

Leishmaniasis Canina en Venezuela: un problema de Salud Pública

(Canine Leishmaniasis in Venezuela: a Public Health's problem)

María Teresa Sánchez R¹ y Martín A. Sánchez S².

1 Maestría en Protozoología, Núcleo Universitario "Rafael Rangel" Instituto Experimental "José Witremundo Torrealba" ULA, Trujillo, Venezuela. 2 Laboratorio de Biología Celular, Instituto de Biomedicina, UCV-MPPS, Caracas, 1010 Venezuela.

RESUMEN

La Leishmaniasis es una enfermedad infecciosa, caracterizada por un espectro de manifestaciones clínicas en humanos y causada por diversas especies del parásito *Leishmania*. Particularmente la Leishmaniasis Visceral (LV) es una zoonosis mortal y en Latinoamérica el agente causal es *Leishmania infantum/chagasi*, la cual afecta principalmente a niños menores de diez (10) años en los que se registra una alta tasa de mortalidad infantil en zonas endémicas, constituyendo así un grave problema de salud pública. El perro doméstico es el principal reservorio de esta enfermedad y a su vez puede o no padecer signos y síntomas de la misma que pueden llevar a la muerte del canino. La tenencia de perros domésticos potencialmente infectados representa un factor de riesgo en zonas endémicas y constituye una alta fuente de transmisión a humanos. La presente revisión abarca los aspectos más resaltantes sobre la epidemiología, diagnóstico, inmunología y tratamiento en caninos así como perspectivas de vacuna y medidas de control de la leishmaniasis visceral canina.

Palabras clave: Leishmaniasis, Caninos, Leishmaniasis visceral

ABSTRACT

Leishmaniasis is an infectious disease characterized by a spectrum of clinical manifestations in humans and caused by various species of *Leishmania* parasite. Particularly Visceral Leishmaniasis (VL) is a fatal zoonosis in Latin America and the causative agent is *Leishmania infantum/chagasi*, which mainly affects children under ten (10) years in which a high rate of infant mortality occurs in endemic areas, representing a serious public health problem. The domestic dog is the main reservoir of the disease and in turn may or may not have signs and symptoms of it that can lead to death of the canine. The possession of potentially infected domestic dogs represents a risk factor in endemic areas and is a high source of transmission to humans. This review covers the most important aspects of the epidemiology, diagnosis, immunology and treatment in dogs and prospects for vaccine and control measures of canine visceral leishmaniasis.

Key Words: leishmaniasis, Canine visceral leishmaniasis.

Introducción

El término leishmaniasis describe a un conjunto de enfermedades causadas por la infección con alguno de los protozoos del género *Leishmania* (Rose, 1903) que se transmite al ser humano y a otros hospedadores vertebrados a través de la picadura de insectos de la familia Psychodidae, del género *Phlebotomus* en Europa, Medio Oriente, Asia y África; y el género *Lutzomyia* en América. David, (2009).

Las Leishmaniasis como síndrome de manifestaciones clínicas en humanos que van desde lesiones simples y autolimitadas de la Leishmaniasis cutánea localizada, pasando por las múltiples discapacitan-

tes y estigmatizantes lesiones en la leishmaniasis cutánea difusa o la destrucción de la mucosa nasofaríngea en la leishmaniasis mucocutánea, hasta las manifestaciones fatales de hepato esplenomegalia y fallo sistémico generalizado que conlleva a la muerte en la leishmaniasis visceral, representan un grave problema de salud pública en Venezuela y el mundo. Particularmente la Leishmaniasis Visceral Afecta principalmente a una población altamente vulnerable como son los niños menores de 10 años que viven en precarias condiciones socio-económicas, donde el 70% son menores de 4 años y en los que se registra una alta tasa de mortalidad infantil Sánchez y Tapia (2005)

La leishmaniasis es una enfermedad de prevalencia alta en muchas regiones tropicales y subtropicales del mundo afectando a 88 países, donde el 90% de los casos anuales de Leishmaniasis Cutánea (LC) se producen en Afganistán, Arabia Saudita, Brasil, Irán, Perú, y Siria (Desjeux, 1996) y el 90% de los

E-mail: martinsanchez1@gmail.com

biologia celular@biomedicina.org.ve

Recibido en versión modificada: 04-11-2013

Aceptado: 10-12-2013

On line: <http://revistas.saber.ula.ve/index.php/talleres/index>
<http://talleresulajwt.blogspot.com>

casos de leishmaniasis visceral (LV) son registrados en cinco países: Bangladesh, India, Nepal, Sudan y Brasil (Desjeux, 2004; Oliaro *et al.*, 2005). WHO en el 2010 refiere que ésta protozoosis registra anualmente 500.000 casos, donde la tasa supera a todas las enfermedades parasitarias a excepción de la malaria la cual se ha intensificado desde la aparición de las co-infecciones con VIH; y cuyas defunciones señalan 50.000 casos, con un subregistro de la enfermedad siendo mortal (Lainson y Shaw, 1987; McMahon-Pratt y Alexander 2004; WHO, 2010).

En América Latina, la LV es endémica, se han detectado factores de riesgo en áreas de Argentina, Bolivia, Brasil, Colombia, Costa Rica, El Salvador, Guatemala, Honduras, México, Nicaragua y Venezuela (OPS, 2005). La presencia de insectos vectores en nuestras ciudades y la posibilidad que tienen los pacientes inmunosuprimidos de servir de fuente de infección de enfermedades infecciosas como la LV, es un panorama que ha llevado a la realización de investigaciones donde también se analizan las variables fisiográficas que están facilitando los procesos de adaptación (Costa *et al.*, 1990). Por consiguiente, esta diversidad de parásitos ha dado lugar a diferentes interacciones entre parásito-hospedador, donde están involucrados distintos factores de virulencia y marcadas diferencias entre los mecanismos inmunes que median susceptibilidad/resistencia a la infección y a la inmunopatología asociada con la enfermedad.

En Venezuela la incidencia de LV en pacientes diagnosticados por sintomatología clínica ha alcanzado hasta los 50 casos anuales donde el subregistro de casos puede ser del orden de tres veces más el número reportado, siendo conocido en dispersos focos de las áreas central, sur este y oeste del país (Feliciangeli, 1991; Zulueta *et al.*, 1999). En estudios epidemiológicos realizados por (Zerpa *et al.*, 2000) en la Isla de Margarita en el estado Nueva Esparta, señaló un importante aumento en la incidencia de LV en esta área, con potencial magnitud epidemiológica si se compara con la incidencia de casos reportados en otros estados del país. En Venezuela, desde el año 1997 hasta el 2006 se notificaron 456 casos de LV humana en 24 estados, de los cuales, 131 (28,7%) correspondían a casos reportados en el estado Nueva Esparta, con una tasa de incidencia de 32,70 por 100.000 habitantes (Instituto de Biomedicina, 2006). La mortalidad en pacientes con LV fue de 7,85% durante el periodo 1995-2000 (Ortiz *et al.*, 2003).

En zonas endémicas de LV la población canina constituye el principal reservorio de parásitos. En Venezuela, particularmente en el estado Nueva Esparta el diagnóstico serológico mediante ELISA utilizando el antígeno rK39 de *L. chagasi* y promastigotes de *L. donovani*, demostró una alta susceptibilidad frente a *L. chagasi* en la población canina, con un incremen-

to en la transmisión en un periodo de 10 meses de estudio, determinado por el aumento de positividad del ELISA a ambos antígenos de un 24% al inicio del estudio hasta un 40% al final del periodo (Zerpa *et al.*, 2000).

Existen numerosas revisiones que abarcan diversos aspectos de la Leishmaniasis en humanos, sin embargo muchas de estas obvian la importancia del perro doméstico como reservorio, su papel en el ciclo de transmisión y más importante aun los datos epidemiológicos, el diagnóstico clínico parasitológico y las limitaciones para su control y tratamiento.

Ciclo de Vida del parásito vector y reservorios:

Las Leishmanias en su forma intracelular o amastigote en el vertebrado son ingeridas por la hembra hematófaga del insecto vector, cuando realiza su alimentación sanguínea sobre el reservorio, donde sufren una transformación en el tubo digestivo del insecto a la forma extracelular o promastigote, de morfología alargada y móvil, de 10 a 14 mm de longitud por 1,5 a 3,5 mm de ancho aproximadamente que luego de multiplicarse por fisión binaria migran hacia la probóscide siendo transferidos a otro hospedador vertebrado, en una segunda ingesta sanguínea del vector al ser inoculadas nuevamente a través de la picadura. En este momento son interiorizadas por las células fagocíticas, transformándose en amastigotes (redondeado ovoide, sin movimiento, con un tamaño aproximado de 2,5 a 5 mm de largo por 2 mm de ancho), reproduciéndose activamente, y rompiendo las células para dirigirse luego de las primeras proliferaciones hacia los órganos internos ricos en células del sistema fagocítico mononuclear emigrando así, hacia hígado, bazo y médula ósea principalmente (Rey, 1999). Una vez diseminados por todo el cuerpo del hospedador, el ciclo se completa al ser transmitidos al insecto vector no infectado en una nueva picadura (Esch y Petersen 2013) (Figura 1)

Los vectores de la leishmaniasis son dípteros de la familia *Psychodidae*, cuyos nombres autóctonos varían según la zona geográfica en que se localizan. En Venezuela son pocos conocidos por sus habitantes, quienes le llaman angoletas, palomillas, tarrayitas, etc., y por lo general no lo relacionan con la transmisión de la leishmaniasis visceral. De éstos insectos se conocen que unas 30 especies son vectores demostrados y más de 20 especies son patógenos para los humanos y los caninos (*Canis familiaris*) (Ashford, 2000; Desjeux, 2004). En la escala zoológica los vectores de la leishmaniasis se ubican en el Phylum Artrópoda, Clase Insecta, Orden Díptera, suborden Nematóceras, Familia *Psychodidae* y Subfamilia *Plebotominae* según clasificación propuesta por (Young y Duncan., 1994). En las Américas, se agrupan en tres Géneros: *Bruptomomyia*, *Warileyia* y *Lutzomyia*, sólo esta última especie es de importancia epidemiológica.

