

---

**“ASOCIACIÓN DE LESIONES CUTÁNEAS CON  
*Leishmania mexicana* EN PERROS EN LA CIUDAD  
DE MÉRIDA, YUCATÁN, MÉXICO”**

TESIS

PRESENTADA COMO REQUISITO PARA OBTENER EL  
GRADO DE:

**Maestra en Ciencias Agropecuarias**

POR:

**Médico Veterinario Zootecnista**

**Karen Cecilia Heredia Ojeda**

**Asesores:**

**Dr. Manuel Emilio Bolio González**

**Dr. Roger Iván Rodríguez Vivas**

**M. en C. Carlos Humberto Sauri Arceo**

Mérida, Yuc., México, a Junio de 2015

## **DECLARACIÓN**

“El presente trabajo no ha sido aceptado o empleado para el otorgamiento de título o grado diferente o adicional al actual. La tesis es resultado de las investigaciones del autor, excepto donde se indican las fuentes de información consultadas. El autor otorga su consentimiento a la UADY para la reproducción del documento con el fin del intercambio bibliotecario siempre y cuando se indique la fuente”.

---

**M.V.Z. Karen Cecilia Heredia Ojeda**

## DEDICATORIA

A mi esposo Ever y a mi hijo Bastian por soportar las ausencias, mi mal humor en los momentos más difíciles y por demostrarme el amor y el apoyo que me ayudo a seguir adelante todo el tiempo. Siempre han sido y serán mi motivación para superarme cada día. Los amo!

A mi suegra María Eugenia Silveira por apoyarnos incondicionalmente durante todo este tiempo y por ser una segunda madre para mí

A mi madre Luceli Ojeda y a mi abuelita Celia Ojeda porque ellas fomentaron en mí el amor a los animales y al estudio sin darse cuenta

A la familia Silveira porque siempre han estado ahí para apoyarnos, aconsejarnos y recordarnos que sin importar lo que suceda la familia es lo más importante

## AGRADECIMIENTOS

A Dios por guiarme, por no permitirme olvidar quien soy y de dónde vengo y por todas las lecciones de vida que me han encausado a ser una mejor persona cada día.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por otorgarme una beca para la realización de la Maestría en Ciencias Agropecuarias.

A mis asesores: Dr. Manuel Emilio Bolio González y M. en C. Carlos Humberto Sauri Arceo por el asesoramiento durante el proceso de elaboración de esta tesis. Al Dr. Roger Iván Rodríguez Vivas por su apoyo y paciencia durante la elaboración de esta tesis.

A mis tutores: Dr. Edwin José Gutiérrez Ruiz y Dr. José Alberto Rosado Aguilar porque con sus críticas y aportaciones me guiaron hasta finalizar este documento y porque también me apoyaron. En especial al Dr. Edwin Gutiérrez brindarme su amistad y porque incontables veces cuando me sentí derrotada conté con su apoyo y sus consejos.

Al Dr. Armando Aguilar por su comprensión y ayuda para el proceso final de esta tesis.

Al M.V.Z. Javier Ortiz Palma, encargado del Centro Municipal de Control Animal por permitirme realizar los muestreos y por la gran ayuda que me brindo durante la realización de los mismos. Y también por compartir sus experiencias conmigo y por los consejos brindados. Gracias de corazón!

Al personal del laboratorio de patología: Química Raquel Miranda y M. en C. Leonardo Guillermo porque sin importar la cantidad de trabajo que tuvieron se tomaron el tiempo para enseñarme sus técnicas y realizar las lecturas de mis resultados. Mil gracias!!

Al personal del laboratorio de Inmunología: Química Vanessa, química Pamela May Santos, en especial a la Química Sandra Luz Villegas Pérez, porque a pesar de sus incontables labores se tomó el tiempo para ayudarme con la realización de las pruebas de PCR.

A todo el personal del Centro Municipal de Control Animal que hicieron muy amena mi estancia ahí y porque me enseñaron que contrario a lo que la gente piensa ellos desempeñan una gran labor todos los días y se preocupan por los animalitos que les llegan

A los PMVZ Manuel Vázquez y Marcos Pol por ayudarme con mis muestreos.

A todas las personas que han contribuido de alguna manera en mi formación académica y personal.

## RESUMEN

Se determinó la asociación entre la infección por *Leishmania mexicana* y lesiones cutáneas ulcero costrosas en perros (CUC). El estudio se realizó de Octubre a Noviembre de 2013 en la población de perros del Centro Municipal de control animal de la ciudad de Mérida, Yucatán, México (CEMCA-Mérida). Se estudiaron 46 perros mayores de seis meses de edad distribuidos en dos grupos (n=23): a) Perros con lesiones CUC, y b) Perros sin lesiones cutáneas. Los perros fueron sacrificados humanitariamente. Los animales sacrificados fueron examinados físicamente para detectar lesiones CUC localizadas en orejas y extremidades, a los perros con lesiones CUC se les tomaron biopsias de piel en el lugar de la lesión y a los perros sin lesiones de piel se les tomó en la oreja. La biopsia de cada animal fue dividida en dos viales. Una parte fue usada para extraerle el ADN y realizar la prueba de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para el diagnóstico de la región ITS-1 de *Leishmania mexicana*. La otra parte, fue fijada en formol al 10% para un estudio histopatológico usando la tinción de hematoxilina-eosina, para identificar amastigotes de *Leishmania* en cortes histológicos. Se usó la prueba de Chi<sup>2</sup> para conocer la asociación entre la presencia de lesiones CUC y la presencia de *Leishmania mexicana*. En la prueba de PCR y en los histopatológicos no se detectaron animales positivos a la amplificación del gen ITS-1 de *Leishmania* y amastigotes de parásito, respectivamente. Sin embargo, se encontró que el 60.86% (14/23) de las biopsias de perros con lesiones CUC presentaban bacterias, 26.08% (6/23) ácaros y 13.04% (3/23) hongos. Los ácaros identificados fueron *Demodex canis* y *Sarcoptes scabiei*. Se encontró una asociación positiva entre la presencia de lesiones y la presencia de bacterias y ácaros (P<0.05). Se concluye que los perros estudiados no presentaron infección con el género *Leishmania mexicana*, y la presencia de lesiones CUC están asociadas a bacterias y ácaros.

## PALABRAS CLAVE

*Leishmania mexicana*., bacterias, ácaros, perros, histopatológicos, PCR-ITS1, Yucatán-México

## SUMMARY

The association of ulcer-crusted skin lesions (CUC for its initials in Spanish) and infection with *Leishmania mexicana* in dogs were determined. The study was conducted from October to November 2013 in a population of dogs from the Animal Control Center in the city of Mérida, Yucatán, México (CEMCA-Mérida for its initials in Spanish). 46 dogs over six months of age were distributed into two groups (n=23): a) dogs with CUC lesions and b) dogs with no skin lesions. The dogs were humanely sacrificed. The dogs were physically examined to detect CUC lesions on ears and limbs. Skin biopsies were taken in from CUC lesion zones and the ear of dogs without lesions. The biopsy of each animal was divided into two vials. One part was used to extract DNA and testing for the detection of the ITS-1 region of *Leishmania mexicana* by the Polymerase Chain Reaction (PCR). The other part was fixed in 10% formalin for histopathological examination using hematoxylin-eosin staining to identify amastigotes of *Leishmania spp.*

The X test was used to determine association between the presence of CUC lesions and *Leishmania mexicana*. There were no association between the two variables under any test ( $P > 0.05$ ). . 60.86% (14/23) of the biopsies from dogs with CUC had bacteria, 26.08% (6/23) had mites and 13.04% (3/23) had fungi. *Demodex canis* and *Sarcoptes scabiei* were the mites identified. There were a positive association between the presence of lesions and bacteria or mites ( $P < 0.05$ ). It was concluded that dogs of the trial showed no infection with *Leishmania mexicana* and CUC lesions were associated with bacteria and mites.

## KEYWORDS

*Leishmania mexicana*, Bacteria, mites, dogs, histopathology, PCR-ITS1, Yucatan-Mexico

# ÍNDICE GENERAL

<b><u>I. INTRODUCCIÓN</u></b> .....	1
<b><u>II. MARCO TEÓRICO</u></b> .....	3
<b><u>2.1. Importancia y Epidemiología</u></b> .....	3
<b><u>2.2. Agente etiológico</u></b> .....	5
<b><u>2.3. Morfología</u></b> .....	5
<b><u>2.4. Vector</u></b> .....	6
<b><u>2.5. Ciclo biológico</u></b> .....	7
<b><u>2.6. Sintomatología clínica</u></b> .....	9
<b><u>2.7. Diagnóstico</u></b> .....	10
<b><u>2.7.1 Frotis</u></b> .....	10
<b><u>2.7.2. Cultivo y aislamiento</u></b> .....	11
<b><u>2.7.3. Análisis isoenzimático</u></b> .....	11
<b><u>2.7.4. Métodos Inmunológico</u></b> .....	11
<b><u>2.7.5. Biología Molecular</u></b> .....	11
<b><u>2.7.6. PCR-RFLP</u></b> .....	12
<b><u>2.7.7. Región ITS-1 de <i>Leishmania sp.</i></u></b> .....	13
<b><u>2.9. Prevalencia en México</u></b> .....	13
<b><u>III. OBJETIVO GENERAL</u></b> .....	15
<b><u>IV. OBJETIVOS ESPECÍFICOS</u></b> .....	15
<b><u>V. HIPÓTESIS</u></b> .....	15
<b><u>VI. REFERENCIAS</u></b> .....	16
<b><u>VI. ARTÍCULO DE INVESTIGACIÓN</u></b> .....	20

## INDICE DE FIGURAS

Figura 1a.....	6
Figura 1b.....	6

## I. INTRODUCCIÓN

La Leishmaniasis es una enfermedad parasitaria causada por un protozooario y transmitida por vectores flebótomos del género *Lutzomyia*; en la actualidad este protozooario se encuentra mundialmente distribuido y afecta a diversas especies animales, que van desde roedores silvestres hasta el hombre (Ferreira *et al.*, 2009; Ibarra-Velarde *et al.*, 2009; Longoni *et al.*, 2011; OMS, 2012). Inicialmente esta enfermedad fue asociada a zonas selváticas ya que por un lado la temperatura, humedad y vegetación favorecen el desarrollo del vector transmisor; y por otro lado, la abundancia de animales silvestres como potenciales reservorios que en conjunto con la presencia del vector sustentan la cadena epidemiológica. El hombre y el perro, al introducirse en estos ambientes selváticos por cuestiones ocupacionales, por el crecimiento de la población, por la subsecuente destrucción de ecosistemas naturales y a partir de estos procesos pueden entrar en contacto con el vector, convirtiéndose en hospederos accidentales del parásito (Reithinger y Davies, 1999; Ibarra-Velarde *et al.*, 2009; OMS, 2012). De acuerdo a las especies de *Leishmania* involucradas y a factores dependientes del hospedero (estado inmunológico), la enfermedad puede presentarse de dos formas principales (Alvar *et al.*, 2004): a) cutánea, de forma difusa (*L. amazonensis*), recidivante (*L. tropica*) y mucocutánea (*L. braziliensis*, *L. mexicana*), y b) visceral (*L. donovani*).

