución tampón NET10 (Cloruro de sodio 1 M, EDTA 0,5 M, Tris-ácido clorídrico 1 M).

#### **III.2.4.3.2. Extracción de ADN de muestras de canes**

La extracción de ADN en muestras biológicas de perros se realizó utilizando el método con fenol-cloroformo y precipitación con etanol siguiendo las indicaciones de "Maizels" con ligeras modificaciones (Maizels y col., 1991).

1. En un tubo se colocó 200 µl de aspirado de ganglio.
2. Se añadió 400 µl de NET10 + 40 µl de SDS 10% + 4 µl de Proteinasa K (20 mg/ml).
3. Se incubó a 56°C toda la noche en agitación.
4. Se añadió 500 µl de fenol/cloroformo/isoamilalcohol (25/24/1). Se mezcló por inversión diez veces.
5. Se centrifugó a 13000 rpm por 6 min.
6. Se recuperó la fase acuosa (limpia) sobre un tubo nuevo con 500 µl de fenol/cloroformo/isoamilalcohol (tubo A). Se mezcló 10 veces por inversión.
7. Al tubo de la fase sucia (tubo B) se agregó 400 µl de fenol/cloroformo/isoamilalcohol + 100 µl de NET10 + 20 µl de SDS 10%. Se mezcló 10 veces por inversión.
8. Se centrifugó el tubo B a 13000 rpm por 6 min.
9. Se recuperó la fase acuosa (limpia) del tubo A. Luego se mezcló 10 veces por inversión.
10. Se centrifugó a 13000 rpm por 6 min.
11. Se recuperó la fase acuosa en un tubo con 700 µl de etanol absoluto + 30 µl de Acetato de Sodio 3M. Luego se mezcló 10 veces por inversión.

12. Se guardó 20 min a -80/-70°C o toda la noche a -20°C.
13. Se centrifugó a 13000 rpm por 6 min.
14. Se descartó el sobrenadante y se añadió 1ml de etanol 70%. Se mezcló 10 veces por inversión.
15. Se centrifugó a 13000 rpm por 6 min.
16. Se descartó el sobrenadante
17. Se secó en baño termostático a 56°C por 20 min.
18. Se resuspendió en 100 µl de agua estéril.

#### III.2.4.3.3. PCR ITS-1

Se realizó una amplificación del blanco ITS-1 utilizando el protocolo desarrollado por Schonian, con ligeras modificaciones (Schonian y col., 2003). La PCR se realizó en un volumen final de 50 µl con 10 µl de ADN. Se utilizó una ADN polimerasa *taq* recombinante de Pegasus. Los cebadores utilizados fueron:

LITSR: 5´- CTG GAT CAT TTT CCG ATG -3´

L5.8S: 5´- TGA TAC CAC TTA TCG CAC TT -3´

Las concentraciones finales de la reacción de PCR fueron las siguientes: Magnesio 25 mM, dNTP 10, cebadores 10 µM, 0,14 U/µl de ADN polimerasa y 5 µl de ADN.

Se utilizó un termociclador MultiGene™ Mini de Labnet International Inc. Las condiciones del ciclador fueron: 5' 94°C, 35 x (30" 94°C, 30" 53°C, 30" 72°C), 5' 72°C, 4°C.

Para la electroforesis, se corrieron 10 µl del producto de amplificación en 50 ml de tampón TBE 1x con gel de agarosa 2% teñido con 10 µl bromuro de etidio. La electroforesis se realizó por 60 minutos a 140 voltios. El producto esperado se encontraba entre los 300 - 350 pb.

#### III.2.4.3.4. Digestión enzimática (PCR-RFLP)

La PCR-RFLP de ITS-1 se realizó con la enzima *HaeIII* (5000 U a 1 U/µl, de laboratorios In bios). Se preparó una prueba con 1 µl de enzima y otra con 1,5 µl de enzima. Ambos ensayos se realizaron a volumen de reacción de 20 µl con 17 µl de ADN. Estos ensayos se prepararon por duplicado.

Fueron ensayados varios tiempos de incubación: 3, 6, 8 y 16 horas a 37°C en un baño termostático. Luego, los productos se visualizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 3%, teñido con bromuro de etidio. La corrida se realizó por 2 horas y 10 minutos a 80 voltios y 30 minutos a 100 voltios. El gel fue fotografiado por una cámara de celular de 5 megapíxeles y un filtro fotográfico naranja. Los patrones obtenidos de la digestión fueron comparados con patrones de referencia.

### **III.2.5. Procesamiento y análisis de datos**

Los datos colectados fueron volcados hojas de cálculo de Google y los gráficos fueron construidos con el mismo programa.

## **III.3. Resultados y discusión**

### **III.3.1. Canes**

#### **III.3.1.1 Datos clínico epidemiológicos de los canes**

Se incluyeron 18 perros con LCan en el estudio pertenecientes a las ciudades de Posadas (5) y Puerto Iguazú (13), de los cuales el 50% (9/18) eran machos. Esto es similar a lo encontrado en otro estudio realizado en la ciudad de Posadas, donde el 54% de los canes estudiados eran machos. Sin embargo, otros autores han encontrado un mayor número de machos en sus estudios (Cruz y col., 2010; Acosta, 2013; Barroso y col., 2015).

De los perros estudiados, el 78% (14/18) eran mestizos. Esto se corresponde con lo observado en otros estudios; en 2013 en Bompland (Misiones), donde se encontró que el 92% de los perros incluidos en ese estudio eran mestizos, en el 2009 en la ciudad de Posadas se encontró que el 73% de los perros infectados eran mestizos. Sin embargo, en otro estudio realizado en la ciudad de Posadas en el 2015, donde solo el 16% eran mestizos. Estas diferencias pueden deberse a que en los dos primeros estudios se realizaron un muestreo aleatorio, mientras que el segundo se realizó con perros que concurrieron a consulta veterinaria (Acosta, 2013; Gutiérrez, 2013; Barroso y col., 2015).

Se encontró que más del 50% (9/18) de los perros infectados tenían entre uno y cuatro años de edad, siendo esta franja etaria la más afectada, resultados similares se observaron en un estudio de prevalencia de LCan en Posadas realizado en el año 2010 donde se reportó un 68% de infectados en el mismo grupo etario. Esto podría deberse al estado del desarrollo inmune incompleto en esta franja etaria canina, mientras que los perros menores de un año tienen un menor tiempo de exposición, y por tanto menor probabilidad de contagio (Acosta, 2013).

En la Figura 5 se observan los signos estudiados en el grupo de canes y sus frecuencias. En los perros estudiados, el 67% (12/18) resultaron sintomáticos, y los signos clínicos más frecuentes fueron las adenopatías (61%), pérdida de peso (39%) y onicogrifosis (33%). Lo cual resulta en diferentes porcentajes a lo observado en un estudio de perros sintomáticos (N=76) con LCan realizado en Posadas, donde el 89,5% presentaron adenopatías, 50% pérdida de peso y se observó onicogrifosis en el 6,8%. Posiblemente esto pudo estar influenciado por el método de selección de los perros incluidos en cada estudio, ya que el estudio realizado en Posadas utilizó un muestreo aleatorio simple y el estudio de Puerto Iguazú, un muestreo estratificado (Acosta, 2013). Según una revisión sobre leishmaniasis realizada por Baneth, onicogrifosis es un síntoma encontrado en el 20 - 31% de los perros infectados y los nódulos linfáticos en el 62 - 90%, datos acordes con lo encontrado en el presente estudio (Baneth y Aroch, 2008).

En general podría afirmarse que los cuadros clínicos de los perros estudiados, en coincidencia con lo señalado por OMS, en base a numerosos informes de expertos, la mayoría de los perros sintomáticos y con sospecha de LV resultan inespecíficos en sus manifestaciones clínicas (OMS, 2010).

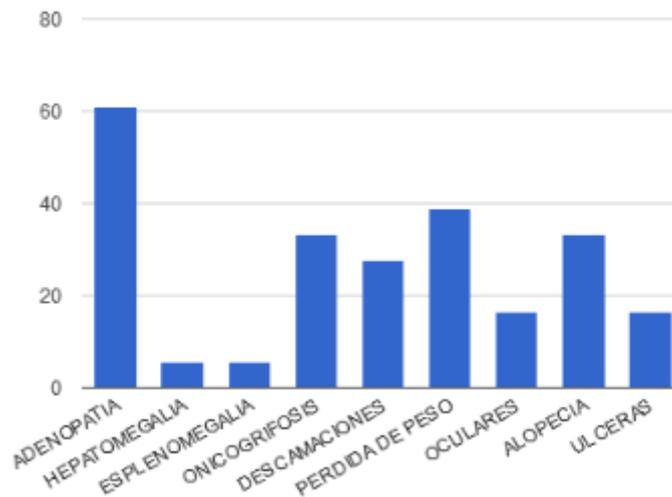


Figura 5. Signos clínicos observados en perros y sus frecuencias en porcentaje.

En este estudio, aunque la muestra es pequeña, se observó que varios perros infectados (40%) no presentaron ningún signo clínico (perros asintomáticos), esto ya fue señalado en numerosos estudios previos por otros autores (OMS, 2002; Manna y col., 2004).

El diagnóstico basados en técnicas serológicas y en signos clínicos de los canes no detecta los perros seronegativos con infección subclínica (Mateo, 2007). Tanto en Bahía (Brasil) como en Creta (Grecia) se ha observado que la eliminación de los perros seropositivos no reduce la incidencia de la leishmaniosis, y actualmente siguen sufriendo un incremento constante (Moreira y col., 2004; Antoniou y col., 2009).

### III.3.1.2. Resultados de laboratorio en canes

Los patrones obtenidos por PCR-RFLP fueron comparados con patrones de referencias encontrados en la literatura. En la Figura 6 se observa un gel de agarosa con el patrón de bandas obtenido de la digestión de la región ITS-1 con la enzima *HaeIII*.

En la Tabla 1 se observan los resultados de laboratorio por can estudiado. En la Tabla puede observarse que los resultados de secuenciación y de PCR-RFLP coinciden en un 100%.

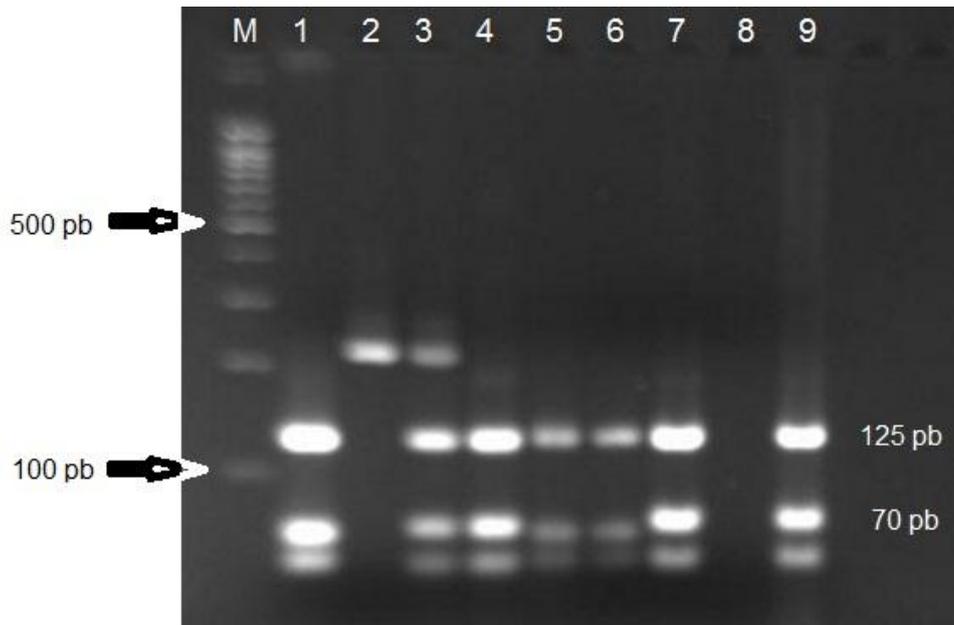


Figura 6. Patrón de bandas resultado de la digestión enzimática.

M: marcador de peso molecular. Las flechas marcan las bandas de 500 y 100 pb; 1: control positivo; 2: control negativo; 3 a 7 muestras positivas; 8: control negativo de la digestión; 9: control positivo. Los productos obtenidos resultaron tres bandas, como se esperaba para *L. infantum*, la primera de aproximadamente 125 pb y las otras dos de aproximadamente 70 pb.