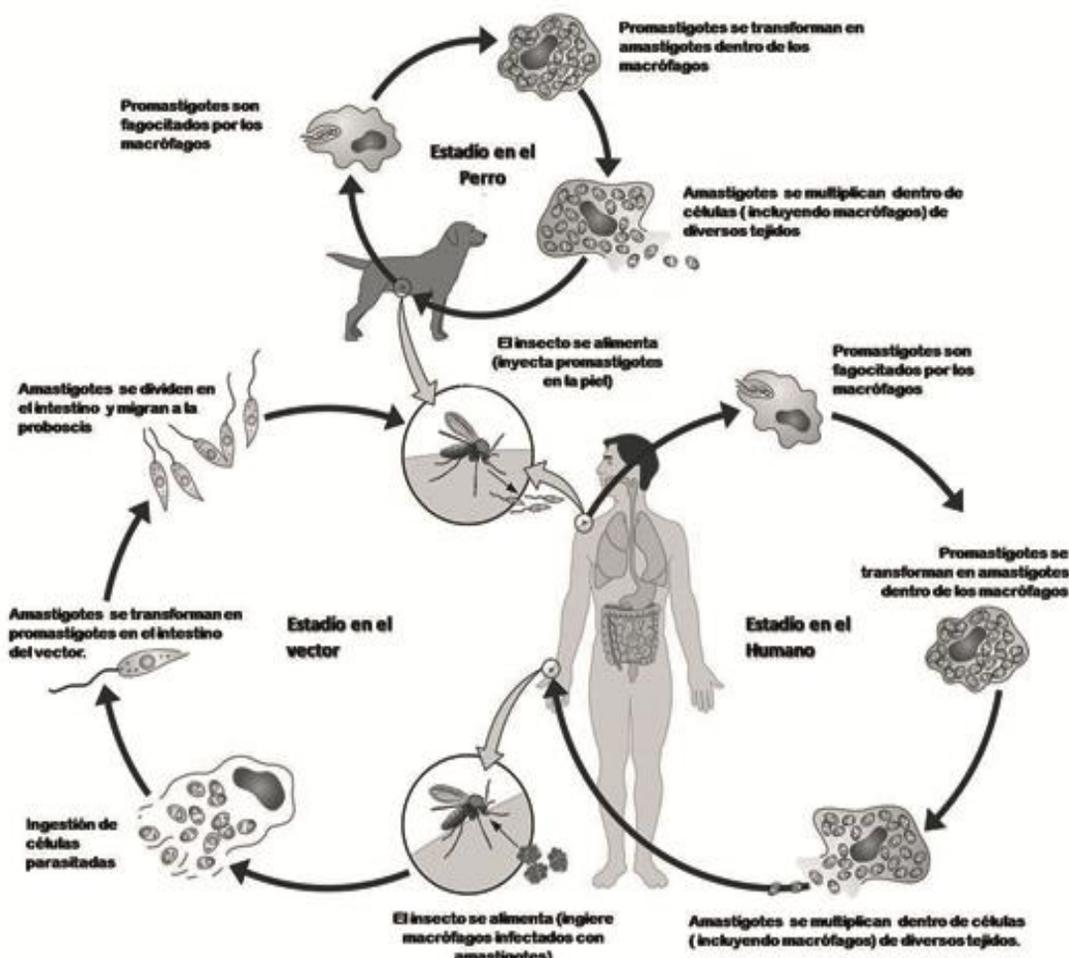


Figura 1 El ciclo de vida de las especies de *Leishmania*. Los mosquitos inyectan promastigotes infectivos en un mamífero susceptible durante la alimentación. Promastigotes son fagocitados por los fagocitos residentes, se transforman en amastigotes y se multiplican dentro de estas células a través de división simple. El parásito continúa infectando células fagocíticas ya sea en el sitio de la infección cutánea o en los órganos linfoides secundarios, con eventual parasitemia. Los mosquitos se infectan a través de la alimentación en un hospedador, ya sea con una lesión activa de la piel o con parasitemia en LV. Los parásitos se convierten en promastigotes en el intestino medio del flebótomo. Los promastigotes migran desde el intestino medio y se transforman en promastigotes metacíclicos altamente infecciosos. Tomado de Esch KJ, Petersen CA. Transmission and epidemiology of zoonotic protozoal diseases of companion animals. Clin Microbiol Rev. 2013 Jan;26(1):58-85. Copyright American Society for Microbiology (ASM) bajo licencia N° 3416820687936

En cuanto al Subgénero *Lutzomyia* se encuentran *Lu. longipalpis* principal vector de LV en varios países de América, el cual es vector de *L. chagasi* (Ramírez et al., 2006; Dantas, 2008). *Lutzomyia longipalpis* que es de hecho, un vector muy eficaz, no sólo por sus hábitos como vector, sino también por su amplia distribución continental la cual se extendió en gran parte por América del Sur hasta América Central. Por lo que hoy en día, se acepta con plena convicción de que *L. longipalpis* es el agente transmisor más importante de la LV en el continente americano (Rioux et al., 1990).

El reservorio es aquel animal que garantiza la supervivencia del agente etiológico el cual es fuente de infección para el hombre en un área endémica. Baneth (2007) recalcó que los reservorios del pará-

sito *Leishmania* eran animales domésticos y silvestres, y que dentro de los animales domésticos se encontraba el perro el cual se destaca por ser un excelente reservorio primario y para ello existen tres razones principales: a) Que el periodo pre patente es variable en cada perro ya que podría ser desde 3 meses hasta varios años. b) La alta concentración de amastigotes en la piel, de tanto los perros sintomáticos como los asintomáticos que pueden infectar al vector. c) El alto porcentaje de recaídas de un perro con leishmaniasis después del tratamiento, la vida media puede ser de dos a tres años (Reithinger et al., 1999; Baneth, 2007; Todoli et al., 2008).

En Venezuela (Zerpa et al., 2000; Sánchez et al., 2004; Sánchez y Tapia., 2005), señalaron los perros

domésticos como reservorios de *L. infantum/chagasi* los cuales constituyen la principal fuente de infección para los humanos con leishmaniasis visceral americana (LVA).

De la misma forma Acha *et al.*, 2003; Lainson y Rangel, 2005; Ramírez *et al.*, 2006 señalaron que los Reservorios Secundarios pudieran corresponder a los mamíferos silvestres infectados, como son la rata doméstica (*Rattus rattus*), la zarigüeya (*Didelphis marsupialis*), los zorros (*Cercdocyon thous*, *Lycalopex vetulus*), los lobos (*Canis lupus*), los chacaes (*Canis aureus*), el oso perezoso (*Choloepus didactylus*), el oso de dos dedos (*Choloepus hoffmanni*) y el oso hormiguero (*Tamadia tetradactyla*) (Acha *et al.*, 2003; Lainson y Rangel, 2005; Ramírez *et al.*, 2006).

Por otra parte CFSPH en 2004; Miró en 2007; Diniz *et al.*, en 2008, llamaron reservorios Incidentales a los hospedadores paraténicos, que tenían escasa relevancia en el mantenimiento o transmisión de la enfermedad y, entre ellos se encontraron; la salamandesa (*Tarentola mauratica*) (Nájera Angulo, 1935), la gallina (*Gallus gallus*) (Botet *et al.*, 1993), el cordero (*Ovis aries*) (Gonzalo Barrio, 1931), el hurón (*Mustela putorius furo*) (Orts Ruiz, 1964), el caballo (*Equus caballus*) (Solano-Gallego *et al.*, 2003, Fernández Bellón *et al.*, 2006), las cabras (*Capra aegagrus hircus*), y las ovejas (*Ovis aries*) (Portús *et al.*, 2002) y el gato (*Felis silvestris catus*) (Laurelle-Magalon *et al.*, 1998; CFSPH, 2004; Miró, 2007; Diniz *et al.*, 2008).

Leishmaniasis Visceral Canina (LVC)

Charles Nicolle en 1908, descubrió la enfermedad en el perro (*Canis familiaris*), en la cuenca del Mediterráneo en Túnez, y lo señaló como el reservorio en la transmisión doméstica y peridoméstica de la leishmaniasis humanas, las cuales tenían un comportamiento de zoonosis hipoendémicas, interviniendo como el principal reservorio de la especie *Leishmania infantum* (Portús *et al.*, 1982, Alvar *et al.*, 1994; Jiménez *et al.*, 1991)

Epidemiología de la LVC

La leishmaniasis visceral canina es una enfermedad endémica de los países de la Cuenca del Mediterráneo, provocada por *Leishmania infantum* en Portugal, España, Malta, Croacia, Bosnia-Herzegovina, Montenegro, Albania, Grecia y Chipre, el sur de Europa, las Américas, África del Norte y Asia, de altas proporciones de perros que fueron expuestos en esas áreas al patógeno y que durante la colonización portuguesa y española estos caninos infectados fueron importados y distribuidos a América Latina en su mayor parte a América del Sur y América Central. El número de perros infectados en Sur América es estimado en millones con una alta tasa de infección en algunas áreas de Brasil y Venezuela cuya prevalencia es variable entre dos o más periodos y hasta incluso dentro de un mismo perio-

do (Killick-Kendrick, *et al.*, 1999; Baneth, 2006; Oliva *et al.*, 2006; Sousa *et al.*, 2009). La leishmaniasis visceral afecta a las personas, a los animales salvajes y domésticos en todas las regiones templadas, subtropicales y tropicales del mundo es importante tener en cuenta: a) son enfermedades de transmisión rural, localizadas en zonas remotas, b) la distribución en las zonas endémicas es frecuentemente discontinua, c) muchos casos no son diagnosticados por falta de atención médica o por ser asintomáticos y d) es enfermedad de declaración obligatoria en sólo 40 países de los 88 afectados de leishmaniasis (Badaro *et al.*, 1986 y Desjeux, 1996).