En México la manifestación clínica de la Leishmaniasis humana es la forma cutánea, conocida como “Úlcera de los chicleros” y es causada por *L. mexicana* (Ibarra-Velarde *et al.*, 2009; Pérez-Vega *et al.*, 2009; Longoni *et al.*, 2011). En el perro la infección por *L. mexicana* se manifiesta principalmente con lesiones cutáneas ulceradas/costrosas (CUC). Por lo general, estas lesiones se localizan en las orejas, cara y las extremidades de los perros (Morgan, 1999; Pérez-Vega *et al.*, 2009).

En la ciudad de Mérida, Yucatan a pesar de que se ha realizado estudios donde se establecen seroprevalencias de hasta 30% de leishmaniasis por *L. mexicana*, no se han realizado estudios que determinen la asociación entre la presencia de lesiones y la presencia del agente *L. mexicana* (Arjona-Jiménes *et al.*, 2012). Ante esto, surge la siguiente pregunta de investigación: ¿Existe una asociación entre la infección por *L. mexicana* y las lesiones cutáneas ulcero costrosas (CUC) en perros de Mérida, Yucatán?

Planteándose como objetivo determinar si existe o no una asociación entre la infección por *L. mexicana* y la presencia de lesiones CUC en perros de Mérida, Yucatán, México.

## II. MARCO TEÓRICO

### 2.1. Importancia y Epidemiología

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud la Leishmaniasis es una de las siete enfermedades tropicales de mayor importancia a nivel mundial (Rábago *et al.*, 2006; OMS, 2012). La Leishmaniasis comprende un grupo de enfermedades zoonóticas transmitidas por la picadura de un vector flebótomo y causadas por parásitos del género *Leishmania* (Morgan, 1999; Reithinger y Davies, 1999; Ferreira *et al.*, 2009; Arjona-Jiménez *et al.*, 2012).

La Leishmaniasis se encuentra ampliamente distribuida en cuatro continentes a nivel mundial (Longoni *et al.*, 2011; Arjona-Jiménez *et al.*, 2012; OMS, 2012). Dependiendo de las especies de *Leishmania* involucradas y los factores dependientes del hospedero (estado inmunológico), la enfermedad puede presentarse de dos formas principales: a) cutánea, la cual dependiendo de la especie, puede convertirse en difusa (*L. amazonensis*), recidivante (*L. tropica*), o mucocutánea (*L. braziliensis*), y b) visceral (*L. donovani*) (Reithinger y Davies, 1999; Alvar *et al.*, 2004; Ferreira *et al.*, 2009).

Datos recientes de la Organización Mundial de la Salud señalan que en las últimas décadas la Leishmaniasis se ha convertido en un serio problema de salud pública y en un grave obstáculo para el desarrollo socioeconómico en el mundo; se afirma que actualmente afecta a 14 millones de personas, con 2 millones de casos nuevos por año (1.5 millones de casos de Leishmaniasis cutánea y 0.5 millones de Leishmaniasis visceral) y se considera que 350 millones de personas viven bajo riesgo de contraer alguna de las formas de la enfermedad (Longoni *et al.*, 2011; Arjona-Jiménez *et al.*, 2012; OMS, 2012).

La Leishmaniasis es considerada como endémica en 88 países, de los cuales 72 están en vías de desarrollo (Alvar *et al.*, 2004; Massunari *et al.*, 2009; Longoni *et al.*, 2011; Arjona-Jiménez *et al.*, 2012; López-Céspedes *et al.*, 2012; OMS, 2012).

Por otro lado, durante muchos años, se subestimó el impacto de esta enfermedad en la salud pública, sin embargo, durante los últimos 10 años, las regiones endémicas se han extendido y se ha producido un fuerte aumento en el número de casos registrados. Además, un número sustancial de casos no se registran, debido a que la notificación de la enfermedad es obligatoria en sólo 32 de los 88 países afectados (OMS, 2012).

México es uno de los 88 países donde la Leishmaniasis es una enfermedad endémica, se encuentra principalmente en los Estados del sureste (Campeche, Chiapas, Oaxaca, Quintana Roo, Tabasco, Veracruz y Yucatán) (Zárate *et al.*, 2007; Ferreira *et al.*, 2009; Ibarra-Velarde *et al.*, 2009; Velasco-Castrejón *et al.*, 2009; Longoni *et al.*, 2011). Las manifestaciones clínicas más comunes humanas son la Leishmaniasis mucocutánea y la Leishmaniasis cutánea localizada; en los perros la manifestación más común es la cutánea localizada (Rábago *et al.*, 2006; Ibarra-Velarde *et al.*, 2009; Longoni *et al.*, 2011).

La Leishmaniasis cutánea localizada es causada por *Leishmania mexicana* (*L. mexicana*) y debido a las lesiones que ocasiona en los humanos y a que con mayor frecuencia se presentaba en personas que se dedicaban a la extracción de resinas para la fabricación del chicle, ésta enfermedad es conocida en la región sureste de México como “Úlcera de los chicleros”. En humanos la lesión resultante se encuentra bien caracterizada, no así en los perros pues no se han realizado estudios al respecto (Zárate *et al.*, 2007; Pérez-Vega *et al.*, 2009; Longoni *et al.*, 2011).

## 2.2. Agente etiológico

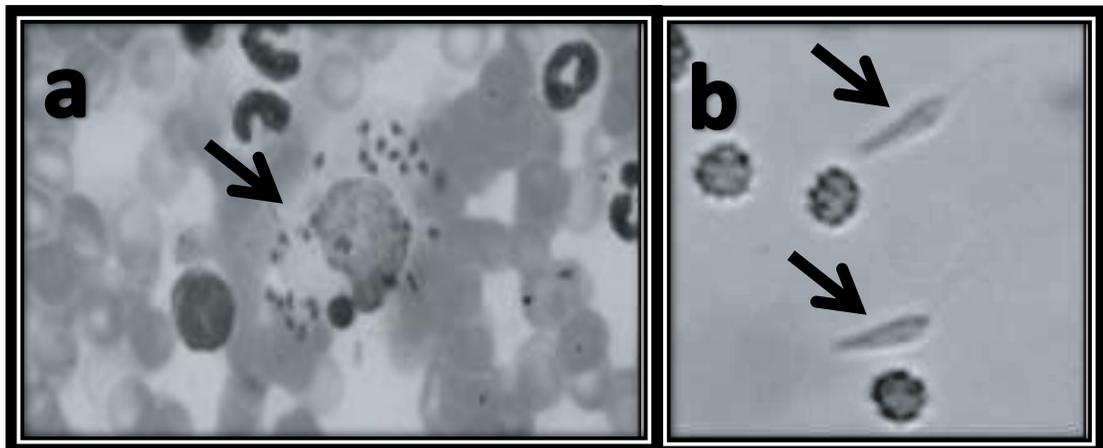
El agente causal de la Leishmiasis es un protozooario intracelular perteneciente al género *Leishmania* de la familia Trypanosomatidae (Acha y Szyfres, 2003). Éstos parásitos han sido clasificados en cuatro grupos o complejos: *L. donovani*, *L. trópica*, *L. mexicana* y *L. braziliensis* (Acha y Szyfres, 2003). En América el complejo *L. mexicana* produce la Leishmaniasis cutánea y comprende las especies *L. mexicana*, *L. amazonensis* y *L. venezuelensis*. Sin embargo, la especie *L. mexicana* es la que predomina en América central y la región Sureste de México (Acha y Szyfres, 2003; Velasco-Castrejón *et al.*, 2009).

## 2.3. Morfología

Este parásito presenta varias formas dependiendo de la etapa del ciclo biológico en la que se encuentre (Cordero, 1999; Acha y Szyfres, 2003). En el hospedero definitivo, se pueden observar las formas intracelulares aflageladas del parásito o amastigotes. Éstos tienen una forma redondeada u oval de 2 a 5  $\mu\text{m}$  de diámetro, con un núcleo central y un orgánulo basofílico o cinetoplasto, son inmóviles y se encuentran dentro de los macrófagos del hospedero (Ver figura 1a) (Cordero, 1999; Acha y Szyfres, 2003). En el tracto digestivo del vector se pueden observar las formas móviles extracelulares flageladas o promastigotes. Éstos poseen un cuerpo elongado, fusiformes, con un solo flagelo que nace de la parte anterior y de casi la misma longitud del cuerpo, un núcleo central y el cinetoplasto se localiza cerca del extremo anterior. Los promastigotes miden de 14 a 20  $\mu\text{m}$  de largo y de 2 a 4  $\mu\text{m}$  de ancho (Ver figura 1b) (Cordero, 1999; Acha y Szyfres, 2003).