En la Figura 7 se observan los patrones de referencias de algunas especies de *Leishmania* obtenidos por digestión de la región ITS-1 con la enzima *HaeIII* (Schonian y col., 2003).

En la Figura 8 se muestra la distribución porcentual los resultados de las pruebas de laboratorio utilizadas en canes.

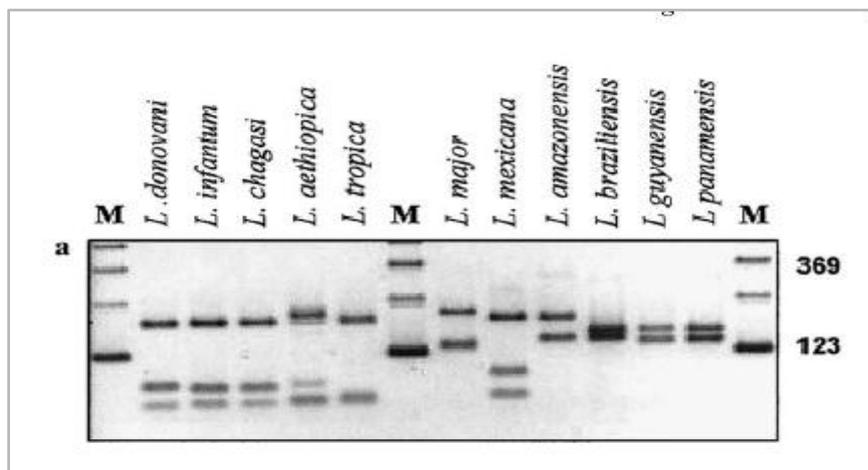


Figura 7. Patrones de bandas utilizados como referencia pertenecientes a varias especies. Tomado de Schönian y col. 2003.

Tabla 1. Resultados de las pruebas de laboratorio por can estudiado.

Código	Clínica	rk39	IFI	PCR-anidada	PCR-RFLP	Secuenciación
1	As	NEG	NEG	P	<i>L. infantum</i>	<i>L. infantum</i>
2	SC	P	P	P	<i>L. infantum</i>	<i>L. infantum</i>
3	SC	NEG	NEG	P	<i>L. infantum</i>	<i>L. infantum</i>
4	As	P	P	P	<i>L. infantum</i>	<i>L. infantum</i>
5	SC	P	P	P	<i>L. infantum</i>	<i>L. infantum</i>
6	SC	P	P	P	<i>L. infantum</i>	<i>L. infantum</i>
7	As	P	P	P	<i>L. infantum</i>	<i>L. infantum</i>
8	SC	P	P	P	<i>L. infantum</i>	<i>L. infantum</i>
9	As	NEG	P	P	<i>L. infantum</i>	<i>L. infantum</i>
10	As	P	P	P	<i>L. infantum</i>	<i>L. infantum</i>
11	As	P	P	P	<i>L. infantum</i>	<i>L. infantum</i>
12	SC	P	P	P	<i>L. infantum</i>	<i>L. infantum</i>
13	SC	P	P	P	<i>L. infantum</i>	<i>L. infantum</i>
14	SC	P	P	P	<i>L. infantum</i>	<i>L. infantum</i>
15	SC	P	P	P	<i>L. infantum</i>	<i>L. infantum</i>
16	SC	P	P	P	<i>L. infantum</i>	<i>L. infantum</i>
17	SC	P	P	P	<i>L. infantum</i>	<i>L. infantum</i>
18	SC	NEG	NEG	P	<i>L. infantum</i>	<i>L. infantum</i>

As: asintomático; AC: síntomas compatibles; P: positivo; NEG: negativo.

Fue identificado *L. infantum* como agente etiológico de la LCan en 18 de los perros estudiados mediante la técnica PCR-RFLP y confirmado por secuenciación. Este es el primer reporte de la presencia de *L. infantum* en perros de la ciudad de Puerto Iguazú.

La caracterización molecular de género por PCR es de alta sensibilidad para todas las especies de *Leishmania*, y siendo el departamento Puerto Iguazú, un área históricamente endémica para leishmaniasis cutánea (asociada a la circulación de *L. braziliensis*), es esperable que además de esta circulen otras especies del género *Leishmania*.

La PCR-anidada mostró una alta sensibilidad y especificidad, resultando la técnica con mayor sensibilidad utilizada en este estudio, coherente con lo reportado en la literatura (Fisa y col., 2002; Manna y col., 2004; Cruz y col., 2013; Barroso y col., 2015).

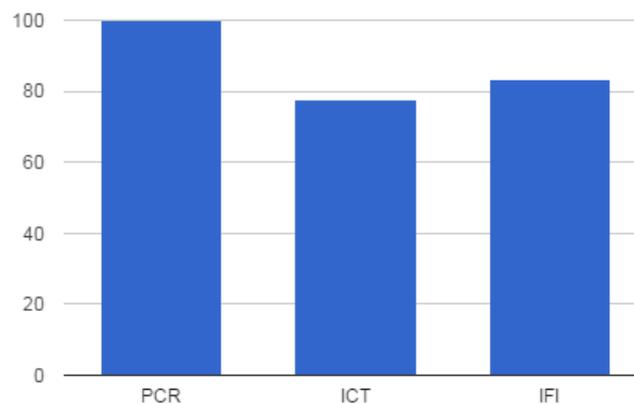


Figura 8. Distribución porcentual de los positivos de las técnicas de laboratorio utilizadas en perros.

La PCR-RFLP resultó una técnica de identificación sencilla y rápida, si se compara con la demostración directa del parásito a partir de cultivo, citando la bibliografía: "...el cultivo *in vitro* es una técnica ligeramente más sensible que la examinación microscópica de extendidos de biopsia o muestras histológicas, pero son muy laboriosas, costosas y susceptibles de contaminación microbiológica" (Manna, 2004).

La IFI registró un positivo más que la ICT. La sensibilidad de las ICT (78%) resultó muy similar a lo observado en otros estudios, donde se

sensibilidad de la ICT estuvo entre el 80-90% (Antinori y col., 2007; Fraga y col., 2010; Assis, 2011).

Los resultados de las pruebas serológicas en canes mostraron una buena concordancia, debido a que se obtuvo el mismo resultado en 17 de 18 individuos (94,4% de concordancia).

La LCan asociada a *L. infantum* se encuentra fuertemente instalada en la Provincia de Misiones incluyendo a Puerto Iguazú (donde se reportó el primer caso en el 2015) aunque las prevalencias obtenidas difieren significativamente y de modo superior en localidades donde se registraron casos humanos. Un estudio realizado en perros de la ciudad de Posadas, Departamento Capital, en el año 2010 reportó una prevalencia de 22,3% (Acosta, 2013) y uno más reciente realizado en Bonpland, Departamento Candelaria, en el que se reportó una prevalencia del 22% (Gutiérrez y col., 2013). En el 2014 se realizó un estudio de seroprevalencia en Concepción de la Sierra, departamento Concepción, encontrándose que el 14,4% de los canes estudiados estaban infectados (Parafiniuk y col., 2015). La diferencia entre las prevalencias es soporte para la teoría de una reciente introducción de *L. infantum* en la ciudad de Puerto Iguazú.

### **III.3.2. Humanos**

#### **III.3.2.1. Datos clínico epidemiológicos de los humanos**

Se incluyeron en el estudio 28 pacientes pertenecientes a la provincia de Misiones.

- Población con LV 2010-2016: 61 (según el Informe Epidemiológico Semanal del Ministerio de Salud de la provincia de Misiones, semana 20 de 2016).
- Muestra de pacientes con LV en estudio: 24 (representando un 39,34% del total de casos ocurridos en el período en Misiones).

De los pacientes estudiados, predominaron en el estudio individuos del sexo masculino, siendo estos el 78,5% (22/28) de los casos, en contraste con lo encontrado en la literatura, donde no se ha descrito una predilección por el sexo. Siendo pequeño el tamaño de la muestra, esto podría no estar reflejando

la situación real de la enfermedad en el área de estudio (Cortés, 2006, Diniz, 2008).

Sin embargo el reporte de la OMS para el 2010, reconoce que en muchos centros de salud existe diferencia entre la proporción de hombres y mujeres infectados, pero que probablemente se deba a diferencias en el acceso al sistema de salud. Además puntualiza que en el pasado, las leishmaniosis en las américas han sido históricamente enfermedades ocupacionales. Aunque las predisposiciones ocupacionales siguen teniendo importancia, la presencia del vector en el ambiente peridoméstico ha llevado a un rápido aumento en el número de casos de personas que no tienen esta predisposición (OMS, 2010).

El grupo etario más afectado incluía a los pacientes menores de seis años (21,5%; 6/28), lo que coincide con lo reportado por la OMS en base datos oficiales de otros países endémicos y con las publicaciones de la dirección de epidemiología de la Nación, donde expresan que el 90% de los casos ocurre en niños menores de 10 años. Aunque en nuestro estudio, no encontramos casos de niños entre 6 y 10 años (Ministerio de Salud de la Nación, 2010; OMS, 2015).

La Figura 9 expresa la distribución porcentual de pacientes por localidad de residencia en la provincia de Misiones. De los 28 pacientes estudiados, la mayor parte de estos pertenece a Posadas (32%; 9/28), seguido de Oberá y San Ignacio con el 21,5% (6/28).

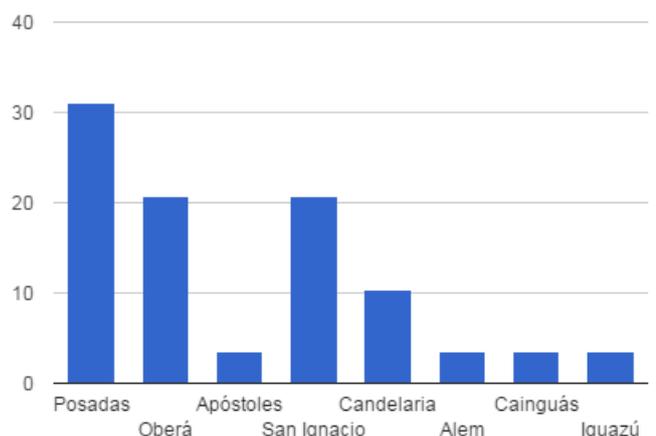


Figura 9. Distribución porcentual de los pacientes y sus localidades.

La Figura 10 muestra la distribución porcentual de los signos y síntomas. El síntoma más frecuente entre los 28 pacientes estudiados, fue el síndrome febril prolongado (21/28) con el 75%, seguido de esplenomegalia, con el 60,7% (17/28) de los pacientes. El 50% (14/28) presentó hepatomegalia, el 39% (11/28) pérdida de peso, Palidez el 28,5% (8/28), el 14% (4/28) presentó úlceras, el 7% (2/28) presentaba nódulos linfáticos, 7% (2/28) ictericia y el 3,5% (1/28) presentaba edemas. Ninguno de los pacientes presentó ascitis.

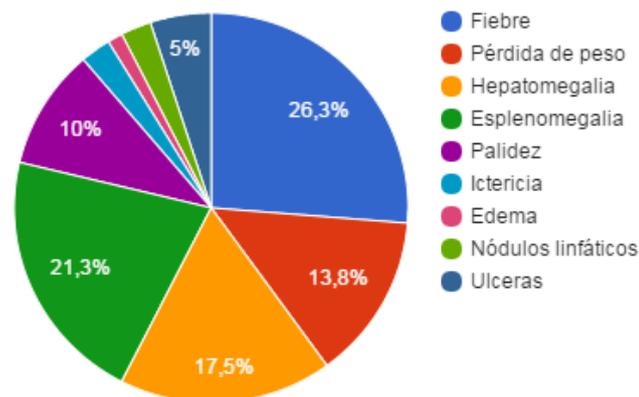


Figura 10. Signos y síntomas observados en los pacientes estudiados.

Solo un paciente incluido resultó asintomático y ninguno presentó todos los síntomas; dos pacientes presentaron seis síntomas en simultáneo.

El paciente asintomático es un caso notificado como LV congénita, un neonato cuya madre fue diagnosticada con LV durante el embarazo. El neonato de nuestro estudio resultó positivo a las pruebas serológicas y a la evaluación de frotis en la PAMO, aunque los resultados de la PCR, PCR-RFLP y secuenciación fueron negativos. Los resultados serológicos positivos en estos neonatos podrían resultar del pasaje transplacentario de anticuerpos maternos. La negatividad de los resultados moleculares y la ausencia de síntomas plantean la posibilidad de que este no fuera realmente un caso de LV congénita (Meinecke y col., 1999; Figueiró-Filho y col., 2004; Machado y col., 2013).