La Oficina Internacional de Enzootias (OIE) establecida en 1924 reporta la presencia de casos de leishmaniasis en perros en al menos 42 países: 16 de Europa, 6 de África, 8 de Asia y 12 de América, e incluso se ha descrito en canguros en Australia (Rose *et al.*, 2004). También se han reportado casos en países del África y sur América considerados como no endémicos para la leishmaniasis y los casos detectados son el resultado del desplazamiento de los animales afectados a las zonas endémicas y, es por ello que se considera a la leishmaniasis como una enfermedad emergente y/o re-emergente junto con otras también transmitidas por artrópodos (Ashford, 2000; Desjeux, 2001; Rose *et al.*, 2004).

En América los perros domésticos han sido investigados como reservorios potenciales de leishmaniasis desde el descubrimiento de esta enfermedad. Las primeras observaciones sobre leishmaniasis cutánea canina se realizaron en el estado de São Paulo, Brasil, en 1913, y 1955 (Pedroso, 1913, Forattini, 1955), en Argentina (Mazza, 1926 y Abalos, 1949), Venezuela (Pifano 1960, y Pons, 1968), y posteriormente en Colombia en los años 90 (Travi, 2000). Se ha retomado la Tendencia a hablar de Leishmaniasis canina (LCan) para referirse indistintamente a infección en perros por especies que causan leishmaniasis cutánea o visceral, sin embargo dada la poca acogida del término en función de la baja inefectividad que puedan representar las lesiones cutáneas en caninos y la severidad de la enfermedad visceral en canes donde no solo son reservorios y potenciales transmisores si no víctimas de la patología asociada a la infección. Se mantiene el acrónimo LVC para referirse a la enfermedad visceral en Canes distinguiéndola así de la cutánea.

Fue a partir de 1941, que los Dres., A. Martínez Nochet y Adolfo R. Pons describieron el primer caso de kala-azar en Venezuela, en un sujeto procedente del estado Guárico, en diversos sitios del país como el Litoral del Dtto., Federal, y en los Estados Bolívar, Carabobo, Lara, Cojedes, Aragua, y Zulia, donde los casos descritos fueron de carácter esporádico (Martínez y Pons 1941). En cuanto a la

existencia de la leishmaniasis canina en Venezuela se admite sin lugar a dudas, y la consecuencia de ello es que pudieron observarse caninos enflaquecidos, con fiebre, diarrea, aumento del bazo, ulceraciones cutáneas de curso crónico y muerte, que eran características de la enfermedad, pero que al examen en sangre no hallaron *Leishmanias* en ellos (Gallo, 1946). Esto probablemente debido a las limitaciones de la época y al tipo de muestra utilizado el cual probablemente fue el examen parasitológico directo en frotis. Fue Medina *et al.* (1960) quienes describieron el primer hallazgo de un perro infectado con *Leishmania* en el estado Miranda, el cual presentó signos clínicos evidentes de la enfermedad. En el foco central, en el estado Guárico de Venezuela, Torrealba y colaboradores en el año 1961 hicieron un censo a 81 perros (*Canis familiaris*) cuyo resultado positivo fue de 27,3% (21/77), en donde realizaron búsquedas de los parásitos en 13 perros con serología positiva (Torrealba *et al.*, 1961). Posteriormente, Torrealba, en 1970, en su Tesis Doctoral inspeccionó a 112 perros en zonas rurales del estado Guárico, donde demostró que un 10,7% (12) de los perros fueron positivos a *Leishmania* (Torrealba, 1970).

En el estado Trujillo, Moreno en 1982 demostró la presencia del parásito en perros con una prevalencia del 2% en 49 perros examinados, a través del examen directo del raspado de piel de la oreja, en frotis de punción ganglionar y de médula ósea (Moreno y Oviedo, 1982).

Así mismo Zerpa *et al.*, 2003 reporta un 13,2% de positividad general, al . Antígeno rk39, en un total de 3.025 perros domésticos desde 1998 hasta el 2000, obteniendo la mayor prevalencia en los estados Nueva Esparta 28,5% (347/1217 perros) Falcón 20,0% (1/5), Guárico 6,3% (12/189), Lara 6,8% (10/146), estados: Anzoátegui 5,5% (17/307) y Aragua 1,3% (4/308), seguidos de Sucre, Trujillo, Cojedes, Bolívar Carabobo y Portuguesa con menos del 2%. Posteriormente, un estudio retrospectivo realizado en el instituto de Biomedicina por Ortega y Col, 2014, analizando los datos oficiales reportados en el periodo 2004-2012, demostró que en 13 entidades federales endémicas para la LV en Venezuela, mostraron una prevalencia del 14,8% siendo los estados Lara (19%) y Guárico (18%) los que presentaron mayor incidencia de la enfermedad para este periodo. Sin embargo, para los años 2010-2012, la incidencia de la LVC para las entidades federales como Anzoátegui, Aragua, Carabobo, Cojedes, Nueva Esparta y Sucre se mantuvo entre un 3% y un 31%. (Zerpa *et al.*, 2003; Ortega-Moreno *et al.*, 2014).

Diagnóstico de la Leishmaniasis Visceral en Caninos:

El diagnóstico de la enfermedad en caninos se basa tanto en el examen clínico donde se detectan la presencia de signos y síntomas característicos de

enfermedad visceral así como en la positividad de pruebas diagnósticas de laboratorio que evidencien la presencia de parásitos de *Leishmania*. Sin embargo es necesario tener en cuenta la procedencia del canino y la epidemiología de la región, si es endémica o no para leishmaniasis pues algunos de los signos en caninos pueden ser ocasionados por otras parasitosis; por lo que el diagnóstico diferencial con otras patologías es muy importante.

Diagnóstico Clínico:

La sintomatología clínica producto de la infección por *Leishmania* ocurre por la inmunopatología asociada a la infección: Luego de la inoculación, los promastigotes proliferan en los macrófagos de la zona y, tras un periodo de semanas o meses, invaden órganos internos tales como el bazo, hígado, médula ósea, y otros, en los que se multiplican, destruyendo los macrófagos en este proceso. La muerte acontece en las primeras semanas, o a los pocos años de contraer la infección (Soulsby, 1987). Al examen se observan emaciación, anemia, bazo intensamente agrandado, así como agrandamiento hepático con una importante infiltración grasa, las células endoteliales y los macrófagos contienen masas de amastigotes y generalmente, los ganglios linfáticos se presentan infartados, con sus células invadidas por formas infectantes (Soulsby, 1987).

Los síntomas más comunes y evidentes de LVC están representados en la figura 2 como: anemia, emaciación, caquexia (figura 2b), uñas deformadas alargadas (onicogrifosis; figura 2c), dermatitis y pérdida de pelo alrededor de los ojos y la boca, ganglios linfáticos subcutáneos infartados, hemorragia en el hocico y, por último la muerte, siendo la diarrea el signo clínico terminal. En el examen post mortem puede apreciarse esplenomegalia (figura 2d), hepatomegalia y adenopatías. Pueden ocurrir lesiones cutáneas con caída de pelo y ulceraciones en labios y párpados. En los casos crónicos son evidentes un eczema típico y ulceración de la piel

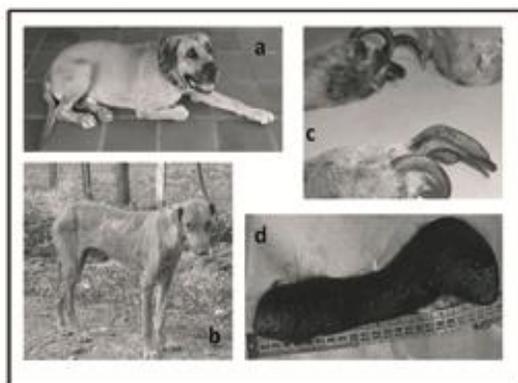


Figura 2. Signos y síntomas más relevantes de LVC. a, individuo sano. b, individuo con caquexia. c, onicogrifosis. d, esplenomegalia. Imágenes cortesía de: a) MA. Sánchez, b) A. Salgado, c) L. Ferrer, d) M. Ortega.

(Soulsby, 1987; MSPAS, 1996; Urguhart, 2001 Sánchez y Tapia, 2005; Ortega-Moreno et al., 2014).