Dos formas de promastigotes pueden observarse en el tracto digestivo del vector:

1. Unas más anchas, poco móviles y adheridas a la pared del intestino (Acha y Szyfres, 2003).
2. Otras más delgadas, móviles y que se encuentran libres en el lumen intestinal y la probóscide; las cuales se denominan formas metacíclicas y son infectantes para los vertebrados (Acha y Szyfres, 2003).



**Figura 1:** **a)** Macrófago de perro infectado con amastigotes de *Leishmania* sp. (Flecha) 40 X (Tomado de Zárate *et al.*, 2007); **b)** Promastigotes de *Leishmania* sp. en un medio de cultivo NNN (Novy,McNeal,Nicolle) (flechas) 40 X (Tomado de Zárate *et al.*, 2007)

#### 2.4. Vector

En el continente Americano la Leishmaniasis es transmitida por hembras hematófagas de dípteros flebótomos del género *Lutzomyia* (Quiroz-Romero, 2002; Acha y Szyfres, 2003; Pérez-Vega *et al.*, 2009; Arjona-Jiménez *et al.*, 2012).

En la zona sureste de México las especies *Lutzomyia olmeca olmeca* (*Phlebotomus flaviscutellatus*), *Lu. Shannoni*, *Lu. Crucjata* y *Lu. panamensis* han sido identificadas como vectores *L. mexicana* (Biagi, 2004; Pech-May et al., 2010).

*Lutzomyia olmeca* se alimenta principalmente de ciertas ratas arbóreas, reservorios del parásito, pero además tiene hábitos antropófilos, por lo cual tiene una gran capacidad de transmitir la infección de los reservorios silvestres al humano (Biagi, 2004).

## **2.5. Ciclo biológico**

El ciclo natural de la *Leishmania mexicana* ocurre naturalmente entre pequeños mamíferos reservorios (principalmente roedores) y el vector; en áreas endémicas, ocasionalmente se involucra el perro y el hombre que son sólo un hospedero accidental (Quiroz-Romero, 2002). Cuando una hembra hematófaga de la *Lutzomyia* se alimenta de un hospedero parasitado adquiere los amastigotes que se encuentran dentro de los macrófagos. Una vez en el intestino medio del vector, los amastigotes salen de los macrófagos y se transforman en promastigotes procíclicos que es la forma extracelular que se divide activamente y se encuentra adherida a la pared intestinal. Posteriormente maduran hasta convertirse en promastigotes metacíclicos que es la forma que no se multiplica ni se adhiere a la pared del intestino del vector; estas formas migran hacia la cabeza, la faringe y finalmente a las partes bucales, desde donde son inoculados al nuevo huésped y migran a la probóscide. Este proceso dura entre 4 a 7 días, periodo que coincide con el tiempo aproximado en el cual el insecto necesita volver a alimentarse (Albertos-Alpuche, 1990; Quiroz-Romero, 2002; Acha y Szyfres, 2003).

La transmisión de la Leishmaniasis tiene lugar cuando la mosca hematófaga se alimenta de un hospedero susceptible (humano o animal) y ésta regurgita las formas infectantes. Cuando los promastigotes han sido inoculados en la piel por la picadura del vector, la respuesta inmune inicial es mediada por los macrófagos, células de Langerhans que se encuentran en la piel, las cuales reconocen las moléculas de superficie del parásito como el lipofosfoglicano (LPG) y la glicoproteína 63 (gp63) e inducen la producción de citosinas proinflamatorias y activan el complemento. Cuando los promastigotes de la leishmania son fagocitados el LPG inhibe la maduración del fagosoma, permitiendo al parásito subsistir y reproducirse dentro de la vacuola hasta su diferenciación en amastigote y su posterior multiplicación. Por su parte la GP63 permite que el promastigote resista la lisis mediada por el complemento y favorece su ingreso al macrófago. Algunos promastigotes son destruidos por los polimorfonucleares, pero otros logran transformarse en amastigotes en las células del sistema fagocítico mononuclear; en los fagolisosomas, pierden el flagelo y se transforman en amastigotes, multiplicándose por división binaria. (Acha y Szyfres, 2003; Alvar *et al.*, 2004; Pérez-Vega *et al.*, 2009). Finalmente, las células infectadas se rompen liberando a los amastigotes contenidos (Acha y Szyfres, 2003; Alvar *et al.*, 2004). El periodo de incubación de la enfermedad puede ser de 2 a 12 semanas, pero aun así puede exceder el año (Biagi, 2004). Durante los últimos diez años se ha podido establecer que la transmisión de *L. mexicana* es estacional, la cual se lleva a cabo después de la estación de lluvias, teniendo una duración aproximada de cinco meses (Noviembre a Marzo) (Pech-May *et al.*, 2010)

En cuanto a la respuesta del sistema inmune a la presencia de éstos parásitos; se afirma que en las leishmaniasis la respuesta inmunológica celular que conduce a la curación y/o protección se cumple en base a la estimulación de linfocitos CD4+Th1 que producen interleukina 2 (IL-2) e interferón-gamma (IFN- $\gamma$ ). Estas citoquinas activan macrófagos con producción de óxido nítrico y destrucción de los parásitos fagocitados. Si la respuesta celular se realiza a expensas de los linfocitos CD4+Th2, productores de IL-4 e IL-10, no se induce la activación de los

macrófagos lo cual conduce al agravamiento de las lesiones. Por la función auxiliar de los linfocitos CD4+Th1 en la activación de los linfocitos B, la respuesta humoral puede ser intensa pero poco relevante para la curación (Alvar *et al.*, 2004)

## 2.6. Sintomatología clínica

Los signos clínicos de la Leishmaniasis por *Leishmania mexicana*. en el perro infectado se asocian principalmente, a manifestaciones cutáneas al igual que en el humano y que pueden ir desde alopecia, hiperqueratosis, descamación, úlceras mucocutáneas hasta la formación de nódulos intradérmicos (Morgan, 1999).

En el perro la ulceración de la piel, no es un signo patognomónico, ya que dicha lesión también es ocasionada por otros tipos de *Leishmania* en sus variantes visceral y mucocutánea (Cuba, 2000; López-Céspedes *et al.*, 2012)

Debido a que existe una serie de signos clínicos comunes entre la Leishmaniasis cutánea, mucocutánea y la visceral, el diagnóstico requiere de varios métodos para la confirmación de la especie de *Leishmania* involucrada (López-Céspedes *et al.*, 2012). Ya que se sabe que en la Leishmaniasis por *L. mexicana* los amastigotes se pueden encontrar en las lesiones de piel, uno de los métodos que ha sido utilizado con éxito en el Norte del país en los últimos años es el análisis de biopsias de piel a partir de lesiones ulceradas, utilizando la técnica de PCR (Pérez-Vega *et al.*, 2009; Ochoa-Díaz *et al.*, 2010).

Por otro lado, a pesar de que la infección por *L. mexicana* se caracteriza por la aparición de una úlcera cutánea, al tratarse esta última de una lesión secundaria puede ser originada por distintos agentes que ocasionen prurito intenso, por lo que es difícil asociar la presencia de las úlceras a la presencia de *L. mexicana*. En los perros callejeros este tipo de lesiones son muy comunes. En estudios realizados en Yucatán por Quintal-Parra (2005) se observó que la úlcera es una de las lesiones secundarias más frecuentes en los perros, con una prevalencia del 32.5%. Las lesiones ulceradas también tienden a formar costras debido a la acumulación de

sangre y/o exudado en la superficie cutánea. En el mismo estudio se observó que en los animales con úlceras existía una prevalencia de lesiones costrosas del 55%.

## 2.7. Diagnóstico

Cuando la información epidemiológica y los datos clínicos del paciente están orientados a un diagnóstico presuntivo de Leishmaniasis, se dispone de múltiples métodos para llegar a el diagnóstico definitivo (Rodríguez, 2002).

El diagnóstico definitivo de Leishmaniasis consiste en demostrar la presencia del agente etiológico, mediante la observación del parásito, en frotis de lesiones, estudio histopatológico, cultivos, inoculación en animales de experimentación y PCR (Zerpa *et al.*, 2002)

**2.7.1 Frotis.** Tradicionalmente el diagnóstico de Leishmaniasis se hace por la identificación de los amastigotes en frotis de piel o tejidos. (Rodríguez *et al.*, 1994). Para esto se debe tomar material del borde o de la base de la lesión, por aspiración, raspado o biopsia, hacer una extensión y posteriormente teñirla por la técnica de Giemsa o Wrigth (Rodríguez, 2002; Acha y Szyfres, 2003; Velasco-Castrejón *et al.*, 2009).

Esta confirmación parasitológica directa es importante para diferenciar la Leishmaniasis de otros agentes patógenos como esporotricosis, úlceras crónicas, lepra y sarcoidosis, entre otras (Zerpa *et al.*, 2002). La prueba es rápida y fácil de realizar, pero no es capaz de distinguir entre especies de *Leishmania* ya que morfológicamente existe gran similitud entre éstas (Rodríguez *et al.*, 1994; Kazemi-Rad *et al.*, 2008).

En un estudio realizado por Zerpa *et al.* (2002) se observó que el frotis por escarificado es uno de los métodos más sensibles para el diagnóstico directo.

**2.7.2. Cultivo y aislamiento.** También se puede aislar el parásito por medio de cultivos celulares en un medio NNN (Novy,McNeal,Nicolle) (Rodríguez, 2002). Los promastigotes crecen en este medio y se pueden observar antes de una semana (Acha y Szyfres, 2003).

De igual manera pueden aislarse por inoculación en animales, principalmente ratones blancos o hámsters dorados, inyectando el material obtenido por medio de biopsia en el cojinete plantar, donde posteriormente se desarrollarán las lesiones características (Rodríguez, 2002; Acha y Szyfres, 2003).