Existen evidencias de trasmisión vertical de LV aunque resulta un hecho poco frecuente. La OMS reconoce la transmisión congénita como una forma de

transmisión poco frecuente (OMS, 2010). Varios autores concuerdan en la baja sensibilidad de la evaluación de frotis en la PAMO y la necesidad de recurrir a pruebas moleculares para confirmar la infección (Meinecke y col., 1999; Figueiró-Filho y col., 2004; OMS, 2010; Machado y col., 2013).

### III.3.2.2. Resultados de laboratorio de humanos

La Figura 11 resume los resultados obtenidos por las distintas pruebas de laboratorio. De los 28 pacientes estudiados, el 82% resultó positivos por PCR (23/28), 57% positivo mediante frotis (16/28) y 78,5% por ICT (22/28).

La especie *L. infantum* fue identificada como agente etiológico de la LV en 19 pacientes estudiados mediante la técnica PCR-RFLP y confirmado por secuenciación. Este es el primer estudio que vincula a *L. infantum* como el agente etiológico de esta enfermedad en pacientes humanos de la Provincia de Misiones.

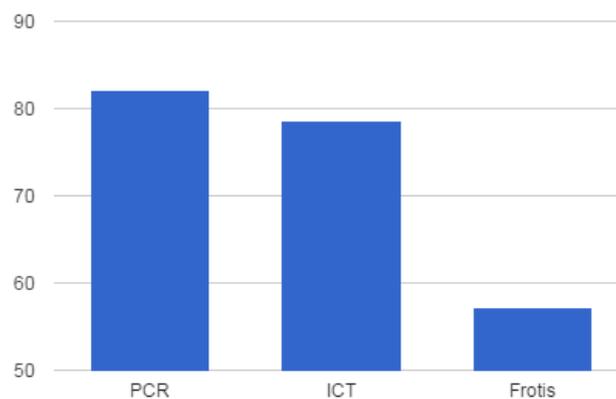


Figura 11. Distribución porcentual de los positivos de las técnicas de laboratorio utilizadas en el estudio.

Los resultados obtenidos por ICT coincidieron con los resultados de PCR en el 60,7% de los casos, mientras que los resultados de Frotis coincidieron en un 53,5% tanto con ICT como con PCR. En la Tabla 2 se presentan los datos por paciente. En esta tabla puede observarse como los casos de LC resultaron negativos en su totalidad a la técnica de ICT y frotis, mientras que la PCR resultó positivo en los cuatro casos.

En coincidencia con lo observado por diversos autores el rango de sensibilidad observado en la muestra estudiada de pacientes humanos con

confirmación clínica de LV de Misiones se asemeja a los resultados obtenidos en técnicas moleculares por otros autores para esta patología (85 - 95%) (Cruz y col., 2006b; Antinori y col., 2007; Roelfsema y col., 2010; Fraga y col., 2010; Cruz y col., 2013; Barroso y col., 2015; Marco y col., 2015).

La técnica ICT es considerada junto a los síntomas clínicos una prueba de referencia para confirmar los casos humanos de pacientes con LV en Argentina. Esta técnica resultó con un alto porcentaje de positivos (78,5%).

Al considerar los 24 pacientes con cuadro clínico de LV, el ICT resultó positivos en el 91,67%. Esto resultó coherente en los casos en que el agente etiológico fue *L. braziliensis*, donde la muestra resultó negativa para ICT.

En los casos en que el agente etiológico de la LC es *L. infantum* la ICT pudo resultar negativo debido a que el sistema inmune del hospedador respondió del mismo modo que lo hace con *L. braziliensis*.

El porcentaje de frotis positivos en las muestras clínicas resultó (57%) inferior que la ICT, aunque diversos autores señalan una sensibilidad mayor para esta prueba de entre el 80-90% (Antinori y col., 2007; Fraga y col., 2010; Assis, 2011; Mohammadiha y col., 2013).

En los estudios de PCR se observaron resultados positivos (79%) utilizando 5 µl de ADN purificado de la muestra clínica. Durante los ensayos de optimización de la técnica se observó que menores cantidades de muestra no presentaba resultados tan nítidos como al utilizar 5 µl de ADN. Al repetir el procedimiento con 10 µl de muestra tampoco se lograron mejores resultados.

Es de destacar que estos resultados en un número de pacientes no representativo muestran una tendencia que concuerda con lo reportado por diversos investigadores, quienes señalan que en pacientes con LV las técnicas moleculares poseen mayor sensibilidad que otras pruebas parasitológicas, como por ejemplo la técnica de tinción de frotis a partir de PAMO o el cultivo (Cruz y col., 2006b; Antinori y col., 2007).

Se incluyeron en el estudio 4 individuos con clínica compatible con LC. Estos individuos presentaban lesiones ulcerosas en cara y brazos. De estos individuos, en dos se identificó como agente etiológico a *L. braziliensis*, y en dos el agente etiológico identificado fue *L. infantum*. Esto resalta la importancia de la identificación de especie en los individuos infectados, debido a que afecta a la interpretación epidemiológica de estas patologías y la posibilidad de las

consecuencias de sus evoluciones tórpidas un tiempo después de la curación de la lesión cutánea inicial al hecho.

Tabla 2. Resultados de las técnicas de laboratorio en cada paciente.

Paciente	Diagnóstico	ICT	FROTIS	PCR-anidada	PCR - RFLP	Secuenciación
1	LV	P	NEG	P	<i>L.infantum</i>	<i>L.infantum</i>
2	LV	P	P	P	<i>L.infantum</i>	<i>L.infantum</i>
3	LV	P	P	NEG		
4	LV	P	P	P	<i>L.infantum</i>	<i>L.infantum</i>
5	LV	P	NEG	NEG	-	-
6	LV	P	NEG	NEG	-	-
7	LV	P	NEG	P	<i>L.infantum</i>	<i>L.infantum</i>
8	LV	P	P	P	<i>L.infantum</i>	<i>L.infantum</i>
9	LV	P	P	P	<i>L.infantum</i>	<i>L.infantum</i>
10	LV	P	P	P	<i>L.infantum</i>	<i>L.infantum</i>
11	LV	P	P	P	<i>L.infantum</i>	<i>L.infantum</i>
12	LV	P	P	NEG	-	-
13	LV	NEG	NEG	P	<i>L.infantum</i>	<i>L.infantum</i>
14	LV	P	P	P	<i>L.infantum</i>	<i>L.infantum</i>
15	LV	P	NEG	P	<i>L.infantum</i>	<i>L.infantum</i>
16	LV	P	NEG	P	<i>L.infantum</i>	<i>L.infantum</i>
17	LV	P	P	NEG	-	-
18	LV	P	P	P	<i>L.infantum</i>	<i>L.infantum</i>
19	LV	P	P	P	<i>L.infantum</i>	<i>L.infantum</i>
20	LV	P	P	P	<i>L.infantum</i>	<i>L.infantum</i>
21	LV	P	P	P	<i>L.infantum</i>	<i>L.infantum</i>
22	LV	P	P	P	<i>L.infantum</i>	<i>L.infantum</i>
23	LV	NEG	P	P	<i>L.infantum</i>	<i>L.infantum</i>
24	LV	P	NEG	P	<i>L.infantum</i>	<i>L.infantum</i>
25	LC	NEG	NEG	P	<i>L.infantum</i>	<i>L.infantum</i>
26	LC	NEG	NEG	P	<i>L.infantum</i>	<i>L.infantum</i>
27	LC	NEG	NEG	P	<i>L. braziliensis</i>	<i>L. braziliensis</i>
28	LC	NEG	NEG	P	<i>L. braziliensis</i>	<i>L. braziliensis</i>

Según la OMS, los casos de LC por *L. infantum* suelen ocurrir en América central, así como también en áreas endémicas para LV. Entre los más afectados se cuentan los niños jóvenes y jóvenes adultos, mientras que LV ataca principalmente a niños menores de 5 años (OMS, 2010).

En España se informó de un brote de leishmaniosis humana donde se observaron casos de LV y LC que afectó a todos los grupos etarios en municipios del suroeste de la Comunidad de Madrid. El brote fue causado por la especie *L. infantum* (Rodríguez y col., 2012; Chicharro y col., 2013).

Aún más recientemente, un estudio realizado en Yemen detectó ADN de *L. infantum* mediante RCP-RFLP en un 3,5% de muestras clínicas de pacientes de LC (Khatri y col., 2016). Resultados similares se encontraron en Colombia (Ramírez y col., 2016).

Se reportó durante el 2016 un caso en Senegal de coinfección VIH y *L. infantum*. Un niño de 5 años presentó un cuadro de LC: lesiones ulcerosas del cuero cabelludo y el antebrazo izquierdo, junto con axilar y adenopatías cervicales presentes durante dos meses. Se identificó *L. infantum* mediante PCR de muestras de piel, los ganglios linfáticos y la médula ósea (Diatta y col., 2016).

Ese mismo año se reportó otro caso de LC multifocal producida por *L. infantum* en un niño inmunocompetente de diez meses. Este presentaba nódulos ulcerados en rostro y extremidades superiores (Taquin y col., 2016). En ambos casos en infantes el cuadro clínico resultó diferente al típico de LC y no concuerda con el cuadro observado en los pacientes incluidos en este estudio.

### **III.3.3. Discusión final**

El movimiento migratorio en puntos como Posadas o Puerto Iguazú podría haber favorecido la ocurrencia de LV en la provincia ya que en los países vecinos, Paraguay y Brasil, la LV se ha establecido; además la presencia del vector aumenta la posibilidad de transmisión de esta enfermedad en humanos (Peres y col., 2010; Gómez, 2013).

La urbanización del vector, la existencia de reservorios susceptibles (perros) y la ocurrencia de la enfermedad en Paraguay y Brasil permiten

estimar la permanencia y continuidad de esta enfermedad emergente en la región (Cruz y col., 2010).

La transferencia de la técnica de PCR para el diagnóstico de las leishmaniosis realizada a la Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales, Laboratorio de Parasitología, fortalece las capacidades del Ministerio de Salud de la Provincia y en particular para el Hospital Escuela de Agudos “Ramón Madariaga”, debido a que el flujo de muestras con la el Laboratorio de Parasitología se encuentra estandarizado y es constante. Otro organismo que cuenta con esta herramienta a su disposición es el IMuSA, quienes requieren de esta técnica al recibir un caso sospechoso de LCan.

Se recomienda utilizar la PCR para el diagnóstico de las leishmaniosis humanas debido a su alta sensibilidad. Esto mejoraría las medidas de prevención y control de la enfermedad tanto en canes como en humanos, al permitir una detección temprano de la infección y de casos asintomáticos; la detección temprana permite el tratamiento de las personas y reduce la morbilidad y mortalidad de la enfermedad.

La detección de los casos caninos asintomáticos es un factor importante en la eliminación de la enfermedad, debido a que pueden transmitir el parásito y no son tratados ni eliminados.

En este trabajo todos los casos de LCan fueron causados por *L. infantum*, sin embargo fueron encontrados casos humanos donde *L. infantum* producía cuadros clínicos atípicos (LC).

Ante la sospecha de LC el protocolo vigente en el Hospital Escuela de Agudos “Ramón Madariaga” incluye un estudio de ICT, esto resultaría poco apropiado debido a que en los casos de LC las pruebas serológicas son poco eficientes. Cabe mencionar que estos son los primeros resultados de cuadros atípicos de LC encontrados en la Argentina. Se necesitaría un mayor número de pacientes para estudiar la tendencia de estos resultados.