Diagnóstico Parasitológico:

Consiste en la identificación del parásito a partir de las lesiones o de material extraído de las lesiones o de punción de médula ósea si se trata de LV. Ya sea a simple vista en un examen directo mediante frotis por aposición. En cualquier caso se procede a realizar una coloración de **Giemsa** para visualizar al microscopio los amastigotes que se distinguen de los núcleos celulares del hospedador y en los cuales, a través de objetivo de inmersión, permiten visualizar la membrana celular, el núcleo y el kinetoplasto. Alternativamente el material extraído también puede cultivarse en placas con medios que permitan el crecimiento y posterior aislamiento e identificación del parásito, o puede inocularse en animales como ratones o hámsteres con el mismo fin (Sánchez et al., 2004).

Una técnica de uso menos frecuente pero de utilidad para el diagnóstico es el **xenodiagnóstico** que consiste en dejar que flebotomos susceptibles a *Leishmania* piquen e ingieran sangre de un posible paciente, para el posterior aislamiento del patógeno (Alvar, 1994, Ezquerro, 2001 y Gradoni, 2002).

Alternativamente otras técnicas de detección del parásito de manera indirecta consisten en la visualización de amastigotes del parásito en tejido mediante cortes finos e **inmunotinción del parásito** con anticuerpos específicos ya sean marcados con fluoresceína o usando como revelador el sistema avidina-biotina inmunoperoxidasa (Sánchez- Tapia, 2005) Si embargo la técnica más específica y sensible es la detección de ADN del parásito mediante la reacción en cadena de la polimerasa o **PCR**, pudiéndose detectar ADN genómico o del kinetoplasto en sangre, piel, ganglios, conjuntiva y aspirados de médula ósea, sin embargo la sensibilidad de esta técnica también está sujeta a la carga parasitaria en estos compartimientos, la calidad de la muestra y el método de extracción de ADN empleado (Solano-gallego et al, 2000)

Diagnóstico Serológico:

Se basa en la detección de anticuerpos específicos contra *Leishmania*, son de gran utilidad en los casos de Leishmaniasis visceral canina pero muy poco sensibles en los casos de Leishmaniasis cutánea debido a la baja producción de anticuerpos. Existen variados sistemas de detección de anticuerpo que van desde los más inespecíficos como es la **Técnica de formol-gelificación** que solo demuestra visualmente el incremento en la producción de anticuerpos (Felicangeli et al., 2010), medianamente específicos como el **Test de aglutinación directa (DAT)** que consiste en una reacción de titulación en microplacas de 96 pozos, empleando anti-

genos de parásitos formalinizados y teñidos con azul de cumasie. La formación de un manto de aglutinación en el pocillo indicará la presencia de Ac, mientras que en su ausencia se formará un botón en el fondo del pocillo (Votta, 1974).

La prueba serológica considerada en muchos países como la "prueba de oro o gold estándar" es la **Inmunofluorescencia indirecta IFI (IFAT)** Es un método utilizado para todos los tipos de leishmaniasis, para detectar y medir los anticuerpos contra antígenos de superficie del parásito *Leishmania* fijados en portaobjetos, y revelados con un anti anticuerpo conjugado con fluoresceína el cual al visualizar al microscopio de fluorescencia se observan los parásitos verde manzana denotando la presencia de anticuerpos. Sin embargo esta técnica puede producir reacción cruzada entre la LC, LV y Enfermedad de Chagas aunque los títulos son más altos con el antígeno homólogo respectivo (Alvar et al., 2004)

Las pruebas serológicas más específicas como la ELISA o las pruebas rápidas inmunocromatográficas en tira de papel o **Dipstick** actualmente se aplican usando antígenos específicos para cada especie de *Leishmania* o proteínas recombinantes como el rK39. En cualquier caso todas estas pruebas tienen sus limitaciones en L. Can ya que existe un 5% de perros sintomáticos que no producen anticuerpos mas son parasitológicamente positivos. También dependiendo del momento de toma de muestra en zona endémica puede existir una proporción de perros asintomáticos con niveles indetectables de anticuerpo pero positivos las pruebas de inmunidad celular como la hipersensibilidad retardada a antígenos de *Leishmania* o leishmanina. (Alvar et al., 2004)

Inmunología de la LVC:

Aunque no se conocen los mecanismos involucrados en la generación de protección o susceptibilidad en los perros luego de la infección, se establece que existe una efectiva inmunidad mediada por células, capaces de controlar la infección permaneciendo el animal asintomático, al contrario ocurre, cuando hay evidencia de los signos y síntomas en los perros, dan lugar a la diseminación de los parásitos en médula ósea, hígado y bazo causando una enfermedad crónica, donde la respuesta inmune es descontrolada en el hospedador haciéndola potencialmente fatal (Pinelli col., 1994; Moreno y Alvar, 2002, Sánchez y col, 2004). Cuando está ausente la inmunidad celular específica contra el parásito en perros sintomáticos se reduce la respuesta linfoproliferativa de los linfocitos T, frente a los antígenos de *Leishmania*, lo cual conlleva a una depresión en la proporción de linfocitos TDC4+ en sangre periférica en perros sintomáticos en relación a los no infectados (Moreno et al., 1999; Pinelli et al., 1999; Solano-Gallego et al., 2000; Sánchez et al., 2004).

Existe una asociación entre la respuesta de los linfocitos T tipo Th1 y la resistencia a la L. Can. Por otra parte las células mononucleares de sangre periférica proveniente de animales asintomáticos van a responder a los mitógenos del parásito elevando la producción de las INF- γ , IL2 y TNF α (Pinelli et al., 1994), mientras que los perros sintomáticos van a mostrar una respuesta elevada de tipo Th2, con producción de aumento de los anticuerpos de IL-4, IL6, e IL-10 (Pinelli col., 1994; Moreno y Alvar, 2002; Sánchez et al., 2004). La interacción entre los linfocitos T y las células presentadoras de antígeno como las células dendríticas y macrófagos son fundamentales para el establecimiento de la respuesta inmune organizada contra los patógenos en general. El papel de los macrófagos en la respuesta inmune a parte de servir como células hospedadoras para los parásitos de *Leishmania*, consiste en actuar como células presentadoras de antígenos y dependiendo de la capacidad de respuesta a las citocinas provenientes de la interacción con el linfocito T durante el curso de la enfermedad, estos se activarán y eliminarán a los patógenos mediante la producción de óxido nítrico (ON) y otros compuestos mediadores del oxígeno reactivo (Fang, 1997).

El ON en los macrófagos caninos tiene una función de *anti-Leishmania*, ya que los macrófagos al ser infectados con *L. infantum* aumentan su capacidad leishmanicida (Panaro et al., 1998). Igualmente las citocinas Th1 como INF- γ , incrementan la producción de ON en macrófagos caninos infectados con *L. infantum*, mientras que las citocinas como IL-4 se asocian a una producción disminuida de ON (Pinelli et al., 1994; Quinnell et al., 2001; Sánchez y Tapia., 2005).

Se ha demostrado la existencia de inmunidad órgano-específica para LV en perros naturalmente infectados con una elevada carga parasitaria y una mayor proporción de células infectadas en hígado y bazo de perros sintomáticos con *L. infantum/L. chagasi* a diferencia de perros asintomáticos; estas diferencias fueron asociadas con los signos clínicos y guardaban relación con cambios a nivel estructural y en la composición de células inmunocompetentes de hígado y bazo así como en la producción de citocinas. En perros asintomáticos la presencia de granulomas bien definidos con una elevada proporción de Linfocitos TCD4+ y CD8+ efectores, así como la expresión de moléculas de adhesión y activación, y citocinas pro- inflamatorias (IL-12, IFN- γ) fueron asociadas a la expresión de moléculas de clase II del complejo principal de histocompatibilidad, lo que indicó el establecimiento de una inmunidad celular eficiente, que permite a estos animales permanezcan infectados con una baja carga parasitaria mostrando pocos o ningún signo clínico (Sánchez et al., 2004, Aguilar et al., 2009). En contraste la ausencia de granulomas maduros en hígado, la marcada depresión de linfocitos T, las

moléculas de adhesión y activación de integrinas en los perros sintomáticos pudieran ser determinantes en la diseminación del parásito y eventualmente la muerte (Sánchez et al., 2004). Además, la proliferación incontrolada de linfocitos B, la sobreproducción de anticuerpos y la falta de la falta de regulación de linfocitos de T, resultan en la formación de complejos inmunes circulantes que pueden ser depositados en las paredes de los vasos causando vasculitis, poliartritis, uveítis, y glomerulonefritis (Strauss-Ayali, 2001; Sánchez et al., 2004).

Tratamiento:

El tratamiento de LCan es difícil y los perros a menudo recaen, la localización intracelular del parásito y su metabolismo lo protegen del sistema inmune del hospedador y de la mayoría de las terapias, a su vez la progresión de la enfermedad está asociada a una inmunidad celular deprimida y a una fuerte respuesta humoral, por lo que una terapia efectiva, tiene que ir acompañada de una significativa disminución de anticuerpos cuyo reflejo sea la muerte de los parásitos y la eliminación de los antígenos (Miró, 2007).