**2.7.3. Análisis isoenzimático.** El análisis de isoenzimas es la prueba de oro para la diferenciación entre especies de *Leishmania*, pero se trata de una técnica demandante, laboriosa y que por lo general requiere de previos cultivos in vitro; por lo general, pocos laboratorios tienen la experiencia para llevar a cabo este método de identificación (Schönian *et al.*, 2003).

**2.7.4. Métodos Inmunológico.** Entre éstos se encuentran la dermorreacción de Montenegro, la cual es una prueba cutánea tardía que se lee a las 48 a 72 horas contra suspensiones de promastigotes de cultivo (Acha y Szyfres, 2003). Además de este método, se puede demostrar la presencia de anticuerpos específicos por diversos métodos, como hemaglutinación indirecta, inmunofluorescencia, ELISA y sus variantes (Rodríguez, 2002).

**2.7.5. Biología Molecular.** Además de las técnicas ya mencionadas, en los últimos años se han evaluado distintos métodos de diagnóstico conocidos para la enfermedad y se ha establecido que la técnica de PCR es la que posee mayor sensibilidad cuando se quiere emitir un diagnóstico etiológico preciso (con 98.7%) (Schönian *et al.*, 2003; Bensoussan *et al.*, 2006). Ésta técnica tiene la capacidad de amplificar incluso una sola copia de una secuencia de ADN en millones de copias, estableciendo nuevas posibilidades para estudios tanto clínicos como epidemiológicos de la Leishmaniasis, a partir de diferentes tipos de muestras como sangre, suero, piel, etc. (Rodríguez *et al.*, 1994; Schönian *et al.*, 2003).

La PCR tiene dos objetivos fundamentales: a) la amplificación propiamente dicha, para disponer de cantidad suficiente como para utilizarlo, con distintos fines; b) para detectar en muestras con pequeñas cantidades del ADN una secuencia específica o diana (Karp, 2005; Cannova, 2007).

La técnica PCR directa presenta una alta sensibilidad, sin embargo, con el propósito de mejorarla cada vez más han surgido variantes de la misma, tales como: la Hot-start-PCR, (de comienzo en caliente); L-PCR (PCR larga); PCR anidada; PCR semianidada; PCR múltiple; PCR hibridación; PCR-RAPD, PCR-RFLP (Polimorfismo de Longitud de los Fragmentos de Restricción), PCR en tiempo real; entre otras (Cannova, 2007).

#### **2.7.6. PCR-RFLP**

La variante PCR-RFLP, se basa en el uso de enzimas de restricción luego de la amplificación de una secuencia diana; para posteriormente evaluar el polimorfismo de los fragmentos originados postamplificación (Karp, 2005; Cannova, 2007).

Las enzimas de restricción tienen la función de reconocer secuencias cortas (de 4 a 6 nucleótidos) de ADN duplex (ya que presentan una gran especificidad) y la consiguiente hidrólisis de los enlaces fosfodiéster en las hebras del ADN. Éstas secuencias reconocidas por las enzimas son llamadas sitios de restricción de ADN (Karp, 2005; Cannova, 2007).

El uso de las enzimas de restricción permite disecar el genoma de cualquier organismo, en un conjunto bien definido de fragmentos específicos. La cantidad de bandas (patrones) que puedan aparecer entre las especies e incluso dentro de la misma especie podrían indicar la proximidad o lejanía filogenética entre las cepas en estudio (Cannova, 2007; Karp, 2005).

En México esta técnica ha sido utilizada con éxito en el norte del país (Durango y Sinaloa) como herramienta para el diagnóstico de la Leishmaniasis cutánea causada por *L. mexicana*, utilizando como secuencia diana la región ITS-1 (Pérez-Vega *et al.*, 2009; Ochoa-Díaz *et al.*, 2010).

#### **2.7.7. Región ITS-1 de *Leishmania* sp.**

La región ITS-1 (espaciador ribosomal interno 1) de *Leishmania*, separa los genes que codifican para la subunidad pequeña de rRNA y la región 5.8 rRNA. Al tratarse de una secuencia multicopia, esto eleva la sensibilidad de la prueba (20-40 copias por célula). La región ITS-1 varía en tamaño y secuencia nucleotídica entre las diferentes especies de *Leishmania* existentes, lo cual facilita la diferenciación entre estas. Para obtener mejores resultados para la diferenciación de especies con el PCR-ITS1, en los últimos años se ha implementado el uso de enzimas de restricción; principalmente la enzima *HaeIII*. Entonces, todos los grupos de importancia clínica pueden ser identificados por sus patrones de RFLP (Schönian *et al.*, 2003).

#### **2.8. Prevalencia en México**

En México esta enfermedad ha sido diagnosticada en los Estados de Sinaloa, Michoacán y Oaxaca tanto en humanos como animales mediante la detección del agente utilizando distintas técnicas como improntas de lesiones de piel, cultivos celulares y en algunos casos técnicas moleculares encontrando desde casos aislados hasta prevalencias de 5% (Velasco-Castrejón *et al.*, 2009; Ochoa-Díaz *et al.*, 2010; Longoni *et al.*, 2011).

En Yucatán, la mayoría de éstos estudios realizados en perros se han enfocado en demostrar la presencia de anticuerpos contra diferentes especies de

*Leishmania* como *L. infantum*, *L. braziliensis* y *L. mexicana*. En éstos estudios se han encontrado prevalencias de anticuerpos contra *L. mexicana* de entre 20.63 y 30.2% (Arjona-Jiménez *et al.*, 2012; López-Céspedes *et al.*, 2012).

. Adicionalmente se demostró una prevalencia de anticuerpos contra *L. mexicana* del 25% en los perros provenientes de clínicas privadas de la ciudad y una prevalencia del 35.8% en los perros en el (CEMCA-Mérida). (Arjona-Jiménez *et al.*, 2012).

Además de los estudios serológicos para Leishmaniasis realizados en perros en Yucatan los cuales no reportan la frecuencia de lesiones cutáneas asociadas, no se han realizado aun, estudios que demuestren la presencia del agente y si esto está asociado a la presencia de lesiones en piel como es característico de la Leishmaniasis por *L. mexicana*.

### **III. OBJETIVO GENERAL**

Determinar la asociación entre la infección por *Leishmania mexicana*. y lesiones cutáneas ulcero-costrosas en perros de Mérida, Yucatán, México.

### **IV. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Estimar la prevalencia de infección de *Leishmania mexicana* mediante la amplificación del amplicon ITS-1 en biopsias cutáneas de perros con y sin ulcero-costras en Mérida, Yucatán, México.
2. Determinar la asociación entre *Leishmania mexicana* y la presencia de lesiones ulcero-costrosas

### **V. HIPÓTESIS**

La infección por *Leishmania mexicana* está asociada a lesiones cutáneas ulcero-costrosas en perros de Mérida, Yucatán, México.

## VI. REFERENCIAS

1. Albertos-Alpuche N. E.1990. Vectores de la Leishmaniasis cutánea en México. Revista Biomédica 1(2):92-102
2. Acha, P. N., Szyfres, B. 2003. Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. Vol. III Parasitosis.3ª Edición. Organización Panamericana de la Salud. Washington, D.C.
3. Alvar J., Cañavate C., Molina R., Moreno J., Nieto J. 2004. Canine Leishmaniasis. Advances in Parasitology. 57: 1-88.
4. Arjona-Jiménez G., Villegas N., López-Céspedes A., Marín C., Longoni S.S., Bolio-González M.E., Rodríguez-Vivas R.I., Sauri-Arceo C.H., Sánchez-Moreno M. 2012. Prevalence of antibodies against three species of *Leishmania* (*L. mexicana*, *L. braziliensis*, *L. infantum*) and possible associated factors in dogs from Mérida, Yucatán, Mexico. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. 106: 252-258.
5. Bensoussan E, Nasereddin A, Jonas F, Schnur LF, Jaffe CL. 2006. Comparison of PCR assays for diagnosis of cutaneous leishmaniasis. Journal of Clinical Microbiology.13(4):1435–1439
6. Biagi F. 2004. Enfermedades parasitarias. 3ª edición. Manual moderno. . México, D.F.
7. Cannova D. 2007. Técnicas de caracterización de *Leishmania* spp. y su aporte en la Leishmaniasis. Salus. Universidad de Carabobo 11(1): 67-72
8. Cordero, M. 1999. Parasitología Veterinaria. McGraw-Hill Interamericana
9. Cuba Cuba C. A. 2000. Diagnostico Parasitológico de la Leishmaniasis Tegumentaria Americana. Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública 2000; 17 (1-4): 39-52
10. Fernández G.J., Maidana H.R., Pérez E.V., Maccio O.A., Gorordner J. 2004. Examen parasitologico directo en el estudio de la Leishmaniasis tegumentaria en animales y humanos. Descripción y análisis. Memorias de las Comunicaciones Científicas y Tecnológicas UNNE.