### III.4. Conclusiones

- De nuestra investigación bibliográfica, esta es la primera identificación por PCR-RFLP y confirmación mediante secuenciación, la presencia del ADN del género *Leishmania* en canes de la localidad de Puerto Iguazú.
- Todos los canes presentaron un patrón de bandas que se corresponde con la especie *L. infantum* mediante la técnica de PCR-RFLP, resultando los primeros estudios moleculares que confirman la circulación de esta especie en la población canina de Puerto Iguazú.
- En los 24 pacientes humanos notificados al sistema de vigilancia como pacientes confirmados de LV, los estudios moleculares identificaron en 21 pacientes la presencia de ADN de *L. infantum* mediante PCR-RFLP y secuenciación, contribuyendo a la confirmación etiológica de los casos.
- En los 4 pacientes humanos notificados al sistema de vigilancia como pacientes confirmados de LC los estudios moleculares identificaron la presencia de ADN de *L. braziliensis* mediante PCR-RFLP y secuenciación en 2 de estos pacientes y ADN de *L. infantum* en los otros 2, contribuyendo a la confirmación etiológica de los casos.
- El neonato incluido en este estudio podría no haber sido un caso de LV congénita debido a la ausencia de síntomas y el hecho de que los estudios moleculares resultaron negativos.
- El brote del 1998 podría no haber sido causado por *L. braziliensis*.
- De nuestra investigación bibliográfica, este es el primer estudio donde se detectaron casos atípicos en pacientes con LC infectados por *L. infantum* en Argentina.
- Se ha logrado la transferencia exitosa de la técnica de detección molecular de ADN de *Leishmania* y caracterización de especie.
- En el presente estudio se observó que los resultados de la PCR-RFLP coincidieron en un 100% con los resultados de secuenciación. Implementar la PCR-RFLP a los casos confirmados de leishmaniosis contribuiría a la investigación de especie.

### III.5. Referencias Bibliográficas

- Acardi SA, Liotta DJ, Santini MS, Romagosa CM, Salomón OD. Detection of *Leishmania infantum* in naturally infected *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) and *Canis familiaris* in Misiones, Argentina: the first report of a PCR-RFLP and sequencing-based confirmation assay. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 2010; 105:796-799.
- Acosta, L. Epidemiología de la leishmaniosis canina en la ciudad de Posadas, Misiones, Argentina (Tesis doctoral). San Juan de Alicante, España: Universidad Miguel Hernández de Elche, 2013.
- Acosta L, Díaz Alarcón R, Torres P, Silva G, Ramos M, Fattore G, Deschutter EJ y Bornay-Llinares F. Identification of *Leishmania infantum* in Puerto Iguazú, Misiones, Argentina. *Revista del Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, 2015; 57(2):175-176.
- Acuña M, Cassaubon A y Bettinotti SI. Estudio anatómico-clínico de un caso de Kala Azar infantil (primera observación en nuestro país). *La Prensa Médica Argentina*, 1924; 11:585-593.
- Adaui V, Maes I, Huyse T, Van den Broeck F, Talledo M, Kuhls K, De Doncker S, Maes L, Llanos-Cuentas A, Schönian G, Arevalo J, Dujardin JC. Multilocus genotyping reveals a polyphyletic pattern among naturally antimony-resistant *Leishmania braziliensis* isolates from Peru. *Infection Genetics and Evolution: Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases*, 2011; 11, 1873–1880.
- Akopyants NS, Kimblin N, Secundino N, Patrick R, Peters N, Lawyer P, Dobson DE, Beverley SM y Sacks DL. Demonstration of genetic exchange during cyclical development of *Leishmania* in the sand fly vector. *Science*, 2009; 10;324(5924):265–8.
- Albrecht H. Leishmaniosis: new perspectives on an underappreciated opportunistic infection. *AIDS*, 1998; 12(16):2225-2226.
- Aleixo JA, Nascimento ET, Monteiro GR, Fernandes MZ, Ramos AM, Wilson ME, Pearson RD y Jeronimo SM. Atypical American visceral leishmaniasis caused by disseminated *Leishmania amazonensis* infection presenting with hepatitis and adenopathy. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 2006; 100(1):79-82.
- Alonso DP, Costa DL, Mendoca IL, Nery-Costa CH y Martins-Ribola PE. Short Report: Heterogeneity of *Leishmania infantum chagasi* Kinetoplast. *Am. J. Trop. Med. Hyg*, 2010; 82(5):819-821.

- Alvar J, Cañavate C, Molina R, Moreno J y Nieto J. Canine Leishmaniasis. *Adv Parasitol*, 2004; 57:1-88.
- Alvar J, Yactayo S y Bern C. Leishmaniasis and poverty. *Trends Parasitol*, 2006; 22:552-557.
- Alvar J, Vélez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, Jannin J y den Boer M. Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. *PLoS One*, 2012; 7(5):e35671.
- Aluru S, Hide M, Michel G, Bañuls AL, Pierre M y Pomares C. Multilocus microsatellite typing of *Leishmania* and clinical applications: a review. *Parasite* 2015; 22, 16.
- Antinori S, Calattini S, Longhi E, Bestetti G, Piolini R, Magni C, Orlando G, Gramiccia M, Acquaviva V, Foschi A, Corvasce S, Colomba A, Titone L, Parravicini C, Cascio A y Corbellino M. Clinical Use of Polymerase Chain Reaction Performed on Peripheral Blood and Bone Marrow Samples for the Diagnosis and Monitoring of Visceral Leishmaniasis in HIV-Infected and HIVUninfected Patients: A Single-Center, 8-Year Experience in Italy and Review of the Literature. *Clin Infect Dis*, 2007; 44(12):1602-1610
- Antoniou M, Messaritakis I, Christodoulou V, Ascoksilaki I, Kanavakis N, Sutton AJ, Carson C y Courtenay O. Increasing incidence of zoonotic visceral leishmaniasis on Crete, Greece. *Emerg Infect Dis*, 2009; 15:932-934.
- Aransay AM, Scoulica E y Tselentis Y. Detection and identification of *Leishmania* DNA within naturally infected sand flies by semi-nested PCR on minicircle kinetoplastic DNA. *Appl Environ Microbiol*, 2000; 66:1933-1938.
- Assis TSM, Braga AS, Pedras MJ, Oliveira E, Barral A, Siqueira IC, Costa CHN, Costa DL, Holanda TA, Soares VYR, Bía M, Caldas AJM, Romero GAF, Rabello A. Multi-centric prospective evaluation of rk39 rapid test and direct agglutination test for the diagnosis of visceral leishmaniasis in Brazil. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 2011; 105:81-85.
- Badaró R, Jones TC, Carvalho EM, Sampaio D, Reed SG, Barral A, Teixeira R y Johnson WD Jr. New perspectives on a subclinical form of visceral leishmaniasis. *J Infect Dis*, 1986; 154(6):1003-1011.
- Baleela R, Llewellyn MS, Fitzpatrick S, Kuhls K, Schönian G, Miles MA y Mauricio IL. *Leishmania donovani* populations in Eastern Sudan: temporal structuring and a link between human and canine transmission. *Parasite and Vectors*, 2014; 7:496.
- Baneth G y Aroch I. Canine leishmaniasis: a diagnostic and clinical challenge. *Vet J*, 2008; 175(1):14-15.

- Bañuls AL, Hide M y Prugnole F. Leishmania and the leishmaniasis: a parasite genetic update and advances in taxonomy, epidemiology and pathogenicity in humans. *Advances in Parasitology*, 2007; 64:1-109.
- Bernasconi VE. Contribución al estudio de la distribución geográfica de la leishmaniosis en la República Argentina. *Bol Inst Clin Quirurg (Buenos Aires)*, 1928; 15:325-328.
- Bernasconi VE. Consideraciones sobre el censo de leishmaniosis. *Rev Soc Pat Reg Norte*, 1930; 5: 590-602.
- Barral A, Costa JM, Bittencourt AL, Barral-Netto M y Carvalho EM. Polar and subpolar diffuse cutaneous leishmaniasis in Brazil: clinical and immunopathologic aspects. *Int J Dermatol*, 1995; 34(7):474-479.
- Barbieri CL. Immunology of canine leishmaniasis. *Parasite Immunol*, 2006; 28:329-337.
- Barroso PA, Nevot MC, Hoyos CL, Locatelli FM, Lauthier JJ, Ruybal P, Cardozo RM, Russo PD, Vassiliades CN, Mora MC, Estévez JO, Hashiguchi Y, Korenaga M, Basombrío MA y Marco JD. Genetic and clinical characterization of canine leishmaniasis caused by *Leishmania (Leishmania) infantum* in northeastern Argentina. *Acta Tropica*, 2015; 150:218-223.
- Benítez LEL. Leishmaniosis visceral. *Rev Asoc Med Arg*, 1967; 8:610-612.
- Boelaert M, Bhattacharya S, Chappuis F, El Safi SH, Hailu A, Mondal D, Rijal S, Sundar S, Wasunna M y Peeling RW. Evaluation of rapid diagnostic tests: visceral leishmaniasis. *Evaluating Diagnostics* (en línea). *Nature*, 2007; Disponible en [www.nature.com/reviews/micro](http://www.nature.com/reviews/micro).
- Borzzone RA. Leishmaniosis tegumentaria americana vegetante con localizaciones viscerales. *Bol Inst Clin Quirurg Bs As*, 1926; 13:322-326.
- Botilde Y, Laurent T, Tintaya WQ, Chicharro C, Cañavate C, Cruz I, Kuhls K, Schonian G y Dujardin JC. Comparison of molecular markers for strain typing of *Leishmania infantum*. *Infection, Genetics and Evolution* 2006; 6:440–446.
- Brooker S, Mohammed N, Adil K, Agha S, Reithinger R, Rowland M, Ali I y Kolaczinski J. Leishmaniasis in refugee and local Pakistani populations. *Emerg Infect Dis*, 2004; 10: 1681–84.
- Bulle B, Millon L, Bart JM, Gállego M, Gambarelli F, Portús M, Schnur L, Jaffe CL, Fernandez-Barredo S, Alunda JM Y Piarroux R. Practical Approach for Typing Strains of *Leishmania infantum* by Microsatellite Analysis. *J Clin Microbiol*, 2002; 40(9):3391-3397.

- Cabral M, O'Grady JE, Gomes S, Sousa JC, Thompson H y Alexander J. The immunology of canine leishmaniasis: strong evidence for a developing disease spectrum from asymptomatic dogs. *Vet Parasitol*, 1998; 76(3):173-180.
- Calvopina M, Uezato H, Gomez EA, Korenaga M, Nonaka S y Hashiguchi Y. Leishmaniasis recidiva cutis due to *Leishmania (Viannia) panamensis* in subtropical Ecuador: isoenzymatic characterization. *Int J Dermatol*, 2006; 45:116-120.
- Campanini A, Sinagra A, Saravia N, Arévalo J, Luna C, Sosa Estani S, Salomón D y Segura EL. Caracterización in vitro de aislados de *Leishmania* de pacientes de Salta. *Medicina(Buenos Aires)*, 1993; 53(1):81.
- Castellucci L, Cheng LH, Araujo C, Guimarães LH, Lessa H, Machado P, Almeida MF, Oliveira A, Ko A, Johnson WD, Wilson ME, Carvalho EM, DE Jesus AR. Familial aggregation of mucosal leishmaniasis in northeast Brazil. *Am J Trop Med Hyg*, 2005; 73: 69–73.
- Cedillos RA y Walton BC. Leishmaniasis: special situations in other Areas of the Americas. *Research on Control Strategies for the Leishmaniasis*, 1988; 184:156-161.
- Chang PCH. The ultrastructure of *Leishmania donovani*. *J Parasitol*, 1956; 42:126-136.
- Charmoy M, Auderset F, Allenbach C, TacchiniCottier F. The prominent role of neutrophils during the initial phase of infection by *Leishmania* parasites. *J Biomed Biotechnol*, 2010; 2010: 1-8.
- Chicharro, C, Jiménez MI y Alvar J. Iso-enzymatic variability of *Leishmania infantum* in Spain. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 2003; 97(1):57–64.
- Chicharro C, Llanes-Acevedo IP, García E, Nieto J, Moreno J y Cruz I. Molecular typing of *Leishmania infantum* isolates from a leishmaniasis outbreak in Madrid, Spain, 2009 to 2012. *Euro Surveill*, 2013; 18(30)20545.
- Córdoba-Lanús AE. Fauna flebotomínica de la Provincia de Tucumán: Aspectos ecológicos y asociación a leishmaniasis. Tesis Doctoral. Universidad Nacional de Tucumán; 2003.
- Cortés S, Rolao N, Ramada J y Campino L. PCR as a rapid and sensitive tool in the diagnosis of human and canine leishmaniasis using *Leishmania donovani* s.l.-specific kinetoplastid primers. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 2004; 98:12-17.
- Cortés, LA. Foco de leishmaniasis en El Hobo, municipio de El Carmen de Bolívar, Bolívar, Colombia. *Biomed*, 2006; 26(1):236-241.
- Cortes S, Chicharro C, Cru I, Cristovao JM, Cañavate C y Campino C. Genetic Diversity of Human Zoonotic Leishmaniasis in Iberian Peninsula. *Zoonoses Public Health*, 2011; 58:234-237.