Cuando los tratamientos no son ampliamente efectivos, los signos clínicos pueden desaparecer o disminuir mas no alcanzan la inmunidad estéril y las recaídas ocurren en un 80% de los casos (Moreno y Alvar, 2002, Sánchez et al., 2004). Las drogas comúnmente utilizadas son capaces de disminuir la carga parasitaria a niveles casi indetectables, y lograr el restablecimiento de los linfocitos TCD4+ a niveles normales disminuyendo así el riesgo de transmisión al vector. Sin embargo si el tratamiento es interrumpido, la inmunidad celular retorna a bajos niveles y por tanto aumenta el riesgo de infectividad (Guarga et al., 2002; Sánchez et al., 2004). En este sentido la OMS no recomienda el tratamiento en caninos con las mismas drogas utilizadas en humanos como los antimoniales, anfotericina y miltefosina, pues su eficacia en caninos es muy relativa y existe el riesgo de generación de cepas del parásito quimioresistentes que puedan potencialmente transmitirse a la población (Alvar, 2004; Sánchez y Tapia 2005)

El Alopurinol es un análogo de la purina, que ejerce efectos inhibidores en el crecimiento y replicación del parásito bloqueando la síntesis de ARN. Sin embargo, sus efectos son parasitostáticos más que parasiticidas, se usa frecuentemente combinado con antimoniales pentavalentes, (Denerolle, 1999; Strauss-Ayali, 2001, Sánchez et al., 2004).

La Anfotericina B (Brajtburg et al., 1990) es un macrólido poliélico tradicionalmente empleado como antifúngico, que se une a los lípidos de la membrana de la *Leishmania*, provocando pérdida del potasio, aminoácidos y purinas, en perros induce a una mejoría clínica de un 85 a 100% de los casos, con riesgo a recidivas y es muy nefrotóxica (Cortadellas, 2003; Noli et al., 2005).

Antimoniales Pentavalentes: Antimonio de Meglumine y Estibogluconato de sodio; ellos actúan inhibiendo selectivamente las enzimas de la *Leishmania* implicados en la glucólisis y la oxidación de los ácidos grasos, para la producción de adenosin trifosfato (ATP), los esquemas de tratamiento son variados y difieren a los establecido en humanos. Además la farmacocinética en perros no ha sido bien estudiada y al igual que en humanos su uso frecuente ha provocado resistencia en el parásito, (Barret *et al.*, 1999). Por otro lado Page en el 2002 señaló otra droga la Miltefosina obstaculiza las vías de señalización celular y la síntesis de la membrana celular del parásito (Page, 2002). A través de la Inhibición de la biosíntesis de fijadores GFI (glicosil-fosfatidil-inositol) entre otros, (Lira *et al.*, 2001; Lux *et al.*, 2000). A causa de estos efectos en las vías mitogénicas del parásito, miltefosina finalmente induce una muerte celular similar a la apoptosis (Verma *et al.*, 2004).

Otras drogas también probadas en leishmaniasis visceral canina pero con relativa poca eficacia son: El Metronidazol combinado con la espiramicina (Pennisi *et al.*, 2005), la Pentamidina (Pérez, 2007), el Imiquimod (Festa *et al.*, 2006) que es un fármaco inmunoestimulante, la Paramomicina (Pérez, 2007), la Sitamiquina (Croft *et al.*, 2006; Chappuis *et al.*, 2007; Pérez, 2007) y la domperidona que es una antagonista de los receptores D2 de dopamina y es capaz de estimular la respuesta inmune celular, incrementando el potencial leishmanicida de neutrófilos y macrófagos (Gomez-Ochoa *et al.*, 2009) Esta droga logró reducir el título de anticuerpos y la sintomatología en perros infectados en ensayos clínicos en Brazil y actualmente está siendo probada como droga preventiva en zonas endémicas ensayos clínicos con hasta un 77% de prevención en un periodo de 21 meses de estudio (Sabate *et al.*, 2014). Cabe destacar que ninguno de estos medicamentos está registrado para uso en medicina veterinaria.

Vacunas

Muchos de los parásitos de *Leishmania* ocasionan dificultades para el desarrollo de una vacuna eficaz contra la LVC, porque provocan respuestas inmunitarias nulas en el huésped previniendo su eliminación y prolongando la infección, además desarrollan estrategias de evasión de respuestas inmunológicas, como la supresión de mecanismos leishmanicidas en el interior del macrófago, la inhibición de la presentación de antígenos o la infección de células sin capacidad leishmanicida (Bogdan *et al.*, 1990 ; Crampton y Vanniasinkam, 2007).

La eficacia de una vacuna consiste en generar una respuesta inmunológica protectora de larga duración, donde la vacuna debe producir una respuesta Th1 con activación de los linfocitos TCD4+ y CD8+ específicos, producción de IFN- γ e inducción

de ON en los macrófagos permitiendo el control de los parásitos (Barbieri, 2006). Por otro lado debería conferir una reacción cruzada con otros tipos de *Leishmania* dirigiéndose a los antígenos conservados evolutivamente (Palatnik de Sousa, 2008).

El desarrollo de una vacuna ha de seguir diferentes fases, basadas en pruebas preclínicas (3-4 años) que consisten en realizar ensayos de laboratorio; luego pasa a la fase I donde se evalúan la seguridad y dosificación (1,5 años); prontamente los ensayos de la fase II evalúan la protección inducida por la vacuna ante una infección experimental (2 años de duración), y en la fase III se evalúa la eficacia de la vacuna en condiciones naturales, los cuales son los llamados estudios de campo que duran de 3 a 10 años. Si la vacuna supera con éxito estas tres fases puede registrarse y comercializarse para entrar a fase IV o farmacovigilancia, donde se realiza un seguimiento de la misma en las condiciones habituales de uso (López *et al.*, 2004; Todoli *et al.*, 2008).

Existen además muchos factores que determinan la efectividad de una vacuna, como lo son la escogencia de un adyuvante apropiado, la ruta de administración y las condiciones intrínsecas (susceptibilidad genética, microambiente) del modelo experimental. Por otra parte debe haber consenso en los marcadores inmunológicos a determinar en los ensayos de vacunación para hacer comparables los estudios. Estos factores deben ser evaluados extensivamente antes de iniciar protocolos masivos de vacunación (Sánchez y Tapia, 2005, Reis *et al.*, 2010).

A pesar de todas estas pruebas aún no se ha desarrollado para humanos o caninos una vacuna 100% eficaz que logre este objetivo, aunque existen diferentes tipos de vacunas según:

Vacunas de 1era Generación Vacunas Muertas o Inactivadas: son vacunas con el parásito muerto cuyos estudios comenzaron en 1940 en Brasil, luego Mayrink en 1970 creó una vacuna muerta compuesta de 5 aislados del parásito de *Leishmania* conteniendo 4 especies diferentes (Mayrink *et al.*, 1978 y 1979), y de las diferentes vacunas ensayadas en el modelo canino frente a LV, la única vacuna con resultados positivos está en fase III la Alum-ALM-BCG (Mohebal *et al.*, 2004).

Vacuna de 2da Generación o Vacunas Recombinantes: consiste en la inmunización con determinadas fracciones del parásito purificadas o sintetizadas de *L. donovani*, cuyos resultados fueron mostrados en la fase III, contiene el ligando de la glicoproteína Fucosa- Manosa (FML) de promastigotes de *L. donovani* que está presente en la superficie del parásito durante todo el ciclo biológico y es un potente inmunogéno. Probó ser efectiva en ensayos clínicos no comparables en Brasil (Da Silva *et al* 2001) con un 80% de protección clínica. "Leishmune" es comercializada en Brasil desde

2004 y está en fase de registro en Europa (Khamesipour *et al.*, 2006, Roberts, 2006; Meeusen *et al.*, 2007; OIE, 2008). Otra vacuna recombinante también en fase experimental es el LiESAp-MDP (LiESAp: *L. infantum* excreted secreted antigens from promastigotes), desarrollada en Francia con una eficacia del 92% en ensayos de fase I (Diniz *et al.*, 2008; Todoli *et al.*, 2008).

Programas de control: La mayoría de los programas de control en los diferentes países endémicos de Leishmaniasis están dirigidos a disminuir el riesgo de infección en humanos al reducir la prevalencia en caninos. Es por esto que las medidas de control se centran en el diagnóstico de casos caninos y eliminación de perros infectados en áreas endémicas, a la par con los rociamientos con piretroides y organofosforados para controlar el vector y reducir el riesgo de transmisión. Usualmente se toma un radio de doscientos metros alrededor del domicilio del caso humano confirmado para el muestreo de humanos y caninos (Zerpa *et al.*, 2003) Sin embargo estas medidas han demostrado no ser del todo efectivas si no van acompañadas por un programa paralelo de educación para la salud en las comunidades afectadas. El conocimiento y manejo de la información veraz por los miembros de la comunidad los hace partícipes en el sistema de vigilancia epidemiológica dirigido a controlar la infección. Por otra parte la salud no se puede considerar aisladamente, depende enormemente de la calidad del ambiente en que se vive.

Un enfoque ecosistémico para la prevención de las enfermedades infecciosas considera impulsores de riesgo en términos de los valores ecológicos, sociales, culturales, políticos y económicos factores subyacentes que afectan la dinámica de la transmisión. Al igual que otros problemas de salud, la ecología y la transmisión de la mayoría de las enfermedades infecciosas se puede vincular a las interacciones entre varios factores, por ejemplo, los cambios demográficos, la pobreza, la urbanización, la deforestación, cambios en los modelos agrícolas de producción, las relaciones entre las personas y los animales cambian, la gestión de los recursos naturales, y las diferencias de género y patrones culturales. (Bazzani y Wiese, 2012)

Por tanto es importante al plantear un programa de control basado en los principios de ecosalud el mismo debe tener visión de transdisciplinariedad, equidad social y de género. Debe estar acompañado no solo del estudio de las condiciones climáticas y atmosféricas de cada región sino de un estudio de la ecología de la zona, y el comportamiento de los vectores, así como las características demográficas y culturales de la población. En éste debe existir una legítima participación comunitaria y estar soportado en indicadores de gestión que viabilicen su ejecución, monitoreo y evaluación de las acciones facilitando de esta manera que los resulta-

dos de cada iniciativa puedan tener un escalamiento en otras áreas endémicas (Sánchez *et al.*, 2013).