11. Ferreira M.G.P.A., Fattori K.R., Souza F., V.M.F. 2009. Potential role for dog fleas in the cycle of *Leishmania spp.* *Veterinary Parasitology*. 165: 150–154
12. Ibarra-Velarde F., Vera Montenegro Y., Alcalá Canto Y. 2009. *Parasitología Veterinaria: Volumen 1 Protozoarios*. Editorial Acastdel. México D.F. pp. 59-67.
13. Karp G. 2005. *Biología Celular y Molecular. Conceptos y Experimentos*. 4ª Edición. McGrawHill. México D.F. 822-825
14. Kazemi-Rad E., Mohebbali M., Hajjaran H., Rezaei S., Mamishi S. 2008. Diagnosis and Characterization of *Leishmania* species in Giemsa-Stained slides by PCR-RFLP. *Iranian Journal Public Health* 37(1): 54-60
15. Longoni S.S., Marín C. Sauri-Arceo C., López-Céspedes A., Rodríguez-Vivas R.I., Villegas N., Escobedo-Ortegón J., Barrera-Pérez M. A., Bolio-González M. E., Sanchez-Moreno M. 2011. An iron-superoxide dismutase antigen-based serological screening of dogs indicates their potential role in the transmission of cutaneous Leishmaniasis and Trypanosomiasis in Yucatan, Mexico. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*. 11(7): 815-821.
16. López-Céspedes A., Longoni S.S., Sauri-Arceo C., Sánchez-Moreno M., Rodríguez-Vivas R.I., Escobedo-Ortegón F.J., Barrera-Pérez M.A., Bolio-González M.E., Marín C. 2012. *Leishmania spp*: Epidemiology of Canine Leishmaniasis in the Yucatan Peninsula. *The Scientific World Journal*. 2012: 945871
17. Marco J.D., Padilla A.M., Diosque P., Fernández M.M., Malchiodi E.L., Basombrío M.A. 2001. Force of Infection and Evolution of Lesions of Canine Tegumentary Leishmaniasis in Northwestern Argentina. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*, Vol. 96(5): 649-652.
18. Massunari G.K., Voltarelli E.M., Santos D.R., Santos A.R., Poiani L.P., Oliveira O., Violato R. J., Matsuo. R., Teodoro U., Lonardonni M., Silveira T. G. 2009. A serological and molecular investigation of American cutaneous leishmaniasis in dogs, three years after an outbreak in the Northwest of Paraná State, Brazil. *Cadernos de Saúde Pública*. 25(1): 97-104.

19. Morgan V.R. 1999. Clínica de pequeños animales. 3ª Edición. Brace-Saunders España. pp. 1175-1179.
20. Ochoa-Díaz, Y. O., López-Moreno, C. Y. Tejeda-Aguirre, C. R. Rendón-Maldonado J. G., López-Moreno H. S. 2010: presencia de *Leishmania mexicana* en el estado de Sinaloa, Mexico. 7° Encuentro Nacional de Biotecnología del Instituto Politécnico Nacional, Mexico, D. F.
21. Organización Mundial de la Salud. 2012. Leishmaniasis: Magnitude of the problem. (consultado en línea el 12/Noviembre de/2012) disponible en: [http://www.who.int/leishmaniasis/burden/magnitude/burden\\_magnitude/en/index.html](http://www.who.int/leishmaniasis/burden/magnitude/burden_magnitude/en/index.html)
22. Pech-May A., Escobedo - Ortegón F. J., Berzunza - Cruz M., Rebollar -Téllez E. A. 2010. Incrimination of four sandfly species previously unrecognized as vectors of *Leishmania* parasites in Mexico. Medical and Veterinary Entomology 24: 150-161.
23. Pérez-Vega J. H., López-Moreno C. Y., López-Valenzuela J. A., Rendón-Maldonado J. G., López-Moreno H. S. 2009. Leishmaniasis cutánea causada por *Leishmania mexicana* en Durango, México. Informe del primer caso clínico. Gaceta Médica México. 145(5): 433–435
24. Quintal-Parra M.D. 2005. Frecuencia de lesiones macroscópicas cutáneas, primarias y secundarias en 100 perros con lesiones de piel, inspeccionados en el Centro de Acopio Canino y Felino de Mérida, Yucatán (Tesis de licenciatura) Mérida (Yucatán) México. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma de Yucatán.
25. Quiroz Romero H. (2002). Parasitología y enfermedades parasitarias de los animales domésticos. Editorial Limusa. México, D.F
26. Rábago J.A., AszSigall D., López L, Baquera J. 2006. Leishmaniasis cutánea: Reporte de un caso clínico. Medicina Interna de México 22: 343-346.
27. Reithinger R., Davies C.R. 1999. Is the dog (*Canis familiaris*) a reservoir host of American cutaneous Leishmaniasis? A critical review of the current

- evidence. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 61(4): 530-541.
28. Rodríguez N., Guzman B., Rodas A., Takiff H., Bloom B. R., Convit J. 1994. Diagnosis of cutaneous Leishmaniasis and Species discrimination of parasites by PCR hybridization. *Journal of Clinical Microbiology*., 32(9): 2246-2252.
  29. Rodríguez D.J. 2002. Enfermedades transmitidas por vector en México. *Revista de la Facultad de Medicina UNAM*; 43(3): 126-141
  30. Schönian G., Nasereddin A., Dinse N., Schweynoch C., Schallig H., Presber W., Jaffe C. 2003. PCR diagnosis and characterization of *Leishmania* in local and imported clinical samples. *Diagnostic Microbiology Infectious Disease* 47:349-358
  31. Velasco-Castrejón O., Rivas Sánchez B., Munguía Saldaña A., Hobart O. 2009. Leishmaniasis cutánea de perros en México. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología*. 29(3): 135-140.
  32. Zárate Ramos J. J., Rodríguez Tovar L. E., Ávalos Ramírez R., Salinas Meléndez J. A., Iván Flores-Pérez F. 2007. Descripción de un caso clínico de leishmaniosis canina en el norte de México. *Veterinaria México*. 38 (2): 231-240
  33. Zepa O., Borges R., Loyo N., Galindo W., Belisario D., Rodríguez N., Sosa A., Convit J. 2002. Comparación de cinco métodos para el diagnóstico de la Leishmaniasis cutánea. *Dermatología Venezolana*. 40:(4): 106-110.

# VI. ARTÍCULO DE INVESTIGACIÓN

## REVISTA VETERINARY DERMATOLOGY

### **Asociación de *Leishmania mexicana* con lesiones cutáneas ulcerocostrosas en perros de Mérida, Yucatán, México.**

Heredia-Ojeda K.C., Rodríguez-Vivas R.I., Bolio-González M.E.\*, Sauri-Arceo C.H., Villegas-Pérez S. L., Guillermo-Cordero, J.L.

<sup>1</sup>Campus de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Departamento de Salud Animal y Medicina Preventiva, Universidad Autónoma de Yucatán, México. Km 15.5 Carretera Mérida-Xmatkuil, Mérida, Yucatán, México.

\*Autor de correspondencia. Correo: bgonza@uady.mx (Bolio-Gonzalez ME)

## AGRADECIMIENTOS

Se agradece al CONACYT por la beca otorgada a la MVZ. Karen Cecilia Heredia Ojeda, para la realización de sus estudios de Maestría en el Campus de Ciencias Biológicas y Agropecuarias de la UADY. Al Centro Municipal de Control Animal de Mérida y al personal por las facilidades prestadas.

## RESUMEN

### Introducción

La Leishmaniasis canina es una enfermedad zoonótica causada por diversos tipos de protozoarios del género *Leishmania*. El sureste de México es considerado endémico en Leishmaniasis causada por *L. mexicana* (prevalencia= 30%). A pesar de esto, no existen estudios que reporten la asociación entre la presencia del parásito y la presencia de lesiones cutáneas características de la enfermedad.

### Hipótesis/Objetivos

El presente artículo determina la asociación entre la infección por *Leishmania mexicana*. y lesiones cutáneas ulcero-costrosas (CUC) en perros de Mérida.

### Métodos

Se estudiaron dos grupos de perros provenientes del Centro Municipal de Control Animal (CEMCA-Mérida), cada grupo constaba de 23 animales: a) Perros con lesiones CUC, y b) Perros sin lesiones cutáneas. Después de ser eutanasiados, los animales fueron examinados físicamente; a los perros con lesiones CUC se les realizaron biopsias de piel en el lugar de la lesión y a los perros sin lesiones de piel se les tomó una muestra en la oreja. Las muestras fueron evaluadas mediante PCR para la detección de la región ITS-1 de *Leishmania* y mediante un estudio de histopatológico usando la tinción de hematoxilina-eosina, para identificar amastigotes de *Leishmania* Se usó la prueba de Chi<sup>2</sup> para conocer la asociación entre la presencia de lesiones CUC y la presencia de *L. mexicana*.

### Resultados

La prueba de PCR y los histopatológicos fueron negativos a la amplificación del gen ITS-1 de *Leishmania sp.* y amastigotes de parásito, respectivamente. Sin embargo, en los perros con CUC se encontró 60.86% (14/23) de infección por bacterias, 26.08% (6/23) por ácaros y 13.04% (3/23) por hongos. Se encontró una

asociación positiva entre la presencia de lesiones y la presencia de bacterias y ácaros ( $P < 0.05$ ).

## **Conclusión**

Los perros estudiados no presentaron infección con el género *Leishmania*, y las lesiones CUC están asociadas con bacterias y ácaros.

## **INTRODUCCIÓN**

La Organización Mundial de la Salud reporta que la Leishmaniasis es una de las siete enfermedades tropicales de mayor importancia a nivel mundial, ya que cada año se presentan dos millones de casos nuevos<sup>1,2,3</sup>. La Leishmaniasis es endémica en 88 países, de los cuales 72 están en vías de desarrollo<sup>1-5</sup>. En México la Leishmaniasis es una enfermedad endémica que se encuentra principalmente en los Estados del sureste (Campeche, Chiapas, Oaxaca, Veracruz, Quintana Roo, Tabasco y Yucatán)<sup>1,6</sup>.

La Leishmaniasis comprende un grupo de enfermedades zoonóticas producidas por protozoarios del género *Leishmania* que afectan a todos los mamíferos y es transmitida por la picadura de flebótomos del género *Lutzomyia*<sup>1-3,7</sup>. De acuerdo a las especies de *Leishmania* involucradas y a factores dependientes del hospedero (estado inmunológico), la enfermedad puede presentarse de dos formas principales<sup>8</sup>: a) cutánea, de forma difusa (*L. amazonensis*), recidivante (*L. tropica*) y mucocutánea (*L. braziliensis*, *L. mexicana*), y b) visceral (*L. donovani*).

En México la manifestación clínica más común de la Leishmaniasis humana es la forma mucocutánea, la cual es conocida como “Úlcera de los chicleros” y es causada por *L. mexicana*<sup>1,7,9</sup>.