- Croft SL, Sundar S y Fairlamb AH. Drug resistance in leishmaniasis. *Clin Microbiol Rev*, 2006; 19:111–26.
- Cruz I, Nieto J, Moreno J, Cañavete C, Desjeux P y Alvar J. *Leishmania*/HVI co-infections in the second decade. *Indian J Med Res*, 2006a; 123:357-388.
- Cruz I, Chicharro C, Nieto J, Bailo B, Cañavate C, Figueras MC, Alvar J. Comparison of New Diagnostic Tools for Management of Pediatric Mediterranean Visceral Leishmaniasis. *Journal of Clinical Microbiology*, 2006b; 44(7):2343-2347.
- Cruz I, Acosta L, Gutiérrez MN, Nieto J, Cañavate C, Deschutter J, Bornay-Llinares FJ. A canine leishmaniasis pilot survey in an emerging focus of visceral leishmaniasis: Posadas (Misiones, Argentina). *BMC Infect Dis*, 2010; 10:342.
- Cruz I, Millet A, Carrillo E, Chenik M, Salotra P, Verma S, Veland N, Jara M, Adauí V, Castrillón C, Arévalo J, Moreno J, Cañete C. An approach for interlaboratory comparison of conventional and real-time PCR assays for diagnosis of human leishmaniasis. *Experimental Parasitology*, 2013; 134(3):281-289.
- Dantas-Torres F. The role of dogs as reservoirs of *Leishmania* parasites, with emphasis on *Leishmania (Leishmania) infantum* and *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Vet Parasitol*, 2007; 149:139-146.
- Dantas-Torres F. Canine leishmaniosis in South America. *Parasit Vectors*, 2009; 26:S1.
- De Almeida MC, Vilhena V, Barral A, Barral Netto M. Leishmanial infection: analysis of its first steps. A review. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 2003; 98 (7):861-870.
- Desjeux P. The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 2001; 95:239-243.
- Desjeux P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, 2004; 27(5):305-318.
- Diatta BA, Diallo M, Diadie S, Faye B, Ndiaye M, Hakim H, Diallo S, Seck B, Niang SO, Kane A y Dieng MT. Cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania infantum* associated with HIV. *Ann Dermatol Venereol*, 2016; 9638(16)30042-4.
- Diniz SA, Silva FL, Carvalho Neta AV, Bueno R, Guerra R MSNC, Abreu-Silva AL y Santos RL. Animal reservoirs for visceral leishmaniasis in densely populated urban areas. *J Infect Developing Countries*, 2008; 2:24-33.
- Dowlati Y. Cutaneous leishmaniasis: clinical aspect. *Clin Dermatol*, 1996; 14(5):425-31.
- Duret JP. Notas de Flebotomos Argentinos. *Rev Sanid Milit Argent*, 1952; 51(4):534-536.
- Escobar MA, Martínez F, Scott Smith D, Palma GI. American cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis (tegumentary): a diagnostic challenge. *Trop Doct*, 1992; 22: 69–78.
- Fernández E. Un caso de leishmaniosis visceral autóctona. *El Diario Médico* 1941; 41:14.

- Figueiró-Filho EA, Duarte G, El-Beitune P, Quintana SM, Lemos Maia T. Visceral leishmaniasis (kala-azar) and pregnancy. *Infect Dis Obstet Gynecol* 2004; 12:31-40.
- Fisa R, Riera C, Ribera E, Gállego M y Portus M. A nested polymerase chain reaction for diagnosis and follow-up of human visceral leishmaniasis patients using blood samples. *Transactions of the royal society of trop. Med. And Hyg.*, 2002; 96(1):191-194.
- Fonso C e Ink J. Estudio clínico experimental sobre un caso de leishmaniosis visceral. *Rev med y Cienc Af*, 1947; 93-95:36-43.
- Fraga LT, Brustoloni YM, Lima RB, Cavalheiros MB, Oshiro ET, Oliveira J, Lyrio de Oliveira AL, Primez C. Polymerase chain reaction of peripheral blood as a tool for the diagnosis of visceral leishmaniasis in children. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*, 2010; 105(3):310-313.
- Franke ED, Llanos-Cuentas A, Echevarria J, Cruz ME, Campos P. Efficacy of 28-day and 40-day regimens of sodium stibogluconate (Pentostam) in the treatment of mucosal leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg*, 1994; 51: 77-82
- Ghawar W, Attia H, Bettaieb J, Yazidi R, Laouini D y Salah AB. Genotype Profile of *Leishmania* major Strains Isolated from Tunisian Rodent Reservoir Hosts Revealed by Multilocus Microsatellite Typing. *PLoS One*, 2014; 9(9):107043.
- Gomes YM, Paiva Cavalcanti M, Lira RA, Abath FG y Alves LC. Diagnosis of canine visceral leishmaniasis: biotechnological advances. *Vet J*, 2008; 175(1):45-52.
- Gómez de la Fuente Fretes AE. Análisis de la Diversidad Genética de *Leishmania infantum* en Paraguay mediante la técnica del kDNA-PCR-RFLP. (Tesis de Maestría). Asunción: Universidad Nacional de Asunción; 2013.
- González G, Rodríguez C y Simón A. Morfología de la *Leishmania* trópica en su estado intracelular en la dermis humana. *Actas Dermo-Sif*, 1976; 67:527-534.
- Grimaldi G Jr, Tesh RB y McMahon-Pratt D. A review of the geographic distribution and epidemiology of leishmaniasis in the New World. *Am J Trop Med Hyg*, 1989; 41(6):687-725.
- Gouzelou E, Haralambous C, Antoniou M, Christodoulou V, Martinković F, Živičnjak T, Smirlis D, Pratloug F, Dedet JC, Özbel Y, Toz SO, Presber W, Schönian G y Soteriadou K. Genetic diversity and structure in *Leishmania infantum* populations from southeastern Europe revealed by microsatellite analysis. *Parasites and Vectors*, 2013; 6:342.
- Guarga JL, Moreno J, Lucientes J, Gracia MJ, Peribáñez MA, Alvar J y Castillo JA. Canine leishmaniasis transmission: higher infectivity amongst naturally infected dogs to sand flies is associated with lower proportions of T helper cells. *Res Vet Sci*, 2000 69:249-253.

- Guerin PJ, Olliaro P, Sundar S, Boelaert M, Croft SL, Desjeux P, Wasunna MK y Bryceson AD. Visceral leishmaniasis: current status of control, diagnosis, and treatment, and a proposed research and development agenda. *Lancet Infect Dis*, 2002; 2:494-501.
- Gutiérrez MN, Galarza RF, Deschutter JE y Marcos N. Estudio de leishmaniasis visceral canina en el casco urbano de la localidad de Bonpland, Misiones (Argentina). 4to encuentro internacional sobre enfermedades olvidadas, 2013 Oct 17-18; Buenos Aires, Argentina: Mundo Sano; pág 63.
- Hepburn NC. Cutaneous leishmaniasis: an overview. *J Postgrad Med*, 2003; 49(1):50-54.
- Hernández-Ruiz J y Becker I. CD8+ cytotoxic lymphocytes in cutaneous leishmaniasis. *Salud Publica Mex*, 2006; 48: 430-9.
- Herwaldt BL. Leishmaniasis. *Lancet*, 1999; 354:1191-1199.
- Holzmuller, P. Bras-Gonçalves R y Lemesre JL. Phenotypical characteristics, biochemical pathways, molecular targets and putative role of nitric oxide-mediated programmed cell death in *Leishmania*. *Parasitology*, 2006; 132:19-32.
- Horrillo L, San Martín JV, Molina L, Madroñal E, Matía B, Castro A, García-Martínez J, Barrios A2, Cabello N, Arata IG, Casas JM y Ruiz Giardin JM. Atypical presentation in adults in the largest community outbreak of leishmaniasis in Europe (Fuenlabrada, Spain). *Clin Microbiol Infect*, 2015;21(3):269-73.
- INDEC, 2010 (sitio en Internet). Instituto Nacional de Estadísticas y Censos. Disponible en: [www.indec.gov.ar/censos\\_provinciales.asp?id\\_tema\\_1=2&id\\_tema\\_2=41&id\\_tema\\_3=135&p=54&d=999&t=3&s=6&c=2010](http://www.indec.gov.ar/censos_provinciales.asp?id_tema_1=2&id_tema_2=41&id_tema_3=135&p=54&d=999&t=3&s=6&c=2010). Acceso el 7 de Agosto 2016.
- Inda FF, Vivoli D y Vacarezza AJ. Estudio anatomo-clínico de un caso de kala-azar en el adulto (fiebre negra). Primera observación en nuestro país. *La semana Médica*, 1934; 413-424.
- Jeddi F, Mary C, Aoun K, Harrat Z, Bouratbine A, Faraut F, Benikhlef R, Pomares C, Pralong F, Marty P, Piarroux R. Heterogeneity of molecular resistance patterns in antimonyresistant field isolates of *Leishmania* species from the western Mediterranean area. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2014; 58, 4866–4874.
- Jiménez MI. Variabilidad de *Leishmania (Leishmania) infantum* en España. (Tesis doctoral). Madrid: Universidad Complutense de Madrid; 1994.
- Jiménez M, González E, Martín-Martín I, Hernández S y Molina R. Could wild rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) be reservoirs for *Leishmania infantum* in the focus of Madrid, Spain? *Vet Parasitol*, 2014; 202(3-4):296-300.

- Kar K. Serodiagnosis of leishmaniasis. *Crit Rev Microbiol*, 1995; 21:123-5.
- Kazemi B. Genomic Organization of *Leishmania* Species. *J of Parasitology*, 2011; 6(3):1-18.
- Khatri ML, Di Muccio T, Fiorentino E, Gramiccia M. Ongoing outbreak of cutaneous leishmaniasis in northwestern Yemen: clinico epidemiologic, geographic, and taxonomic study. *Int J Dermatol*; 2016, publicación electrónica.
- Killick-Kendrick R. The biology and control of phlebotomine sandflies. *Clin Dermatol*, 1999; 17: 279–89.
- Krayter L, Bumb RA, Azmi K, Wuttke J, Malik MD, Schnur LF, Salotra P y Schönian G. Multilocus microsatellite typing reveals a genetic relationship but, also, genetic differences between Indian strains of *Leishmania tropica* causing cutaneous leishmaniasis and those causing visceral leishmaniasis. *Infection, Genetics and Evolution*, 2014; 28:233-239.
- Kuhls K, Chicharro C, Cañavate C, Cortés S, Campino L, Haralambous C, Soteriadou K, Pratlong F, Dedet JP, Mauricio I, Miles CM, Schaar M, Ochsenreither S, Radtke O y Schönian G. Differentiation and gene flow among European populations of *Leishmania infantum* MON-1. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 2008; 2:e261.
- Kuhls K, Alam MZ, Cupolillo E, Ferreira GEM, Mauricio IL, Oddone R, Feliciangeli MD, Wirth T, Miles MA y Schönian G. Comparative Microsatellite Typing of New World *Leishmania infantum* Reveals Low Heterogeneity among Populations and Its Recent Old World Origin. *PLoS Negl Trop Dis* 2011; 5(6): e1155.
- Kuhls K, Cupolillo E, Silva SO, Schweynoch C, Côrtes BM, Mello MN, Mauricio I, Miles M, Wirth T y Schönian G. Population Structure and Evidence for Both Clonality and Recombination among Brazilian Strains of the Subgenus *Leishmania* (*Viannia*). *PLoS Negl Trop Dis*, 2013; 7(10): e2490.
- Lainson R y Shaw JJ. Evolution, classification and geographical distribution. *The Leishmaniasis in Biol and Med*, 1987; 1: 1-120.
- Lainson R y Shaw JJ. *Leishmania* (*Viannia*) *naiffi* sp. n., a parasite of the armadillo, *Dassypus novemcinctus* (L.) in amazonian Brazil. *Annales de Parasitologie humaine et compare*, 1989; 64:3-9.
- Lachaud L, Marchergui-Hammami S, Chabbert E, Dereure J, Dedet JP y Bastien P. Comparison of six PCR methods using peripheral blood for detection of canine visceral leishmaniasis. *J Clin Microbiol*, 2002; 40:210-215.