Referencias

- Abalos W. (1949). Leishmaniasis Tegumentaria en perros de Tucumán-II. Foco doméstico de leishmaniasis. An Inst Med Reg. (Buenos Aires). (2): 283-292.
- Acha P, Szyfres B. (2003). Zoonosis y Enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. Vol III. Parasitosis. 3ª ed. Organización Panamericana de la Salud. Publicación Científica y Técnica N° 580. EUA.
- Aguilar E., Díaz N.L., Sánchez M.A., Tapia F. J. (2009). Patrón de Citocinas en Hígado y bazo de Perros con Leishmaniasis visceral. Natural. Revista Fac. Cs. Vet UCV, 50: (2) 85-92
- Alvar J, Cañavate C, Molina R, Moreno J., et al. (2004). Canine Leishmaniasis en Baker J, Muller R, and Rollinson D ed, *Advances in Parasitology*, vol 57
- Alvar J, Molina R, San Andrés M, Tesouro M, et al. (1994). Canine leishmaniasis: clinical, parasitological and entomological follow up after chemotherapy. *Ann of Trop Med Parasit*. 88: 371-378.
- Ashford RW. (2000). The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. *Int. J. Parasitol.* 30: 1269 - 128.
- Badaro R, Jones TC, Carvalho EM, Sampaio D, et al (1986). New perspectives on a subclinical form of visceral leishmaniasis. *J. infect. Dis.* 154:1003-1011.
- Baneth G. (2006). Leishmaniasis. En: Greene GE, ed. *Infectious diseases of the dog and cat*. 3ª ed. United State: Saunders-Elsevier
- Baneth G. (2007). Leishmaniasis: a global zoonosis. En: *Proceedings of the World ASAVA*. Australia: Australian Small Animal Veterinary Association.
- Barbiéri CL. (2006). Immunology of canine leishmaniasis. *Parasit. Immunol.* 28:329-337.
- Barret MP, Moltram JC, Coombs GH. (1999). Recent advances in identifying and validating drug targets in Trypanosomes and Leishmanias. *Trends. Microbiol.* 7: 82-88.
- Bazzani R y Wiese M. (2012). Poverty, Ecosystems, and Vector-Borne Diseases en Charron, D.F. ed., *Ecohealth Research in Practice* Edited by International Development Research Centre (IDRC) Ottawa, Canada.
- Bogdan C, Moll H, Solvach W, y Rollinghoff M. (1990). Tumor necrosis factor α in combination with interferon- γ , but not with interleukin-4 activates murine macrophages for elimination of Leishmania major amastigotes. *Eur. J. Immunol.* 20: 1131-1135.
- Botet J, Portús M. (1993). La leishmaniosis en la España peninsular. Revisión histórico-bibliográfica (1912-1985). *Rev. San. Hig. Púb.* 67(4): 255-266.
- Case LP, Carey DP, Hirawaca DA. (1997). Desarrollo y Tratamiento de la Obesidad. En: Álvarez J.

- Editor. Nutrición Canina y Felina. Manual para Profesionales. Madrid: Harcourt Brace.
- CFSPH. (2004). Iowa: Center for Food Security and Public Health. Disponible en: http://www.cfspH.iastate.edu/LESH_H0604. Consultado: 17-03-2013
- Chappuis F, Sundar S, Hailu A, Ghalib H, et al. (2007). Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control. *Rev Nature*. 5:7-16.
- Cortadellas O. (2003). Initial and long-term efficacy of a lipid emulsion of amphotericin B desoxycholate in the management of canine leishmaniasis. *Jrl Vet Int Med*. 17: 808-812.
- Costa H NC, Pereira FH, Araújo VM. (1990). Epidemia de leishmaniose visceral no estado Do Piauí, Brasil 1980-1986. *Rev. Saúde Públ*. 24: 361-372.
- Crampton A, Vanniasinkam T. (2007). Parasites vaccines: the new generation. *Infec Genet. Evol*. 7: 664-673.
- Croft SL, Sundar S, Fairlamb AH. (2006). Drug resistance in leishmaniasis. *Clinic Microbiol Rev*. 19(1):111-126.
- Da Silva, V.O., Borja-Cabrera, G.P., Correia Pontes, N.N., de Souza, et al. (2001). A phase III of efficacy of the FML-vaccine against canine Kala-azar in an endemic area of Brazil (São Gonç, alo do Amaranto RN). *Vaccine* 19, 1082-1092.
- Dantas-Torres F. (2008). Vector-borne diseases in Brazil. *Parasites and Vectors*. 1(25) Disponible en: <http://www.parasitesandvectors.com/content/1/1/25>. Consultado: 17-03-2013.
- David CV, Craft N. (2009). Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Dermatol Ther*. 22:491-502.
- Denerolle P BG. (1999). Combination allopurinol and antimony treatment versus antimony alone and allopurinol alone in the treatment of canine leishmaniasis (96 cases). *Jrl. Vet Intern. Med*. 13:413-415.
- Desjeux P. (1996). Leishmaniasis. Public health aspects and control. *Clin. Dermatol*. 14: 417-423.
- Desjeux P. (2001). The increase risk factors for leishmaniasis worldwide. *Trans. roy. Soc. trop. Med. Hyg*. 95:239-243.
- Desjeux P. (2004). Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. 27(5): 305-318.
- Diniz SA, Silva FL, Alcina V, Neta C, et al. (2008). Animal reservoirs for visceral leishmaniasis in densely populated urban areas. *J Infect Developing Countries*. 2(1):24-33.
- Esch KJ, Petersen CA. (2013). Transmission and epidemiology of zoonotic protozoal diseases of companion animals. *Clin Microbiol Rev*. Jan 26(1):58-85.
- Ezquerro A PJ. (2001). Las Leishmaniasis: de la Biología al Control. 2da. Ed. Madrid Centro Colaborador de la OMS para Leishmaniasis, Servicio de Parasitología, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III.
- Fang FC. (1997). Perspectives series: host/pathogen interactions. Mechanisms of nitric oxide-related antimicrobial activity. *J. Clin. Invest*. 99:2818-2825.
- Feliciangeli MD. (1991). Vector of Leishmaniasis in Venezuela. *Parasitología*. 33 (Supl 1): 229-236.
- Feliciangeli MD, De Lima H, Delgado O, Borges R, et al. (2010). Manual para la prevención y la atención del paciente con leishmaniasis visceral en Venezuela. Universidad de Carabobo. Maracay, Venezuela.
- Fernández Bellón H, Solano-Gallego L, Bardagi M, Alberola J, et al. (2006). Immune response to Leishmania infantum in the healthy horses in Spain. *Vet Parasitol*. 135(2):181-185.
- Festa CN, Guerra CA. (2006). Uso de imiquimod en infantes. *Rev Dermatol Pediatr Lat*. 4(3):232-239.
- Forattini, OP, Santos MR. (1955). Novas Observações em regiões endêmicas de leishmaniose tegumentar americana nos estados de São Paulo e Mato Grosso, Brasil. *Reu. Clin. Sao Paulo*. 31:13-20.
- Gallo P, Vogelsang EG. (1946). Sinopsis nosográfica de las principales enfermedades de los animales domésticos de Venezuela. En: "Primer Congreso Gran Colombiano de Medicina Veterinaria". Caracas.
- Gómez-Ochoa P, Castillo JA, Gascón M, Zarate JJ, et al. (2009). Use of domperidone in the treatment of canine visceral leishmaniasis: a clinical trial. *Vet J*. 179(2):259-63.
- González Barrio N. (1931). Nuevas orientaciones para el descubrimiento del agente transmisor del kala-azar infantil. *Arch Esp Pediat*.1931;15: 266-270.
- Gradoni L. (2002). El Diagnóstico de la Leishmaniasis Canina. Laboratorio de Parasitología, Instituto Superior de Sanidad. Roma, Italia. Disponible en: <http://www.diagnosticoveterinario.com>. Consultado: 05-03-2013.
- Guarga J, Moreno J, Lucientes J, Gracia M, et al. (2002). Evaluation of a specific immunotherapy for the treatment of canine visceral leishmaniasis. *Vet. Immunol. Immunophatol*. 88:13-20.
- Instituto de Biomedicina. Dpto. Informática. (2006). Reporte Anual. MSDS. Caracas.
- Jiménez MI, Gutiérrez-Solar B, Benito A, Aguilar A, et al. (1991). Cutaneous Leishmania (L) infantum zymodemes isolated from bone marrow in AIDS patients. *Res Rev Parasitol*. 51(1-4):95-99.
- Khamesipour A, Rafati S, Davoudi N, Maboudi F, et al. (2006). Leishmaniasis vaccine candidates for development: A global overview. *Indian J Med Res*. 123(3):423-438.
- Killick-Kendrick R, Killick-Kendrick M. (1999). Biology of sand fly vectors of Mediterranean canine leishmaniasis. En: Canine leishmaniasis: an update.