En el perro la infección por *L. mexicana* se manifiesta principalmente con lesiones cutáneas ulceradas/costrosas (CUC). Por lo general, estas lesiones se localizan en las orejas, cara y las extremidades de los perros<sup>9,10</sup>.

El diagnóstico de la Leishmaniasis en humanos y en el perro se basa en estudios serológicos para demostrar la presencia de anticuerpos específicos

mediante diversos métodos tales como la hemaglutinación indirecta, inmunofluorescencia y el ensayo inmunológico ligado a enzimas (ELISA por sus siglas en el Inglés) <sup>11</sup>. Sin embargo, el diagnóstico definitivo se obtiene al observar directamente al agente, siempre en combinación con otras técnicas tales como la inmunología y la biología molecular (amplificación de genes específicos) <sup>12</sup>.

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en Inglés) para detectar la región ITS-1 (espaciador ribosomal interno 1) (PCR- ITS-1), ha demostrado tener alta sensibilidad (98.7%) en el diagnóstico de *Leishmania* spp. <sup>13</sup>, <sup>14</sup>. Esta prueba presenta ventajas ya que puede diagnosticar el parásito en diferentes tipos de muestras biológicas tales como sangre, suero y piel <sup>13</sup>, <sup>15</sup>.

Recientemente, en un estudio realizado por Arjona-Jiménez *et al.* (2012) en Yucatán, México, encontraron que los perros presentan prevalencias de anticuerpos de 30.2 %, 8.2 % y 11.9 % contra *L. mexicana*, *L. braziliensis* y *L. infantum*, respectivamente, poniendo de manifiesto la importancia de esta patología en la población canina y su posible papel como reservorios en la transmisión al humano.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Área de estudio**

El estudio se realizó de Octubre a Noviembre de 2013 en la población de perros del(CEMCA-Mérida). El clima de la región es cálido subhúmedo, con temperatura promedio anual de 26 °C (16-36 °C) y con una humedad relativa promedio anual de 80 % (65-95 %). La región se caracteriza por presentar lluvias en verano con precipitación anual promedio de 1100 mm <sup>16</sup>.

### **Población de estudio**

Se estudiaron 46 perros mayores de seis meses de edad, que fueron divididos en dos grupos de 23 animales cada uno: a) Perros con lesiones CUC, y b) Perros sin lesiones cutáneas (caso control). El tamaño de muestra (n=23) fue calculado de

acuerdo a la metodología de “tamaño de muestra para comparar porcentajes”. Esto se obtuvo tomando en cuenta una diferencia de prevalencias del 25 %<sup>2</sup> entre una población negativa a *Leishmania* (animales sin lesiones) y una población positiva (animales con lesiones), con un nivel de confianza del 95 % y potencia de 80%, usando el programa Win Episcopo.

Como parte del programa de control de perros callejeros que realiza el (CEMCA-Mérida), los perros fueron eutanasiados<sup>17</sup>. Los animales sacrificados fueron examinados físicamente y los perros con lesiones CUC se les tomaron una biopsia de piel en el lugar de la lesión y a los perros sin lesiones de piel se les tomó una biopsia de piel.

Las biopsias de piel se realizaron de acuerdo a la siguiente metodología: se desinfectó el área seleccionada con alcohol al 70 %, con la finalidad de remover cualquier material costroso, tejido necrotizado, pus y otros detritos de las lesiones. Posteriormente, se realizó una biopsia incisional de la zona seleccionada<sup>18, 19</sup>.

La muestra de cada animal fue dividida en dos viales. Una parte de la biopsia fue usada para extraerle el ADN y realizar la prueba de PCR para el diagnóstico de *Leishmania*. La otra parte de la biopsia fue usada para identificar amastigotes de *Leishmania*.

### **Procesamiento de muestras**

**Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).** De cada biopsia de piel se extrajo el ADN mediante el kit comercial DNeasy® Blood & Tissue (Qiagen), siguiendo el protocolo del fabricante para la extracción de ADN a partir de tejidos<sup>9, 20</sup>. Para diagnosticar la presencia de *Leishmania* sp. se usó la prueba de PCR para detectar la región ITS-1 del parásito. Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo en un volumen total de 50µl. Se tomaron 5µl del ADN aislado para utilizarlo como templado. Los iniciadores utilizados fueron: LITSR (5'-

CTGGATCATTTTCCGATG-3') y L5.8S (5'-TGATACCACTTATCGCACTT-3'), que amplifican la región ITS-1 de *Leishmania* sp., con un tamaño esperado de 300-350 pb (pares de bases) <sup>14</sup>.

Para la amplificación de la región ITS-1 se siguió el siguiente protocolo: desnaturalización inicial a 95°C por 5 minutos, seguido por 35 ciclos de 94°C por 30 segundos, 53°C por 30 segundos para el alineamiento y 72°C durante 1 minuto para la extensión. Para visualizar los amplicones se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio y se corrió a 100 voltios durante 45 minutos <sup>9, 14, 20</sup>.

**Prueba histopatológica.** Las muestras destinadas al estudio histológico fueron fijadas en formol al 10% durante un tiempo mínimo de 48 horas. Las muestras fueron incluidas en parafina donde se realizaron cortes de 5 µ de espesor, los cuales fueron teñidos con hematoxilina-eosina. Las muestras fueron montadas en portaobjetos con bálsamo de Canadá, y se observaron al microscopio en busca de amastigotes de *Leishmania* sp. <sup>18</sup>.

### **Análisis de datos**

Para conocer la asociación entre la presencia de lesiones CUC y la presencia de *Leishmania mexicana* se usó la prueba de Chi<sup>2</sup>.

## **RESULTADOS**

No se observaron en la prueba de PCR-ITS-1 bandas diagnósticas de *Leishmania* sp. (300-350 pb). Asimismo, en las muestras para el estudio histopatológico no se observó la presencia de amastigotes de *Leishmania* sp.

Adicionalmente, en el estudio histológico se encontró la presencia de otros agentes biológicos tales como bacterias, ácaros y hongos (Tabla 1). En los perros sin lesiones cutáneas sólo se apreció en un caso la presencia de bacterias (4.34 %),

mientras que en los perros con lesiones CUC el 60.86 %, 26.08 % y 13.04 % presentaron bacterias (Figura 1), ácaros y hongos respectivamente (Figura 2).

Los ácaros identificados en las muestras con lesiones CUC fueron *Demodex canis* (Figura 3) y *Sarcoptes scabiei* (Figura 4).

Debido a que no se encontraron animales positivos a *Leishmania*, se realizaron análisis estadísticos para determinar una asociación entre la presencia de lesiones CUC y la presencia de los otros agentes encontrados en los cortes histológicos de las biopsias de piel. Al realizar la prueba de Chi<sup>2</sup>, se encontró una asociación positiva entre la presencia de lesiones CUC y la presencia de bacterias (P=0.0002) y ácaros (P=0.02).

## DISCUSIÓN

En el presente estudio no se encontró en las muestras de piel de los animales la presencia de *Leishmania mexicana* mediante las técnicas de PCR y cortes histopatológicos teñidos con hematoxilina-eosina. Sin embargo, en una investigación previa realizada en la misma área de estudio se encontraron perros positivos a anticuerpos anti-*L. mexicana*, anti-*L. braziliensis* y anti-*L. infantum* con prevalencias entre 8.2 y 30.2 %, usando las técnicas de ELISA-FeSOD y Western blot como confirmatoria <sup>2</sup>. La ausencia del protozoario en los perros estudiados podría deberse al intenso programa de control de vectores que se realiza en la región en los últimos años mediante el uso de Permetrinas y los programas de descacharización <sup>21</sup>, además de la baja abundancia de Dípteros Flebotómicos del género *Lutzomyia* reportado en la región <sup>22</sup>. En la península de Yucatán, México, las especies de flebotomos incriminados como vectores de la Leishmaniasis son *Lu. olmeca olmeca*, *Lu. cruciata*, *Lu. shannoni* y *Lu. panamensis* encontrándose generalmente en áreas selváticas y con alta humedad <sup>21, 23</sup>. Adicionalmente, el estudio se realizó de Octubre a Noviembre de 2013 coincidiendo con la época de lluvia; sin embargo, Andrade-Narvaez *et al.* (2003) <sup>24</sup> encontró en Yucatán, México que la Leishmaniasis cutánea producida por *L. mexicana* se presenta de forma estacional y la transmisión ocurre