- Laurent T, Rijal S, Yardley V, Croft S, De Doncker S, Decuypere S, Khanal B, Singh R, Schönian G, Kuhls K, Chappuis F, Dujardin JC. Epidemiological dynamics of antimonial resistance in *Leishmania donovani*: genotyping reveals a polyclonal population structure among naturally resistant clinical isolates from Nepal. *Infection, Genetics and Evolution*, 2007; 7, 206–212.
- Lobo MA, Lara PE, Maté AR, Dovao JCT, Guijarro SC y Martínez JMB. Brote de leishmaniasis cutánea en el municipio de Fuenlabrada. *Actas Dermo-sifiliográficas*, 2013;104(4):334-342.
- Lumsden WH. Problems in characterization and nomenclature of trypanosome populations. *Ann Soc Belg Med Trop*. 1977; 57(4-5):361–368.
- Machado P, Araújo C, Da Silva AT, Almeida RP, D'Oliveira Jr A, Bittencourt A y Carvalho EM. Failure of early treatment of cutaneous leishmaniasis in preventing the development of an ulcer. *Clin Infect Dis*, 2002; 34(12):e69-73.
- Machado Mescouto-Borges MR, Maués E, Costa DL, da Silva Pranchevicius MC, Sierra Romero GA. Congenitally transmitted visceral leishmaniasis: report of two Brazilian human cases. *Braz J Infect Dis*, 2013; 17(2):263-266.
- Magill AJ. Cutaneous leishmaniasis in the returning traveler. *Infect Dis Clin North Am*, 2005; 19(1):241-266.
- Manna L, Vitale F, Reale S, Caracappa S, Pavone LM, Morte RD, Cringoli G, Staiano N y Gravino AE. Comparison of different tissue sampling for PCR-based diagnosis and follow-up of canine visceral leishmaniasis. *Vet Parasitol*, 2004; 125(3-4):251-262.
- Manna L, Reale S, Vitale F y Gravino AE. Evidence for a relationship between *Leishmania* load and clinical manifestations. *Res Vet Sci*, 2009; 87(1):76-78.
- Marco JD, Barroso PA, Calvopiña M, Kumazawa H, Furuya M, Korenaga M, Cajal SP, Mora MC, Rea MM, Borda CE, Basombrío MA, Taranto NJ y Hashiguchi Y. Species assignment of *Leishmania* from human and canine American tegumentary leishmaniasis cases by multilocus enzyme electrophoresis in North Argentina. *Am J Trop Med Hyg*, 2005; 72(5):606-611.
- Marco JD, Barroso PA, Locatelli FM, Cajal PS, Hoyos CL, Nevot CM, Lauthier JJ, Tomasini N, Juarez M, Estevez O, Korenaga M, Nasser JR, Hashiguchi Y, Ruybal P. Multilocus sequence typing approach for a broader range of species of *Leishmania* genus: Describing parasite diversity in Argentina. *Infection, Genetics and Evolution*, 2015; 30:308-317.

- Martín-Sánchez J, Navarro-Mari JM, Pasquau-Liaño J, Salomón OD y Morillas-Márquez F. Visceral leishmaniasis caused by *Leishmania infantum* in a Spanish patient in Argentina: what is the origin of the infection? Case Report. BMC Infectious Diseases, 2004; 4:20.
- Mateo M. Estudio sobre la eficacia comparada y la tolerancia de la miltefoxina y el antimonio de n-metilglucamina, y la monitorización post tratamiento con alopurinol en la infección natural por *Leishmania infantum* en el perro. (Tesis doctoral). Madrid: Universidad Complutense de Madrid; 2007.
- Mauricio IL, Stothard JR y Miles MA. The strange case of *Leishmania chagasi*. Parasitology today, 2000; 16(5):188-189.
- Mazza S, y Cornejo J. Primeros casos autóctonos de kala-azar infantil comprobados en el norte de la República. Bol Inst Clin Quirurg Bs As, 1926; 13:140-144.
- McMahon-Pratt D y Alexander J. Does the *Leishmania* major paradigm of pathogenesis and protection hold for New World cutaneous leishmaniases or the visceral disease?. Immunol Rev, 2004; 201:206-224.
- Meinecke CK, Schottelius J, Oskam L y Fleischer B. Congenital transmission of visceral leishmaniasis (Kala Azar) from an asymptomatic mother to her child. Pediatrics 1999; 104(5):1-5.
- Ministerio de Salud de la Nación. Enfermedades infecciosas, Leishmaniasis visceral. Dirección de Epidemiología. Argentina: 2010. Guía para el equipo de salud N°5.
- Ministerio de Salud de la provincia de Misiones. Informe Epidemiológico Semanal, Semana 12 año 2016, Argentina.
- Mohammadiha A, Mohebbali M, Haghighi A, Mahdian R, Abadi AR, Zarei Z, Yeganeh F, Kazemi B, Taghipour N y Akhoundi B. Comparison of real-time PCR and conventional PCR with two DNA targets for detection of *Leishmania (Leishmania) infantum* infection in human and dog blood samples. Exp Parasitol, 2013;133(1):89-94.
- Molina R, Gradoni L y Alvar J. HIV and the transmission of *Leishmania*. Ann Trop Med Parasitol, 2003; 97(1):29-45.
- Molina R, Jiménez MI, Cruz I, Iriso A, Martín-Martín I, Sevillano O, Melero S y Bernal J. The hare (*Lepus granatensis*) as potential sylvatic reservoir of *Leishmania infantum* in Spain. Vet Parasitol, 2012;190(1-2):268-71.
- Montalvo AM, Fraga J, Maes I, Dujardin JC y Van Der Auwera G. Three new sensitive and specific heat-shock protein 70 PCRs for global *Leishmania* species identification. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2012; 31:1453-1461.

- Morales MA, Cruz I, Rubio JM, Chicharro C, Cañavate C, Laguna F y Alvar J. Relapses versus reinfections in patients coinfecting with *Leishmania infantum* and human immunodeficiency virus type 1. *J Infectious Diseases*, 2002;185(10):1533–1537.
- Morales Hernández MÁ. Epidemiología molecular de la coinfección por *Leishmania*-VIH (Tesis doctoral). Madrid: Universidad Complutense de Madrid; 2004.
- Moreira ED Jr, Mendes de Souza VM, Sreenivasan M, Nascimento EG y Pontes de Carvalho L. Assessment of an optimized dog-culling program in the dynamics of canine *Leishmania* transmission. *Vet Parasitol*, 2004; 6:245-252.
- Moreno J y Alvar J. Canine leishmaniasis: epidemiological risk and the experimental model. *Trends Parasitol*, 2002; 18:399-405.
- Murray HW, Berman JD, Davies CR y Saravia NG. Advances in leishmaniasis. *Lancet*, 2005; 366:1561-1577.
- Noben-Trauth N, Lira R, Nagase H, Paul WE y Sacks DL. The relative contribution of IL-4 receptor signaling and IL-10 to susceptibility to *Leishmania major*. *J Immunol*, 2003; 170(10):5152-5158.
- Nocito I, Serra E y Montero A. Visceral involvement due to *Leishmania mexicana* in a patient with acquired immunodeficiency syndrome. *Am J Med*, 2002; 113:260-262.
- Oliveira-Neto MP, Mattos M, Souza CS, Fernandes O y Pirmez C. Leishmaniasis recidiva cutis in New World cutaneous leishmaniasis. *Int J Dermatol*, 1998; 37:846-849.
- Olivier M, Gregory DJ, Forget G. Subversion mechanisms by which *Leishmania* parasites can escape the host immune response: a signaling point of view. *Clin Microbiol Rev*, 2005; 18 (2):293-305.
- OMS. Urbanization: an increasing risk factor for leishmaniasis. *Wkly Epidemiol Rec*, Ginebra, Suiza, 2002; 44:365-370.
- OMS. Control of the leishmaniasis: report of a meeting of the Expert Committee on the Control of Leishmaniases. Technical report series, WHO (Edit.), Ginebra, Suiza, 2010; 949.
- OMS (sitio en Internet). Investin to overcome the global impact of neglected tropical diseases. Third WHO report on neglected tropical diseases. WHO, 2015. Disponible en: [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/152781/1/9789241564861\\_eng.pdf?ua=1](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/152781/1/9789241564861_eng.pdf?ua=1). Acceso el 05 de Agosto 2016.

- Papadogiannakis E, Spanakos G, Kontos V, Menounos PG, Tegos N y Vakalis N. Molecular Detection of *Leishmania infantum* in Wild Rodents (*Rattus norvegicus*) in Greece. *Zoonoses Public Health*, 2010; 57(7-8):e23-25.
- Parafieniuk S, Deschutter J, Silva , Gutiérrez M, Piris Da Motta M y Díaz Alarcón R. Prevalencia de infección por leishmaniasis canina y síntomas frecuentes en una muestra de Concepción de la Sierra, provincia de Misiones, Argentina. XVII Simposio Internacional Sobre Enfermedades Desatendidas; 2015 Ago 24 y 25; Buenos Aires, Argentina. Disponible en: <https://www.mundosano.org/simposio2015>. Accesado el 07 de Agosto 2016.
- Peres D, Lamounier D, Lopez I, Nery C, Martins P. Short Report: Heterogeneity of *Leishmania infantum chagasi* Kinetoplast DNA in Teresita (Brazil). *The American Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 2010;82(5):819–21.
- Persechino A y Oliva G. Autoimmunity associated with leishmaniasis in dogs. *Acta Med Vet*, 1986; 75:247-249.
- Ramírez JD, Hernández C, León CM, Ayala MS, Flórez C y González C. Taxonomy, diversity, temporal and geographical distribution of Cutaneous Leishmaniasis in Colombia: A retrospective study. *Sci Rep*, 2016; 6: 28266.
- Ríos JMY y Souza O. Inmunología en la infección por *Leishmania*: Conceptos actuales. *Revista Médico Científica*, 2010; 23(1):19-31.
- Reis A, Teixeira-Carvalho A, Vale A, Marques M, Giunchetti R, Mayrink W, Guerra L, Andrade R, Correia-Oliveira R y Martins-Filho O. Isotype patterns of immunoglobulins: hallmarks for clinical status and tissue parasite density in Brazilian dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi*. *Vet Immunol Immunopathol*, 2006; 112:102-111.
- Reis AB, Giunchetti RC, Carrillo E, Martins-Filho OA y Moreno J. Immunity to *Leishmania* and the rational search for vaccines against canine leishmaniasis. *Trends Parasitol*, 2010; 26(7):341-349.
- Reithinger R, Mohsen M, Aadil K, Sidiqi M, Erasmus P y Coleman PG. Anthroponotic cutaneous leishmaniasis, Kabul, Afghanistan. *Emerg Infect Dis*, 2003; 9: 727–29.
- Reithinger R, Dujardin JC, Louzir H, Pirmez C, Alexander B y Brooker S. Cutaneous leishmaniasis. *Lancet Infect Dis*, 2007; 7:581-596.
- Roberts L.S. y Janovi J. *Foundations of Parasitology*, 5ª ed, 1995. Brown/McGraw-Hill (Ed.), Dubuque, Iowa, USA.