- Proceedings of the International canine forum. Spain: Hoechst Roussel Vet.
- Killick-Kendrick R. (1999). The biology and control of phlebotomine sand flies. *Clin. Dermatol.* 17:279-289.
- Lainson R, Rangel EF. (2005). *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil. A Review. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 100(8):811-827.
- Lainson R, Shaw JJ. (1987). Evolution classification and geographical distribution. In: *The Leishmaniasis in Biology and Medicine*. London: Academic Press.
- Laurrelle-Magalon, Ozon C, Marty P, Pratloug F, et al. (1998). Disseminated feline leishmaniasis due to *Leishmania infantum* in Southern France. *Vet Parasitol* 75:273-277.
- Lira R, Contreras LM, Santa Rita RM, Urbina JA. (2001). Mechanism of action of anti-proliferative lysophospholipid analogues against the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*: potentiation of in vitro activity by the sterol biosynthesis inhibitor ketoconazole. *Jr Antimicrob Chemothe.* 47:537-546.
- López M, Mallorquín P, Pardo R. (2004). Vacunas humanas de nueva generación. España: Genoma España /CIBT-FGUAM.
- Lux H, Heise N, Klenner T, Hart D, et al. (2000). Ether-lipid (alkyl-phospholipid) metabolism and the mechanism of action of etherlipid analogues in *Leishmania*. *Molecular and Biochemical Parasitology.* 111: 1-14.
- Martínez Niochet NA, Pons RS. (1941). *Gac Med Caracas.* 48:329-332.
- Mayrink W, Magalhaes PA, Dias M, Da Costa CA, et al. (1978). Response to Montenegro antigen after immunization with killed *Leishmania promastigotes*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 72:676.
- Mayrink W, Williams P, Coelho MV, Dias M, Martins AV, et al. (1979). Epidemiology of dermal leishmaniasis in the Rio Doce Valley, State of Minas Gerais, Brazil. *Ann Trop Med Parasitol.* 73:123-137.
- Mazza, S. (1926). *Leishmaniasis Tegumentaria y visceral.* BoE Inst Clin Quia (Buenos Aires). 2:209-216.
- McMahon-Pratt D, Alexander J. (2004). Does the *Leishmania major* paradigm of pathogenesis and protection hold for New World cutaneous leishmaniasis or the visceral disease. *Immunol Rev.* 201: 206-224.
- Medina R, Romero J, Goldman C, Espin J. (1960). Comprobación del Primer Perro Infectado en Venezuela. *Gaceta Méd. Caracas.* 441-447.
- Meeusen N, Walker J, Peters A, Pastoret P, et al. (2007). Current Status of Veterinary. *Clinical Microbiol Rev.* 20(3):489-510.
- Mendoza-León A, Shaw JJ, Tapia FJ. (1996). A guide for the Cutaneous Leishmaniasis Connoisseur. En: Tapia FJ, Cáceres Dittmar G and Sánchez MA, editor. *Molecular and immune mechanisms in the pathogenesis of cutaneous leishmaniasis.* Austin: RG Landes Co. p.1-23.
- Miró GC. (2007). *Leishmaniosis canina y felina.* 1ª ed. Madrid: Acalanthis Comunicación y Estrategias. p. 126.
- Mohebbi M, Khamesipour A, Mobedi I, Zarei Z, Hashemi-Fesharki R. (2004). Double-blind randomized efficacy field trial of alum precipitated auto-claved *Leishmania major* vaccine mixed with BCG against canine visceral leishmaniasis in Meshkin-Shahr district, I. R. Iran. *Vaccine.* 22: 4097-4100
- Moreno G, Oviedo M. (1982). *Estudios sobre Leishmaniasis Visceral en el Estado Trujillo (Venezuela).* Trabajo de Ascenso. Mimeografiado Núcleo Universitario "Rafael Rangel" ULA. p. 24.
- Moreno J, Alvar J. (2002). Canine leishmaniasis: epidemiological risk and the experimental model. *Trends Parasitol.* 18: 399-405.
- Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social, MSPAS. (1996). *Manual de lucha contra la Leishmaniosis visceral.* Organización Mundial de la Salud. División de Lucha contra las Enfermedades Tropicales. Ginebra. 27-71.
- Noli C, Auxilia ST. (2005). Treatment of canine Old World visceral leishmaniasis: a systematic review. *Veterinary Dermatology.* 16 (4):213-232.
- Office International des Epizooties. OIE. Iowa (2008). *Leishmaniosis.* Disponible en: http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/2008/pdf/2_01_08_LEISHMANIOSIS.pdf. Consultado: 15-02-2013.
- Oliva G, Scalone A, Manzillo VF, Gramiccia M, et al. (2006). "Incidence and Time Course of *Leishmania infantum* Infections Examined by Parasitological, Serologic, and Nested-PCR Techniques in a Cohort of Naive Dogs Exposed to Three Consecutive Transmission Seasons," *Journal of Clinical Microbiology, Vol. 44.* No.4. 1318-1322.
- Olliaro PL, Guerin PJ, Gerstl S, Haaskjold A, et al. (2005). Treatment options for visceral leishmaniasis: a systematic review of clinical studies done in India, 1980-2004. *Lancet Infect. Dis.* 5: 763-774.
- Organización Panamericana de la Salud, OPS. (2005). *El control de las enfermedades transmisibles.* Washington, D.C: OPS. Publicación científica y técnica N° 613. 402-410.
- Ortega-Moreno ME, Lugo D, Rodríguez V, Belizario D, et al. (2014). Report of the seroprevalence of canine visceral Leishmaniasis in Venezuela. *Revista Fac. Cs. Vet UCV.* 55: (2) en prensa.
- Ortiz RM, Muñoz S, Lechuga D, Del Campo M, et al. (2003). Aspectos epidemiológicos de la leishmaniasis visceral humana y canina en Venezuela. *Pan. Amer. J. Pub. Health.* 13: 1 - 2.
- Orts Ruiz P. (1924). *Leishmaniosis infantil* (Comentarios a nuestra casuística en una comarca de Alicante). *Bol. Soc. Val. Pediat.* 6: 235-242.
- Page SW. (2002). Antiparasitic drugs. In: *Small Animal Clinical Pharmacology,* WB Saunders

Chapter. 9:165.

Palatnik de Sousa CB. (2008). Vaccines for leishmaniasis in the fore coming 25 years. *Vaccines*. 26:1709-1724.

Panaro MA, Lisi S, Mitolo V, Acquafredda A, et al. (1998). Evaluation of killing, superoxide anion and nitric oxide production by *Leishmania infantum*-infected dog monocytes. *Cytobios*. 95:151-160.

Pedroso A.M. (1913). Leishmaniose local do cão. *AnPaul Med Cir*. 1:33-39.

Pennisi MG, De Majo M, Masucci M, Britti D, Vitale F, Del Maso R. (2005). Efficacy of the treatment of dogs with leishmaniasis with a combination of metronidazole and spiramycin. *Veterinary Record*. 156: 346-349.

Pérez JV, Pérez JV, Castanys S, Gamarro F. (2007). Estrategias terapéuticas y bases moleculares de la resistencia a fármacos frente a leishmaniasis. *Biojournal.net* Documento en línea: <http://www.biojournal.net/articulo.asp?id=26>. Consultado 03 marzo 2013.

Pifano, C. F. (1960). Aspectos Epidemiológicos de la leishmaniasis tegumentaria en la región neotropical, con Especial referencia a Venezuela. *Arch. Venez. Med.Trop. Parasitol. Med*. 3(2):32-61.

Pinelli E, Killick_Kendrick R, Wagenaar J, Bernadina W, et al. (1994). Cellular and humoral immune responses in dogs experimentally and naturally infected with *Leishmania infantum*. *Infect. Immun*. 62: 229-235.

Pinelli E, Rutten VP, Bruysters M, Moore PF, et al. (1999). Compensation for decreased expression of B7 molecules on *Leishmania infantum* infected canine macrophages results in restoration of parasite-specific T-cell proliferation and gamma interferon production. *Infect. Immun*. 67:237-243.

Pons, AR. (1968). Leishmaniasis Tegumentaria Americana en el asentamiento campesino de Zipayare. Aspectos epidemiológicos, clínicos e inmunológicos. Su importancia en la reforma agraria. *Kasmera*. 3(1):5- 59.

Portús M, Gállego M, Riera C, Aisa MJ, et al. (2002). Wild and domestic mammals in the life cycle of *Leishmania infantum* in Southwest Europe. A literature review and studies performed in Catalonia (Spain). *Rev. ibér. Parasitol*. 62: 72-76.

Portús M, Lanotte G, Pratlong F. (1982). Observaciones a propósito de un caso de botón de oriente adquirido en las cercanías de Barcelona. 3era Reunión nacional de la Asociación de Parasitólogos Españoles. Madrid.

Quinnell RJ, Courtenay O, Shaw MA, Day MJ, et al. (2001). Tissue cytokine responses in canine visceral leishmaniasis. *J. Infect. Dis*. 183: 1421-1424.

Ramírez MA, Ortega PS, Robledo SR. (2006). Efecto de la interleuquina-1 y el factor de necrosis tumoral alfa en la inducción de la respuesta inmune adquirida durante la infección por *Leishmania (Viannia) panamensis*. *Rev. Médicas UIS*. 2006;

19(4):250-265.

Reis AB, Giunchetti RC, Carrillo E, Martins-Filho OA, Moreno J. (2010). Immunity to *Leishmania* and the rational search for vaccines against canine leishmaniasis. *Trends Parasitol*. Jul;26(7):341-9

Reithinger R, Davies CR. (1999). Is the domestic dog (*canis familiaris*) a reservoir host of American Cutaneous leishmaniasis? A critical review of the current evidence. *Am J Trop Med Hyg*. 61(4):530-541.

Rey L. (1999). *Parasitología*. 3ra ed. Editorial Guanabara Koogan. Rio de Janeiro. Brasil. 215-226.