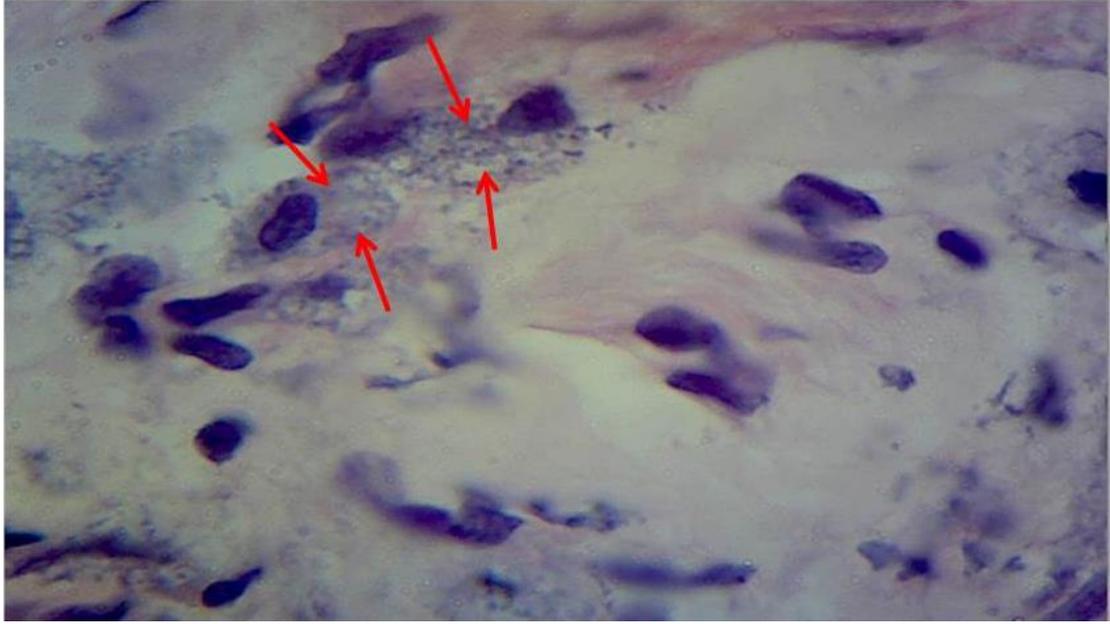
después de la época de lluvia (noviembre a marzo) teniendo una duración de 5 meses aproximadamente. Esta situación podría explicar el hecho de no encontrar perros positivos a *Leshmania mexicana*. En el presente estudio se utilizó un número de muestra muy bajo ( $n=23$ ), el cual fue calculado para detectar una diferencia en la prevalencia entre una población de animales negativos y una de animales positivos; tomando como referencia para la población positiva las prevalencias halladas en estudios anteriores en la misma región; comparado con el utilizado por Arjona-Jiménez (2012)( $n=218$ ) dificultando de esta manera encontrar animales positivos a *L. mexicana*. Por otro lado, la prueba diagnóstica utilizada en dicho estudio cuenta con una especificidad muy baja (44.8%) sobrestimando de esta manera la prevalencia de *L. mexicana* en la población de perros (incremento de falsos positivos); estos hechos refuerzan el punto anterior donde un número de muestra bajo en el presente estudio para detectar diferencias entre poblaciones con una prevalencia baja en la población de perros representó una limitante para detectar animales positivos a *L. mexicana*.

En los estudios histopatológicos de los perros con lesiones CUC se encontraron asociaciones positivas ( $p < 0.05$ ) con bacterias y ácaros. Las infecciones bacterianas de la piel en los perros implican la infección por bacterias oportunistas, en especial *Staphylococcus intermedius*, que normalmente forma parte de la microbiota mucocutánea de los mamíferos <sup>25</sup>. Se han identificado 37 especies y todas forman parte de la microflora de la piel y superficies mucosas del tracto respiratorio del humano y los animales. Estas bacterias pueden causar pioderma y otitis externa. La infección de la piel ocurre secundariamente a una enfermedad sistémica <sup>26</sup>.

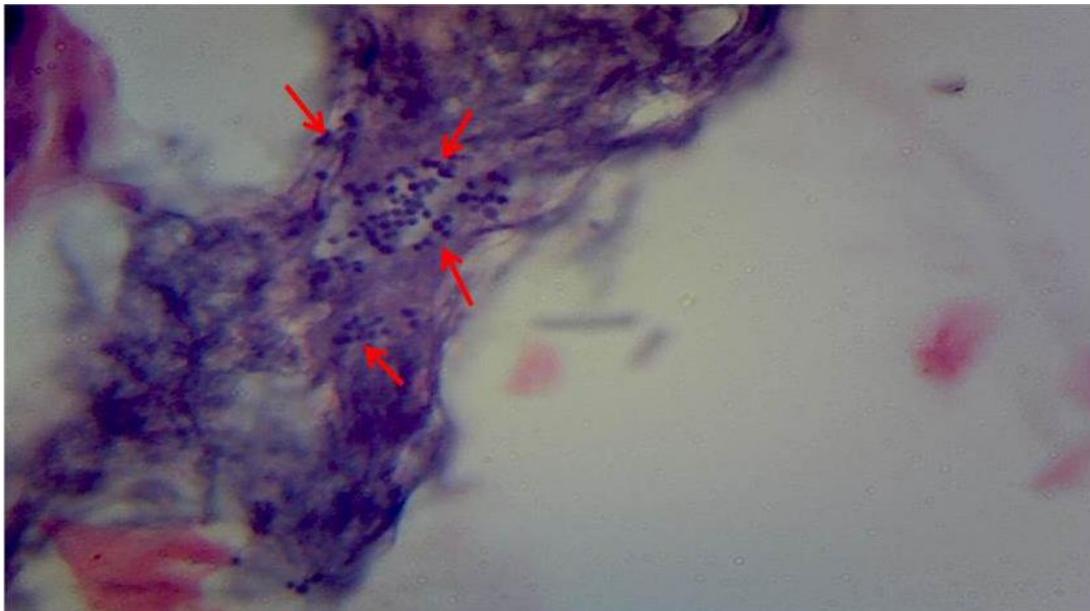
En el presente estudio se encontró una asociación positiva entre la presencia de lesiones CUC de los perros y los ácaros *D. canis* y *S. scabei*. Este hallazgo coincide con lo reportado por Rodríguez-Vivas *et al.* (2003) <sup>27</sup> quienes encontraron que estos ácaros son los más frecuentes en perros callejeros de la ciudad de Mérida. Asimismo, estos mismos autores encontraron que las perros con lesiones dermatológicas tenían 42.8 (Intervalo de confianza al 95 % de 13.6-134.2) veces más

de probabilidad de tener ácaros que los perros sin lesiones dermatológicas. Estos ácaros se localizan en los folículos pilosos de la piel (*D. canis*) y formando túneles principalmente en las glándulas sebáceas (*S. scabei*) de los perros lo que producen una dermatitis con intenso prurito (principalmente por *S. scabei*), escoriaciones y ulceración como consecuencia de autotraumatismos y de manera secundaria suele presentarse infección bacteriana de las heridas.

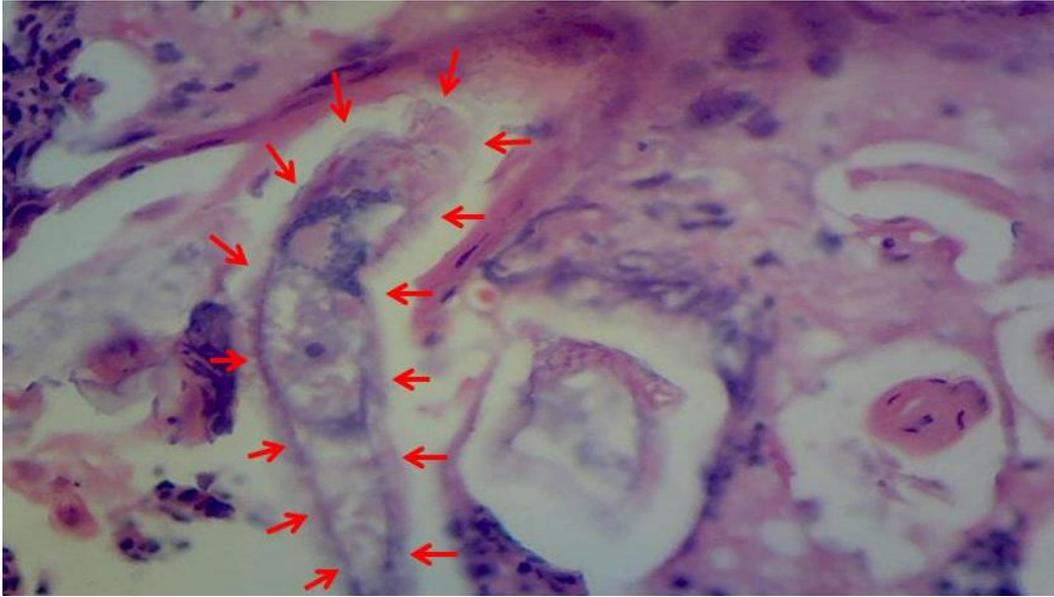
Se concluye que los perros estudiados no presentaron infección con el género *Leishmania*, y los perros que las lesiones CUC en estos perros están asociadas a infecciones por bacterias y ácaros principalmente.



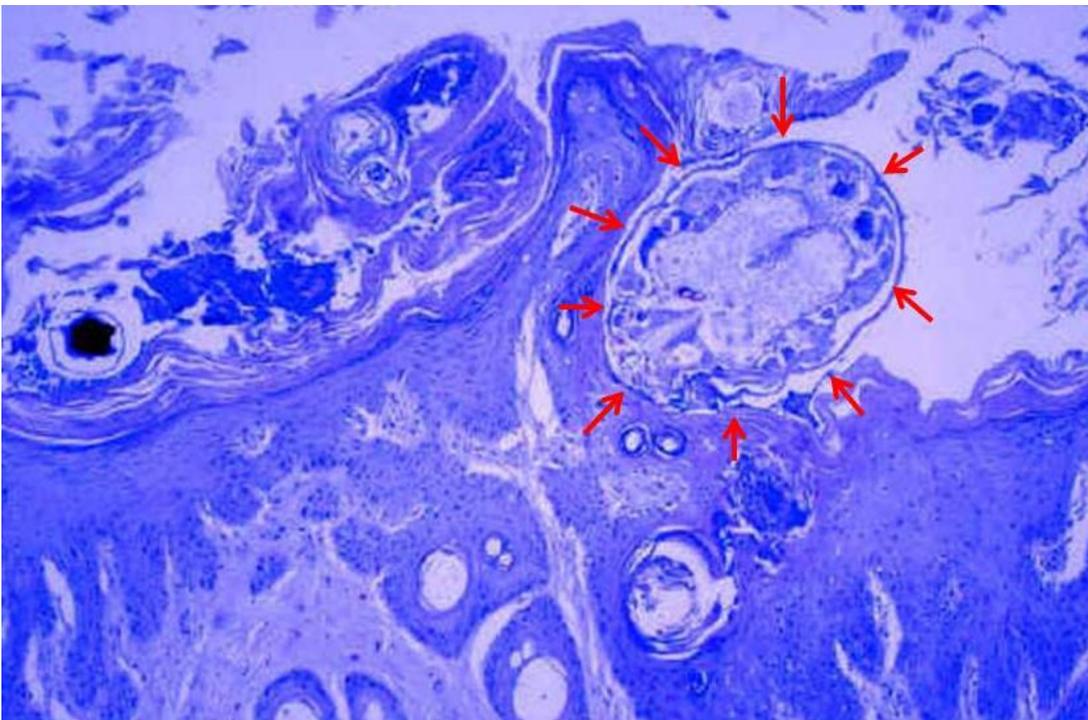
**Figura 1.** Presencia de formas cocoides compatibles con bacterias (señalada con flechas de color rojo) en el citoplasma de macrófagos en un corte histológico de una biopsia de piel de un perro con lesiones cutáneas ulceradas/costrosas. Tinción de hematoxilina-eosina (100 X).