- Rodríguez BS, Fernández BI, Sanz SS, Moros MJS, Moreno RM, Mochales JA y Heras CA. Situación epidemiológica y de los factores de riesgo de transmisión de *Leishmania infantum* en España Revista Española de Salud Pública, 2012; 86(6):555-564.
- Roelfsema JH, Nozari N, Herremans T, Kortbeek LM y Pinelli E. Evaluation and improvement of two PCR targets in molecular typing of clinical samples of Leishmania patients. Exp. Parasitol, 2010; 10:1006.
- Rougeron V, De Meeûs T, Kako Ouraga S, Hide M, Bañuls A-L. «Everything You Always Wanted to Know about Sex (but Were Afraid to Ask)» in Leishmania after Two Decades of Laboratory and Field Analyses. PLoS Pathog, 2010; 6(8):1–5.
- Rougeron V, De Meeûs T, Bañuls AL. A primer for Leishmania population genetic studies. Trends in Parasitology, 2015; 31(2): 52-59.
- Saf'janova, W.M. Classification of the genus Leishmania. Leishmania Protozool, 1982; Pan7, Academy of Sciences, URSS tUI Union Society of Prorozoologists, Leningrad, 220.
- Santos-Gomes GM, Rosa R, Leandro C, Cortes S, Romao P y Silveira H. Cytokine expression during the outcome of canine experimental infection by *Leishmania infantum*. Vet Immunol Immunopathol, 2002; 88:21-30.
- Salomón OD. Vectores de Leishmaniosis. Zoonosis y Enfermedades Emergentes, 1998; 2264-2267.
- Salomón OD, Sosa SE, Rossi GC y Spinelli G. Presencia de Lutzomyia longipalpis y situación de la leishmaniasis visceral en Argentina. Medicina (Buenos Aires), 2001a; 61:174-178.
- Salomón OD, Sosa SE, Canini L y Cordoba EL. Leishmaniosis tegumentaria en un área con niveles epidémicos de transmisión, Salta, Argentina, 1998. Medicina (Buenos Aires), 2001b; 61(3): 284-290.
- Salomón OD, Sosa SE, Monzani AS y Studer C. Brote epidémico de leishmaniosis tegumentaria en Puerto Esperanza, provincia de Misiones 1998. Medicina (Buenos Aires), 2001c 61, 385–390.
- Salomón OD. Leishmaniosis: vectores y brotes epidémicos en Argentina. Actualizaciones en Artropodología Sanitaria Argentina. Buenos Aires: Fundación Mundo Sano, 2002a; 2:185-96.
- Salomón OD, Rossi GC y Spinelli GR. Ecological Aspects of Phlebotomine (Diptera, Psychodidae) in an Endemic Area of Tegumentary Leishmaniasis in the Northeastern Argentina 1993–1998. Mem Inst Oswaldo Cruz, 2002b; 97:163–168.

- Salomón OD. Leishmaniasis. Buenos Aires: Asociación Argentina de Zoonosis; 2004, 281-289.
- Salomón OD, Orellano PW, Quintana MG, Perez S, Sosa SE, Acardi S y Lamfri M. Transmisión de la leishmaniasis tegumentaria en la Argentina. Medicina (Buenos Aires), 2006; 66: 211-219.
- Salomón OD, Sinagra A, Nevot MC, Barberian G, Paulin P, Estevez J, Riarte A y Estevez J. First visceral leishmaniasis focus in Argentina. Mem Inst Oswaldo Cruz, 2008; 103:109-111.
- Salomón OD, Acardi S, Liotta JD, Fernández MS, Lestani E, López D, Mastrángelo AV, Figueroa M y Fattore G. Epidemiological aspects of cutaneous leishmaniasis in the Iguazú falls area of Argentina. Acta tropica, 2009; 109(1):5-11.
- Salomón OD, Basmajdian Y, Fernández MS y Santini MS. *Lutzomyia longipalpis* in Uruguay: the first report and the potential of visceral leishmaniasis transmission. Mem Inst Oswaldo Cruz, 2011; 106(3):381-382.
- Sánchez-Saldaña L. Leishmaniasis. J Dermatol. Peruana, 2004; 14(2):82-98.
- Saridomichelakis MN, Mylonakis ME, Leontides LS, Koutinas AF, Billinis C y Kontos VI. Evaluation of lymph node and bone marrow cytology in the diagnosis of canine leishmaniasis (*Leishmania infantum*) in symptomatic and asymptomatic dogs. Am J Trop Med Hyg, 2005; 73:82-86.
- Schallig HD, Cardoso L, Hommers M, Kroon N, Belling G, Rodrigues M, Semião-Santos SJ y Vetter H. Development of a dipstick assay for detection of *Leishmania*-specific canine antibodies. J Clin Microbiol, 2004; 42(1):193-197.
- Schonian G, Nasereddin A, Dinse N, Schweynoch C, Schallig HD, Presber W y Jaffe CL. PCR diagnosis and characterization of *Leishmania* in local and imported clinical samples. Diagn Microbiol Infect Dis, 2003; 47(1):349-358.
- Schonian G, Mauricio I, Gramiccia M, Cañavate C, Boelaert M y Dujardin JC. Leishmaniasis in the Mediterranean in the era of molecular epidemiology. Trends in Parasitology, 2008; 24(3):135-142.
- Segatto M, Ribeiro LS, Costa DL, Costa CHN, Oliveira MR de, Carvalho SFG, Macedo AM, Silva Valadares HM, Dietze R, Ferreira Alves de Brito C, Moreira Lemos E. Genetic diversity of *Leishmania infantum* field populations from Brazil. Memorias do Instituto Oswaldo Cruz, 2012; 107(1):39-47.
- Sinagra A, Riarte A, Luna C, Campanini A y Segura L. *Leishmania (Viannia) braziliensis*, biological behavior in golden hamsters isolates from Argentine patients. Am J Trop Med Hyg, 1997; 57:115-118.

- Solano-Gallego L, Riera C, Roura X, Iniesta L, Gallego M, Valladares JE, Fisa R, Castillejo S, Alberola J, Ferrer L, Arboix M y Portus M. Leishmania infantum-specific IgG, IgG1 and IgG2 antibody responses in healthy and ill dogs from endemic areas. Evolution in the course of infection and after treatment. *Vet. Parasitol*, 2001; 96:265-276.
- Solano-Gallego L, Koutinas A, Miró G, Cardoso L, Pennisi MG, Ferrer L, Bourdeau P, Oliva G y Baneth G. Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniasis. *Vet Parasitol*, 2009; 165:1-18.
- Solbach W y Laskay T. The host response to Leishmania infection. *Advances in Immunology*, 2000;74:275-317.
- Sosa SE, Salomón OD, Gómez A y Segura EL. Prevalencia de leishmaniosis en Salta, Argentina. *Medicina (Buenos Aires)*, 1993; 53(1):78.
- Sosa SE, Gómez A, Salomón OD y Segura EL. Leishmaniasis en Argentina. Factores de riesgo. *Rev Soc bras Med trop*, 1994; 27(1): 243.
- Sosa SE y Salomón OD. Aspectos clínicos, epidemiológicos y entomológicos de la transmisión de la leishmaniosis en la República Argentina. *Sociedad Iberoamericana de Información Científica*, 2002. Disponible en: <http://www.siicsalud.com/des/expertocompleto.php/20198>.
- Spinelli GR, Rossi GC y Rodríguez EA. Further notes on Phlebotominae from Argentina. *Rev Soc Entomol Argentina*, 1999; 58:197-200.
- Subba Raju BV, Gurumurthy S, Kuhls K, Bhandari V, Schnonian G, Salotra P. Genetic typing reveals monomorphism between antimony sensitive and resistant Leishmania donovani isolates from visceral leishmaniasis or post kala-azar dermal leishmaniasis cases in India. *Parasitology Research*, 2012; 111, 1559–1568.
- Talmi-Frank D, Nasereddin A, Schnur LF, Schönian G, Toz SO, Jaffe CL, Baneth G. Detection and Identification of Old World Leishmania by High Resolution Melt Analysis. *PLoS, Neglected Tropical disease*, 2010; 4(1):e581.
- Taquin H, Chiaverini C, Marty P y Lacour JP. A multifocal form of cutaneous leishmaniasis caused by Leishmania infantum in an immunocompetent child treated with a short course of liposomal amphotericin B. *Ann Dermatol Venereol*, 2016; 9638(16)30096-30105.
- Teixeira Neto RG, Giunchetti RC, Carneiro CM, Vitor, Coura-Vital W, Quaresma PF, Ker HG, de Melo LA, Gontijo CM, Reis AB. Relationship of Leishmania-specific IgG levels and IgG avidity with parasite density and clinical signs in canine leishmaniasis. *Vet Parasitol*, 2010; 169:248–257.

- Tibayrenc, M. 2009: Microbial molecular epidemiology: an overview. In: Caugant, D. A. (ed.), *Molecular Epidemiology of Microorganisms, Methods in Molecular Biology*, pp. 1–12. Human Press, a part of Springer Science + Business Media, Berlin.
- Torno O, Visciarelli E y Prat MI. Leishmaniosis tegumentaria Americana en la Provincia de Santiago del Estero, Argentina. *Rev As Med Bahía Blanca*, 1995; 1:20-27.
- Universidad de Iowa. Leishmaniasis (cutáneas y viscerales). Colegio de medicina veterinaria, 2010. Disponible en: <http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/es/leishmaniasis.pdf>.
- Vargas-Inchaustegui DA, Tai W, Xin L, Hogg AE, Corry DB, Soong L. Distinct roles for MyD88 and Toll-Like receptor 2 during *Leishmania braziliensis* infection in mice. *Infect Immun*, 2009; 77 (7):2948-2956.
- Villafañe R, Richter EE y Soave de Richter L. Análisis crítico de la epidemia de leishmaniosis años: 1985/87. Provincia de Salta. Dirección General de Epidemiología, Ministerio de Salud Pública, Salta, 1988.
- Von Stebut E. Cutaneous *Leishmania* infection: progress in pathogenesis research and experimental therapy. *Exp Dermatol*, 2007a; 16 (4):340-346.
- Von Stebut E. Immunology of cutaneous leishmaniasis: the role of mast cells, phagocytes and dendritic cells for protective immunity. *Eur J Dermatol*, 2007b; 17 (2):115-22.
- Wilde H, Di Carlo FC y Pessat OAN. Kala- Azar (Leishmaniosis visceral) autóctono. Su tratamiento con derivados antimoniales. *El Diario Médico*, 1956; 84:2629-2636.
- Yadon ZE, Quigley MA, Davies CR, Rodrigues LC y Segura EL. Assessment of leishmaniasis notification system in Santiago del Estero, Argentina, 1990–1993. *Am J Trop Med Hyg*, 2001; 65: 27–30.

## **CAPÍTULO IV: PROPUESTAS DE TRABAJOS FUTUROS Y/O RECOMENDACIONES**

Los resultados de este trabajo indicarían la necesidad de implementar la determinación de especie de *Leishmania* al confirmar un caso de leishmaniosis, debido a que nacen interrogantes epidemiológicos a raíz de esta investigación. Algunos podrían ser:

¿Hay otras especies que no son las que típicamente producen LC involucradas en esta forma clínica? y a su vez ¿podría *L. infantum* estar produciendo otras manifestaciones clínicas diferentes de las estudiadas en este trabajo? ¿Con qué frecuencia ocurren estas formas atípicas en nuestra región?

El conocimiento de las variantes genéticas de las especies circulantes en la provincia nos permite hacer un análisis geográfico y temporal de la enfermedad, acercándonos al momento de su ingreso la provincia de Misiones, la frecuencia (cantidad de introducciones) y magnitud de su distribución y la fuente de introducción a un área.

Para cerrar el ciclo epidemiológico sería necesario realizar un estudio de variantes genéticas y comparar las encontradas en canes con las encontradas en humanos. Así, podría determinarse si todas las variantes que afectan a perros también afectan a los humanos o solo algunas, o inclusive, si son diferentes variantes genéticas.

Así como realizar un estudio para determinar la posible existencia de otros reservorios implicados en el ciclo de la leishmaniosis en la Provincia de Misiones mediante biología molecular. A fin de establecer, coordinar y complementar las medidas de control ya puestas en funcionamiento.

Para responder estas cuestiones son necesarios estudios más profundos acerca de este tema, con un número mayor de pacientes, reservorios y donde se incluyan otras formas clínicas de la enfermedad.

## **ANEXOS**

### **ANEXO I. Ficha clínica de Perros.**

Posadas, \_\_ de \_\_\_\_ de \_\_\_\_

Número de estudio: \_\_\_\_\_

#### **PROPIETARIO**

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

Dirección: \_\_\_\_\_ Localidad: \_\_\_\_\_

#### **PERRO**

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

Raza: \_\_\_\_\_ Peso: \_\_\_\_\_ Kg Sexo: \_\_\_\_\_

Nº perros en el domicilio: \_\_\_\_\_ Hábitat en la vivienda: \_\_\_\_\_

#### **Pesquisas de Laboratorio:**

##### **Indirectas:**

##### **Serología rK39-ICT:**

Positivo  Negativo

##### **IFI:**

Positivo  Negativo

##### **Directas:**

##### **PCR:**

Positivo  Negativo

##### **Frotis:**

Positivo  Negativo

#### **Síntomas clínicos del perro**

Alopecia	<input type="checkbox"/>	Descamaciones epiteliales	<input type="checkbox"/>
Trufa seca	<input type="checkbox"/>	Ulceraciones	<input type="checkbox"/>
Onicogrifosis	<input type="checkbox"/>	Nódulos linfáticos	<input type="checkbox"/>
Hepatomegalia	<input type="checkbox"/>	Esplenomegalia	<input type="checkbox"/>
Anorexia	<input type="checkbox"/>	Síntomas oculares	<input type="checkbox"/>
Adelgazamiento	<input type="checkbox"/>	Enteritis	<input type="checkbox"/>
Fiebre	<input type="checkbox"/>	Hemorragias	<input type="checkbox"/>

Otros: \_\_\_\_\_

#### **Muestras:**

Sangre  PAMO  Gaglio poplíteo  Otras: \_\_\_\_\_

#### **Seguimiento:**

Sacrificio  Otra intervención

## **ANEXO II. Modelo de consentimiento informado utilizado en el muestreo de Puerto Iguazú.**

### **CONSENTIMIENTO INFORMADO**

En la ciudad de Posadas/Puerto Iguazú, a los ..... días del mes de .....del año ....., por el presente documento perteneciente al proyecto “Investigación epidemiológica ante la emergencia de la Leishmaniosis Visceral en la ciudad de Posadas (Puerto Iguazú), Argentina” el que suscribe .....