Rioux J-A, Lanotte G, Serres E, Pratlong F, et al. (1990). Perieres Taxonomy of *Leishmania*. Use of isoenzymes. Suggestions for a new classification. *J. Ann Parasitol Hum Comp*. 65:111-125.

Roberts MT. (2006). Current understandings on the immunology of leishmaniasis and recent developments in prevention and treatment. *British Med Bull*. 76:115-130.

Rose K, Curtis J, Baldwin T, Mathis A, et al. (2004). Cutaneous leishmaniasis in red kangaroos: isolation and characterisation of the causative organisms. *Int. J. Parasitol*. 34, 655-664.

Sabaté D, Llinás J, Homedes J, Sust M, et al. (2004). A single-centre, open-label, controlled, randomized clinical trial to assess the preventive efficacy of a domperidone-based treatment programme against clinical canine leishmaniasis in a high prevalence area. *Prev Vet Med*. 115 (1-2):56-63.

Sánchez MA, Díaz NL, Zerpa O, Negron E, et al. (2004). Organ specific immunity in canine visceral leishmaniasis: analysis of symptomatic and asymptomatic dogs naturally infected with *Leishmania chagasi*. *Am. J. Trop. Med. Hyg*. 70: 618-624.

Sánchez MA y Tapia FJ. (2005). Inmunología de la Leishmaniasis Visceral Canina. *Bol. de Mal. y Sal. Amb*. Vol. XLV, Nº 2, Agosto-Diciembre. 11-18.

Sánchez M.A., Alfonso E., Moreno M., García B., et al. (2013). Impact of the control program on visceral leishmaniasis in Nueva Esparta estate, Venezuela, in Fifth world Congress on Leishmaniasis (Worldleish 5) Pernambuco- Brasil # 91 Abstract book.

Solano-Gallego L, Llull J, Ramos G, Riera C, et al. (2000). The Ibizian hound presents a predominantly cellular immune response against natural *Leishmania* infection. *Vet. Parasitol*. 90: 37-45.

Solano-Gallego L, Fernández-Bellón H, Serra R, Gallegos M, et al. (2003). Cutaneous leishmaniasis in three horses in Spain. *Equine Vet. J*. 2003; 35:320-323.

Soulsby E.J.L. (1987). *Parasitología y Enfermedades Parasitarias en los Animales Domésticos*. Séptima edición, México, Interamericana. 521-551.

Sousa AQ, Pearson R. (2009). Drought, Smallpox, and Emergence of *Leishmania braziliensis* in Northeastern Brazil. *Emerging Infectious Diseases*.

15(6):916-921.

Strauss-Ayali D, Baneth G. (2001) Canine Visceral Leishmaniasis. En: *Recent Advances in Canine Infectious Diseases*. L. Carmichael (Ed.) International Veterinary Information Services, New York, USA. 1-10.

Todoli FS, Rodríguez AC, Alberola JD, Solano-Gallego L. (2008). El reto de una vacuna contra la leishmaniosis canina. *Rev. Argos*, 101(9):36-38.

Torrealba JW. (1970). Observaciones sobre diagnóstico, terapéutica y evaluación de la leishmaniosis visceral humana y canina. Tesis para optar al grado de Doctor. Facultad de Medicina. Universidad Central de Venezuela. Caracas. 38-52.

Torrealba JW; Amaral ADF; Henríquez CE; Kowalenko W, et al. (1961). Observaciones iniciales sobre el perro (*Canis familiaris*) como Reservorio de Kala-azar en Venezuela. *Folia. Clin, et Biol. Sao Paulo*. 1961; 30: 25-36.

Travi BL. (2000). Leishmaniosis visceral canina. *MVZ-Córdoba*. 5(1):29-32.

Urquhart, G M. (2001). *Parasitología Veterinaria*. 2da. Ed. Editorial Acribia, S.A. Zaragoza, España. 250-252.

Verma NK, Dey CS. (2004). Possible mechanism of miltefosine-mediated death of *Leishmania donovani*.

Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 48(8):3010-3015.

Votta RA, Marchese CA, Sousa Martinez F, Lautrec L, et al. (1974). La enfermedad de Chagas en la embarazada y en el recién nacido. 3ª Sesión Científica Soc. Obst. Ginec. Bs. As. 56-68.

Young DG y Duncan MA. (1994). Guide to the identification and geographic distribution of *Lutzomyia* sand flies in Mexico, the West Indies, Central and South America (Diptera: Psychodidae). *Memoirs of the American Entomological Institute* 54: 1-881.

WHO. (2010). Control of the leishmaniasis. Technical report series N° 949. Ginebra. 201.

Zerpa O, Ulrich M, Negrón E, Rodríguez N, et al. (2000). Canine visceral leishmaniasis on Margarita Island (Nueva Esparta, Venezuela). *Trans R Soc. Trop. Med. Hyg.* 94(5):484-487.

Zerpa O, Ulrich M, Convit J. (2003). Programa Control de la Leishmaniasis Visceral en Venezuela. Caracas, Venezuela: Instituto de Biomedicina – MSDS –UCV.

Zulueta AM, Villarreal E, Rodríguez N, Feliciangeli MD, et al. (1999). Epidemiologic aspects of American visceral Leishmaniasis in an endemic focus in Eastern Venezuela. *Am J Trop Med Hyg.* 61(6):945-50.

AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY LICENSE
TERMS AND CONDITIONS

Jun 26, 2014

This is a License Agreement between Martin A Sanchez ("You") and American Society for Microbiology ("American Society for Microbiology") provided by Copyright Clearance Center ("CCC"). The license consists of your order details, the terms and conditions provided by American Society for Microbiology, and the payment terms and conditions.

All payments must be made in full to CCC. For payment instructions, please see information listed at the bottom of this form.

License Number	3416820687936
License date	Jun 26, 2014
Licensed content publisher	American Society for Microbiology
Licensed content publication	Clinical Microbiology Reviews
Licensed content title	Transmission and Epidemiology of Zoonotic Protozoal Diseases of Companion Animals
Licensed content author	Kevin J. Esch, Christine A. Petersen
Licensed content date	Jan 1, 2013
Volume	26
Issue	None
Start page	58
End page	85
Type of Use	Journal
Requestor type	Non-profit
Format	Print
Portion	Figures/tables/images
Number of figures/tables	1

Will you be translating?	Yes
Number of languages	1
Languages	Spanish
Author of this ASM article	No
Order reference number	None
Title of new article	LEISHMANIASIS CANINA EN VENEZUELA: un problema de salud Pública
Publication the new article is in	Talleres
Publisher of new article	Universidad de Los Andes; Venezuela
Author of new article	María Teresa Sánchez R. Martín A. Sánchez.
Expected publication date of new article	Jul 2014
Estimated size of new article (pages)	5
Billing Type	Invoice
Billing address	Instituto de Biomedicina Jacinto Convit Universidad Central de Venezuela Caracas, DC 1010 Venezuela, Bolivarian Republic of
Total	6.25 USD

Terms and Conditions

Publisher Terms and Conditions

The publisher for this copyrighted material is the American Society for Microbiology (ASM). By clicking "accept" in connection with completing this licensing transaction, you agree that the following terms and conditions apply to this transaction (along with the Billing and Payment terms and conditions established by Copyright Clearance Center, Inc. ("CCC"), at the time that you opened your Rightslink account and that are available at any time at <http://myaccount.copyright.com>).

1. ASM hereby grants to you a non-exclusive license to use this material. Licenses are for one-time use only with a maximum distribution equal to the number that you identified in the licensing process; any form of republication must be completed within 1 year from the date hereof (although copies prepared before then may be distributed thereafter). The copyright of all material copied remains with ASM, and permission for reproduction is limited to the formats and products indicated in your license. The text may not be altered in any way without the express permission of the copyright owners.

2. The licenses may be exercised anywhere in the world.

3. You must include the copyright and permission notice in connection with any reproduction of the licensed material, i.e. Journal name, year, volume, page numbers, DOI and reproduced/amended with permission from American Society for Microbiology.

4. The following conditions apply to photocopies:

- The copies must be of high quality and match the standard of the original article.
- The copies must be a true reproduction word for word.
- No proprietary/trade names may be substituted.
- No additional text, tables or figures may be added to the original text.
- The integrity of the article should be preserved, i.e., no advertisements will be printed on the article.
- The above permission does NOT include rights for any online or other electronic reproduction.

5. The following conditions apply to translations:

- The translation must be of high quality and match the standard of the original article.
- The translation must be a true reproduction word for word.
- All drug names must be generic; no proprietary/trade names may be substituted.
- No additional text, tables or figures may be added to the translated text.
- The integrity of the article should be preserved, i.e., no advertisements will be printed on the article.
- The translated version of ASM material must also carry a disclaimer in English and in the language of the translation. The two versions (English and other language) of the disclaimer MUST appear on the inside front cover or at the beginning of the translated material as follows:

The American Society for Microbiology takes no responsibility for the accuracy of the translation from the published English original and is not liable for any errors which may occur. No responsibility is assumed, and responsibility is hereby disclaimed, by the American Society for Microbiology for any injury and/or damage to persons or property as a matter of product liability, negligence or otherwise, or from any use or operation of methods, products, instructions or ideas presented in the Journal. Independent verification of diagnosis and drug dosages should be made. Discussions, views, and recommendations as to medical procedures, choice of drugs and drug dosages are the responsibility of the authors.

g. This license does NOT apply to translations made of manuscripts published ahead of print as "[ASM Journal] Accepts" papers. Translation permission is granted only for the final published