**Figura 2.** Presencia de estructuras ovales o con forma de muñeca rusa compatible con *Malassezia pachidermatis* (señalada con flechas de color rojo) en un corte histológico de una biopsia de piel de un perro con lesiones cutáneas ulceradas/costrosas. Tinción de hematoxilina-eosina (100X).



**Figura 3.** Presencia de *Demodex canis* (señalado con flechas de color rojo) en un corte histológico de una biopsia de piel de un perro con lesiones cutáneas ulceradas/costrosas. Tinción de hematoxilina-eosina (40X).



**Figura 4.** Presencia de *Sarcoptes scabiei* (señalado con flechas de color rojo) en un corte histológico de una biopsia de piel de un perro con lesiones cutáneas ulceradas/costrosas. Tinción de hematoxilina-eosina (40X).

**Tabla 1.** Frecuencia de agentes infecciosos en cortes histológicos de piel en perros sin (No. 23) y con lesiones cutáneas ulceradas/costrosas (No. 23) en perros del Centro de control Canino y Felino de la ciudad de Mérida.

Agentes etiológicos	Perros sin lesiones		Perros con lesiones	
	No. positivos	Prevalencia %	No. Positivos	Prevalencia %
<b>Amastigotes de <i>Leishmania mexicana</i></b>	0	0	0	0
<b>Bacterias</b>	1	4.34	14	60.86
<b>Ácaros</b>	0	0	6	26.08
<i>Demodex canis</i>	0	0	3	13.04
<i>Sarcoptes scabiei</i>	0	0	3	13.04
<b>Hongos</b>	0	0	3	13.04

## REFERENCIAS

1. Longoni, S.S., Marín, C. Sauri-Arceo, C., López-Céspedes, A., Rodríguez-Vivas, R.I., Villegas, N., Escobedo-Ortegón, J., Barrera-Pérez, M.A., Bolio-González, M.E., Sanchez-Moreno, M. 2011. An iron-superoxide dismutase antigen-based serological screening of dogs indicates their potential role in the transmission of cutaneous Leishmaniasis and Trypanosomiasis in Yucatan, Mexico. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 11(7): 815-821.
2. Arjona-Jiménez, G., Villegas, N., López-Céspedes, A., Marín, C., Longoni, S.S., Bolio-González, M.E., Rodríguez-Vivas, R.I., Sauri-Arceo, C.H., Sánchez-Moreno, M. 2012. Prevalence of antibodies against three species of *Leishmania* (*L. mexicana*, *L. braziliensis*, *L. infantum*) and possible associated factors in dogs from Mérida, Yucatán, Mexico. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 106: 252-258.
3. Organización Mundial de la Salud. 2012. Leishmaniasis: Magnitude of the problem. (consultado en línea el 12/Noviembre de/2012) disponible en: [http://www.who.int/leishmaniasis/burden/magnitude/burden\\_magnitude/en/index.html](http://www.who.int/leishmaniasis/burden/magnitude/burden_magnitude/en/index.html)
4. Massunari G.K., Voltarelli E.M., Santos D.R., Santos A.R., Poiani L.P., Oliveira O., Violato R. J., Matsuo. R., Teodoro U., Lonardoní M., Silveira T.G. 2009. A serological and molecular investigation of American cutaneous leishmaniasis in dogs, three years after an outbreak in the Northwest of Paraná State, Brazil. *Cad Saude Publica.* 25(1): 97-104.

5. López-Céspedes, A., Longoni, S.S., Sauri-Arceo, C., Sánchez-Moreno, M., Rodríguez-Vivas, R.I, Escobedo-Ortegón, F.J., Barrera-Pérez, M.A., Bolio-González, M.E., Marín, C. 2012. *Leishmania* spp: Epidemiology of Canine Leishmaniasis in the Yucatan Peninsula. ScientificWorldJournal. doi:10.1100/2012/945871.
6. Velasco-Castrejón O., Rivas Sánchez B., Munguía Saldaña A., Hobart O. 2009. Leishmaniasis cutánea de perros en México. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 29(3): 135-140.
7. Ibarra-Velarde F., Vera Montenegro Y., Alcalá Canto Y. 2009. *Parasitología Veterinaria: Volumen 1 Protozoarios.* Editorial Acastdel. México D.F. pp. 59-67.
8. Alvar J., Cañavate C., Molina R., Moreno J., Nieto J. 2004. Canine Leishmaniasis. *Adv Parasitol.* 57: 1-88.
9. Pérez-Vega, J.H., López-Moreno, C.Y., López-Valenzuela, J.A., Rendón-Maldonado, J.G., López-Moreno, H.S. 2009. Leishmaniasis cutánea causada por *Leishmania mexicana* en Durango, México. Informe del primer caso clínico. *Gac Med Mex.* 145(5): 433-435.
10. Morgan, V.R. 1999. *Clínica de pequeños animales.* 3ª Edición. Brace-Saunders España. pp. 1175-1179.
11. Rodríguez, D.J. 2002. Enfermedades transmitidas por vector en México. *Rev Fac Med Univ Nac Auton Mex.* 43(3): 126-141.

12. Zepa O., Borges R., Loyo N., Galindo W., Belisario D., Rodríguez N., Sosa A., Convit J. 2002. Comparación de cinco métodos para el diagnóstico de la Leishmaniasis cutánea. *Dermatología Venezolana*. 40:(4): 106-110.
13. Schönian G., Nasereddin A., Dinse N., Schweynoch C., Schallig H., Presber W., Jaffe C. 2003. PCR diagnosis and characterization of *Leishmania* in local and imported clinical samples. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 47: 349-358.
14. Bensoussan, E., Nasereddin, A., Jonas, F., Schnur, L.F., Jaffe, C.L. 2006. Comparison of PCR assays for diagnosis of cutaneous leishmaniasis. *J Clin Microbiol* .13(4): 1435-1439.
15. Rodríguez N., Guzmán B., Rodas A., Takiff H., Bloom B.R., Convit J. 1994. Diagnosis of cutaneous Leishmaniasis and Species discrimination of parasites by PCR hybridization. *J Clin Microbiol*. 32(9): 2246-2252.
16. Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática (INEGI). Información por entidad: Yucatán. Consultado noviembre 2012. Disponible en:<http://cuentame.inegi.org.mx/monografias/informacion/yuc/territorio/clima.aspx?tema=me&e=31>
17. NORMA Oficial Mexicana. NOM-033-ZOO-1995. Sacrificio humanitario de los animales domésticos y silvestres.
18. Cuba, C.A. 2000. Diagnostico Parasitológico de la Leishmaniasis Tegumentaria Americana. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*. 17(1-4): 39-52.

19. Patel, A., Forsythe, P., Smith, S. 2010. Dermatología de Pequeños Animales. 1a Edición. Elsevier Saunders. México D.F. p 16-17.
20. Ochoa-Díaz, Y.O., López-Moreno, C.Y. Tejeda-Aguirre, C.R. Rendón-Maldonado J.G., López-Moreno H.S. 2010. Presencia de *Leishmania mexicana* en el estado de Sinaloa, México. 7° Encuentro Nacional de Biotecnología del Instituto Politécnico Nacional, México, D. F.
21. Flores, A.E., Grajales, J.S., Fernandez, S.I., Ponce, G.G., Loaiza, M.H., Lozano, F.S., Brogdon, W.G., Black, W.C., Beaty B.J. 2006. Mechanisms of insecticide resistance in field populations of *Aedes aegypti* (L.) from Quintana Roo, Southern Mexico. J Am Mosq Control Assoc. 22: 672–677.
22. May-Uc, E., Hernández-Arana, H.A., Rebollar-Tellez, E.A. 2011. Distribución de flebotominos (diptera: psychodidae) en Quintana Roo, México. Acta Zool Mex. 27(2): 273-289.
23. Pech-May, A., Escobedo-Ortegon, F.J., Berzunza-Cruz, M., Rebollar-Tellez, E.A. 2010. Incrimination of four sandfly species previously unrecognized as vectors of *Leishmania* parasites in Mexico. Med Vet Entomol. 24(2): 150-161.
24. Andrade-Narvaez, F.J., Canto Lara, S.B., Van Wynsberghe, N.R., Rebollar-Tellez, E.A. et al. 2003. Seasonal transmission of *Leishmania (Leishmania) mexicana* in the state of Campeche, Yucatan Peninsula, Mexico. Mem Inst Oswaldo Cruz. 98: 995–998.

25. Rodríguez-Vivas, R.I., Ojeda-Chi, M.M., Bolio-González, M.E., Gutiérrez-Ruiz, E., Sauri-Arceo, C., Ramírez-Porras, R., Reyes-Novelo E. 2012. Enfermedades de la piel en animales de compañía y su potencial transmisión al ser humano. *Ciencia y Agricultura*. 9(3): 54-68.
26. Rosen, L.B. 2011. Dermatologic manifestations of zoonotic diseases in exotic animals. *J Exot Pet Med*. 20(1): 9-13.
27. Rodríguez-Vivas, RI, Ortega-Pacheco, A, Rosado-Aguilar, JA, Bolio, GME (2003) Factors affecting the prevalence of mange-mite infestations in stray dogs of Yucatán, Mexico. *Vet Parasitol* 115: pp. 61-65