.. DNI:..... hace constar que presta su consentimiento en pleno conocimiento de sus actos, a partir de este momento, en el proyecto mencionado. Expresando también conformidad y autorización en su carácter de propietario responsable para que a su perro/a: ..... se le realicen los estudios que se especifican en el protocolo de dicho proyecto y estudios posteriores que pudieran realizarse.

Por otra parte se deja constancia de que la participación es voluntaria y que se acuerda expresamente que toda información personal o del perro que el equipo obtenga con motivo de la investigación, así como el hecho en sí de su participación en ella serán estrictamente confidenciales.

La participación del perro implica la recolección de una muestra de sangre, y una de ganglio poplíteo para estudios de diagnóstico específico de leishmaniosis visceral. Las autoridades del proyecto se comprometen a presentar al propietario los resultados de laboratorio de su perro, así como a informar la detección de alguna patología durante el examen clínico del perro.

Por lo precedentemente expuesto y enterada/o debidamente del contenido del presente trabajo y comprendiendo toda la información precedente ratifica su participación en el proyecto y firma este documento:

-----

Firma y aclaración

**ANEXO III.** Modelo de consentimiento informado utilizado en el IMuSA.



**Secretaría de Salud**

—

**Consentimiento Informado**

Por la presente, el/la señora: \_\_\_\_\_

Tipo y Número de documento: \_\_\_\_\_

Domicilio: \_\_\_\_\_ N°: \_\_\_\_\_

Especie: \_\_\_\_\_ Raza: \_\_\_\_\_ Sexo: \_\_\_\_\_

Edad: \_\_\_\_\_ Pelaje: \_\_\_\_\_

Autoriza al suscripto Dr.: \_\_\_\_\_

M.P. N°: \_\_\_\_\_ a practicarle los siguientes estudios al animal mencionado:

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Firma

\_\_\_\_\_

Aclaración de la firma

## **ANEXO IV. Ficha clínica de pacientes humanos.**

Número de Estudio: \_\_\_\_\_

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

Teléfono: \_\_\_\_\_ Correo electrónico: \_\_\_\_\_

Domicilio: \_\_\_\_\_

Fecha de inicio de los síntomas: \_\_\_\_\_ Fecha de primera consulta: \_\_\_\_\_

Fecha de extracción: \_\_\_\_\_ Edad: \_\_\_\_\_

Sexo: M F Médico tratante: \_\_\_\_\_

### Síntomas Clínicos:

Duración de la Fiebre (en días): \_\_\_\_\_

Antecedentes de LV: Si No Palidez: Si No

Pérdida de peso: Si No Ictericia: Si No

Signos de sangrado Si No Ascitis: Si No

Hepatomegalia: Si No Edema: Si No

Esplenomegalia: Si No Adenopatías: Si No

### Pesquisas de laboratorio al inicio del tratamiento:

Eritrocitos: \_\_\_\_\_ Linfocitos: \_\_\_\_\_ Plaquetas: \_\_\_\_\_

Hepatograma: \_\_\_\_\_ hemoglobina: \_\_\_\_\_ hematocrito: \_\_\_\_\_

Diagnóstico final:

Frotis: + - PCR: + - IFI: + - rK39: + - AD:  
+ -

### Seguimiento:

Tratamiento implementado: \_\_\_\_\_ Tiempo de tratamiento: \_\_\_\_\_

Cura: \_\_\_\_\_ Secuela: \_\_\_\_\_ Fallecido: \_\_\_\_\_

Estudio serológico post tratamiento

## **ANEXO V: Modelo de consentimiento informado utilizado en el Hospital Escuela de Agudos “Ramón Madariaga” para estudios de LV.**

### **CONSENTIMIENTO INFORMADO**

Esta investigación se realiza en pacientes sospechosos de infección con *Leishmania infantum* con riesgo o probabilidad de sufrir leishmaniosis visceral que son asistidos en la provincia de Misiones y a quienes se solicita que participen en la investigación “Identificación de la especie *Leishmania infantum* y sus variantes genéticas mediante la técnica PCR-RFLP y descripción de características clínico-epidemiológicas en pacientes que concurren a servicios de salud de la Provincia de Misiones”.

Investigador Responsable: Dr. Jorge Deschutter.

Organización: Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales (Universidad Nacional de Misiones)

**Información:** La leishmaniosis visceral es causada por el parásito *Leishmania infantum*. Para el diagnóstico de esta enfermedad es necesario realizar una serie de pruebas de laboratorio, con las cuales luego pueden realizarse investigaciones para mejorar el conocimiento acerca de esta patología. Por este motivo la estamos invitando para que Ud. participe en la investigación que estamos realizando, luego que Ud. haya entendido y aclarado sus dudas sobre la importancia y el alcance de su participación en este estudio.

La razón de este estudio es implementar un nuevo método que permite el diagnóstico temprano de esta enfermedad, favoreciendo la curación por el tratamiento adecuado. Además del diagnóstico, se realiza un estudio complementario para saber cuál es la especie de *Leishmania* que está involucrada y de que variante genética se trata.

Todo paciente con más de dos semanas de fiebre debe ser analizado y en el caso de que se confirme la infección por *Leishmania*, tratado por el médico.

Su participación en el proyecto consiste en permitir la extracción de médula ósea, con la que se realizarán estudios por un nuevo método que permite el diagnóstico temprano y de mayor sensibilidad.

El médico recibirá el resultado de infección o no a los 30 días después de la extracción. Si el análisis es positivo, se realizarán análisis adicionales con el material de médula ósea que fue extraído para determinar de qué especie de *Leishmania* y la variante genética se trata.

Todos los pacientes confirmados serán comunicados a las autoridades provinciales y nacionales de Ministerio de Salud Pública. Toda la información que se publique a partir de esta investigación nunca contendrá el nombre de los pacientes, para mantener la confidencialidad. Solo se publicarán las conclusiones sobre esta investigación. Los datos de los pacientes que participaron en este estudio no serán publicados.

Luego de finalizados todos los estudios, las muestras de sangre y médula ósea serán guardadas en congelador para otros estudios sobre variantes genéticas de *Leishmania infantum*.

La decisión de participar en este estudio es completamente voluntaria. Ud. puede decidir en cualquier momento retirarse de la investigación e igual podrá tener acceso al diagnóstico y tratamiento en los hospitales / centros de salud del Ministerio de Salud Pública de Misiones.

Todos los procedimientos y análisis vinculados a la investigación son gratuitos para usted o su obra social, si la posee.

Si usted desea hacer otras preguntas puede contactar a: Dr. Jorge Deschutter o al Lic. Ricardo Gabriel Díaz Alarcón Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales (FCEQyN, UNaM), Avda. Mariano Moreno 1375, Te.:+54 0376 44435118 / 4427687). -----

“Yo, .....,  
he sido invitada para participar en el estudio denominado “Optimización del diagnóstico de la leishmaniasis visceral humana y canina en Misiones”.

He leído la información proporcionada, o me ha sido leída.

He tenido la oportunidad de realizar preguntas sobre ello y se me ha respondido satisfactoriamente.

Después de recibir esta información que me ha sido leída y explicada acepto mi participación en el estudio, y autorizo las extracciones de sangre que deban realizarse.

Nombres ..... y ..... apellidos  
.....

DNI:.....Fecha de nacimiento (día/ mes/  
año)...../...../.....

Domicilio: Ciudad: ..... Barrio: .....

Calle:.....N°:.....

Teléfono:..... Firma ..... del  
paciente:.....

Médico solicitante: .....

DNI:.....Fecha de solicitud (día/ mes/ año)...../...../.....

Firma y sello del Médico solicitante:.....

Este documento se debe realizar por duplicado, uno para la persona participante y otro para para archivo del estudio.

## **ANEXO VI: Test inmunocromatográfico rápido basado en el antígeno recombinante K39 (ICT).**

En la Figura 12 se muestran ejemplos de resultados positivos y negativos por ICT. La técnica fue realizada siguiendo las instrucciones del fabricante:

1. Se colocaron en un tubo cónico tres gotas del tampón suministrado por el kit.
2. Se añadieron 15 µl de suero en el extremo de la tira indicado para tal fin.
3. Introdujo la tira en el tubo preparado con el tampón y esperar 10 min.
4. El resultado fue leído como negativo si solo aparece la línea de control, y positivo si aparece tanto la línea de control como la de prueba.



Figura 12. Resultados positivo (1) y negativo (2) de ICT.

## **ANEXO VII. Protocolo de Inmunofluorescencia indirecta.**

El protocolo utilizado en nuestro laboratorio está basado en el descrito por "Bray" (Bray, 1985) con ligeras modificaciones.

1. Los promastigotes en fase estacionaria (cepa de referencia MHOM/FR/78/LEM-75 de *L. infantum*) fueron lavados tres veces en PBS 0,01M a pH 7,2, y 10  $\mu$ l de una suspensión de  $2 \times 10^7$  parásitos/ml se dispensaron en portaobjetos de inmunofluorescencia de 15 pocillos.
2. Se secó al aire durante 1 h a 37°C.
3. Seguidamente los portaobjetos fueron fijados con acetona fría (-20°C) durante 5 min.
4. Después de dos lavados en agua destilada, los portaobjetos se dejaron secar al aire.
5. Los sueros se diluyeron convenientemente en PBS al duplo desde la dilución 1/40 (2  $\mu$ l de suero en 80  $\mu$ l de PBS).
6. Se depositaron 10  $\mu$ l de cada dilución en cada uno de los pocillos y se incubaron durante 30 min a 37°C en una cámara húmeda.
7. Se hicieron dos lavados en PBS de 10 min cada uno. Luego de un lavado con agua destilada, los portaobjetos se dejaron secar al aire.
8. Se pusieron 10  $\mu$ l del conjugado marcado con isotiocianato de fluoresceína (FITC) diluido convenientemente según las instrucciones del fabricante (FITC-conjugated rabbit anti-dog IgG (H+L), ICN Laboratories. Plaza, Costa Mesa, California) en 0,01% de Azul de Evans.
9. Los portaobjetos se incubaron durante 30 min a 37°C en una cámara húmeda y en oscuridad.
10. Se realizaron tres lavados con PBS, 10 min cada vez, en agitación y oscuridad, se lavó una vez en agua destilada y los portaobjetos se dejaron secar al aire y en oscuridad.
11. Los portaobjetos fueron montados con glicerol-PBS (9:1) pH 9,2 y un cubreobjetos.
12. Finalmente, los portaobjetos se leyeron en un microscopio de fluorescencia con el objetivo de 40X.

El título de corte utilizado fue 1/80. En la Figura 13 se muestran ejemplos de resultados positivos y negativo de IFI. En el caso positivo, se observan promastigotes coloreados en verde fluorescente; cuando la muestra es negativa los promastigotes se observan en color rojo.

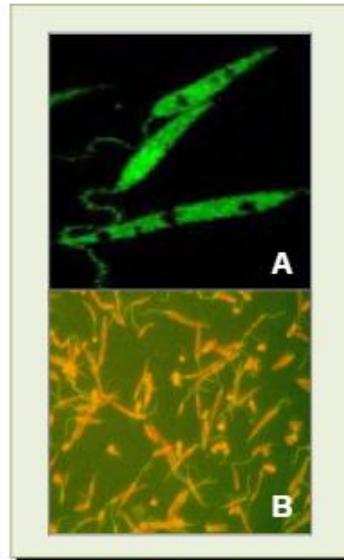


Figura 13. Resultados positivo (A) y negativo (B) de la Inmunofluorescencia indirecta.