

Descripción de un caso clínico de leishmaniosis canina en el norte de México

Description of a canine leishmaniasis clinical case in the north of Mexico

Juan José Zárate Ramos* Luis Edgar Rodríguez Tovar* Ramiro Ávalos Ramírez**
José Antonio Salinas Meléndez** Fernando Iván Flores-Pérez***

Abstract

Leishmaniasis is an endemic disease in the south of Mexico with great zoonotic potential. Recently, there have been cases reported in the south of USA with zymodemes frequently isolated in endemic zones in Europe. This work describes a case of canine visceral leishmaniasis in a dog that was brought from Spain to Mexico three years ago.

Key words: *LEISHMANIA*, CANINE LEISHMANIASIS, ZYMODEME MON-1, ZOONOSIS, PARASITIC GRANULOMA.

Resumen

La leishmaniosis es una enfermedad endémica en el sur de México con gran potencial zoonótico; hace poco se describieron casos en el sur de Estados Unidos de América con zimodemos frecuentes de zonas endémicas de Europa. El presente trabajo describe un caso de leishmaniosis canina visceral a partir de un animal proveniente de España y con tres años de estancia en México.

Palabras clave: *LEISHMANIA*, LEISHMANIOSIS CANINA, ZIMODEMO M-1, ZOONOSIS, GRANULOMA PARASITARIO.

Recibido el 5 de junio de 2006 y aceptado el 6 de diciembre de 2006.

*Laboratorio de Parasitología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma de Nuevo León, Av. Lázaro Cárdenas 4600, Unidad Universitaria Mederos, 64930, Monterrey, Nuevo León, México.

**Unidad de Investigación Veterinaria en Enfermedades Infecciosas y Genética, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma de Nuevo León. Av. Lázaro Cárdenas 4600, Unidad Universitaria Mederos, 64930, Monterrey, Nuevo León., México, Tel. (81) 83576223, ext. 113.

***Facultad de Ciencias Agropecuarias, Campo Experimental de Desarrollo e Investigación Agropecuaria (CEDIA), Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Av. Universidad 101, Col. Chamilpa, 62210, Cuernavaca, Morelos, México.

Correspondencia y sobretiros: Dr. Juan José Zárate Ramos, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma de Nuevo León, Av. Lázaro Cárdenas 4600, Unidad Universitaria Mederos, 64930, Monterrey, Nuevo León, México, Tel. (81) 83576223, ext. 106, Fax (81)83650968. Correo electrónico: jzarater@posta.unizar.es

Introduction

Leishmaniasis is a parasitic disease that is transmitted by *genus Lutzomyia* and *Phlebotomus* hematophagous insects,^{1,2} and the etiological agent is a *Leishmania* genus protozoan.³

It affects humans as well as animals.⁴ In humans, the disease is characterized by its cosmopolitan distribution: it is endemic in 88 countries,⁵ 66 in Europe and 22 in America.⁶ At least 23 *Leishmania* species can cause the disease.⁷

In Mexico, a cutaneous leishmaniasis known as "gum picker's ulcer" is the form of the disease that is mainly present in the southern part of Mexico. It was originally described in Mexico by Seidelin in 1912,⁸ and the etiological agent is *Leishmania* (L) *mexicana*.⁹

Historically, the disease has been diagnosed in the United States;^{2,10,11} with most of the cases in animals that return from the Mediterranean countries where the disease is enzootic.² Recently, canine leishmaniasis (CL) foci have been detected in certain rural areas of Ohio and Oklahoma;^{2,11,12} although surprisingly, the causal agent was *Leishmania infantum*; and in the most recent outbreak, 1999, the identified zymodeme was MON1^{12,13} that is most commonly found in infected animals and humans of the Mediterranean basin.¹⁴ This suggests that they could have been CL foci of Mediterranean basin origin.

There is an immunopathogenic mechanism in dogs and humans that is very important to the development of the disease.¹⁵ Due to development of immunocomplexes, these are deposited in different organs such as spleen, liver, kidney and systemically in blood vessels, causing the characteristic clinical signs of the disease.¹⁶

The dog is the main reservoir of *L. infantum* in the Middle East and Mediterranean basin, as well as of *L. chagasi* in South America.¹⁷

Likewise, as in humans and some dogs, infection in the short run may not be expressed with clinical signs;¹⁸ nevertheless, the development of clinical signs of the disease is frequent.

One of the few differences in dogs is the presence of superficial cutaneous lesions which are rarely seen in humans.¹⁹ CL incubation period is variable. Intervals between two and 25 months have been reported in experimental CL sub-clinical forms.^{20,21}

Naturally infected animals have prolonged asymptomatic periods.²² In Europe, CL is a serious problem and it is estimated that around 7 million dogs are at risk of becoming sick with CL.²³

CL is disseminated in the countries that have a coastline on the Mediterranean Sea.^{24,25} CL prevalence in Spain oscillates between 1.6% in Galicia to 26% in Balearic Isles;^{26,27} prevalence in the Aragon auto-

Introducción

La leishmaniasis constituye una enfermedad parasitaria transmitida por insectos hematófagos de los géneros *Lutzomyia* y *Phlebotomus*,^{1,2} mientras que el agente etiológico es un protozoario del género *Leishmania*.³

Afecta tanto a humanos como a animales.⁴ En el humano la enfermedad se caracteriza por una distribución cosmopolita; es endémica en 88 países,⁵ 66 en Europa y 22 en América.⁶ Al menos 23 especies de *Leishmania* son causantes de enfermedad.⁷

En México se presenta una forma de la enfermedad, la leishmaniasis cutánea, conocida como "úlcera del chiclero" y se localiza fundamentalmente en el sur de México. Fue descrita en México por Seidelin en 1912,⁸ el agente etiológico es *Leishmania* (L) *mexicana*.⁹

Históricamente la enfermedad se ha diagnosticado en Estados Unidos;^{2,10,11} la mayoría de los casos se presenta en animales que retornan de países mediterráneos donde la enfermedad es enzoótica.² Hace poco se detectaron focos de leishmaniasis canina (LC) en algunas áreas rurales de Ohio y Oklahoma;^{2,11,12} de manera sorprendente el agente causal de éstos fue *Leishmania infantum*, incluso en el brote más reciente, 1999, el zimodemo identificado fue MON1,^{12,13} que es el más comúnmente aislado de animales y humanos infectados en la cuenca mediterránea.¹⁴ Esto último sugiere que pueden ser focos de LC procedente de la cuenca mediterránea.

En la patogenia del perro y del humano existe un mecanismo inmunopatogénico muy importante en el desarrollo de la enfermedad.¹⁵ Debido al desarrollo de inmunocomplejos, éstos se depositan en distintos órganos, como el bazo, hígado, riñón, y de manera sistémica en los vasos sanguíneos, propiciando distintos cuadros clínicos característicos de la enfermedad.¹⁶

El perro es el principal reservorio de *L. infantum* en el Medio Oriente y la cuenca mediterránea, así como de *L. chagasi* en América del Sur.¹⁷

De igual forma, como en el caso de los humanos, la infección puede no causar signos en el corto plazo, que también ocurre en algunos perros;¹⁸ sin embargo, los signos clínicos de la enfermedad se desarrollan con frecuencia.

Una de las pocas diferencias es la presencia de lesiones cutáneas superficiales en perros, que es raramente advertida en humanos.¹⁹ El periodo de incubación en la LC es variable. Se notifican intervalos entre dos y 25 meses en formas subclínicas de LC experimental.^{20,21}

En animales infectados de forma natural presenta periodos asintomáticos prolongados.²² En Europa la LC representa un serio problema y se calcula que alre-

mous community is 7% to 13%.²⁶ This study accepts the dog as the main reservoir of the disease in the south of Europe.^{17,28-32}

There are many diagnostic alternatives for this disease; nevertheless, their sensitivity and specificity, as well as the cost / benefit is quite variable.³³⁻³⁷

Undoubtedly, the most conclusive form of leishmaniasis diagnosis is the detection of the parasite; yet, procedures have a wide range of sensitivity as well as specificity. For example, parasitological diagnosis is generally very specific (100%), but its sensitivity varies from 50% to 60% in lymphatic node aspiration cultures, as well as 60% to 80% in bone marrow aspiration cultures.³⁸

Laboratory animals can be useful in the isolation of the parasite: different studies indicate that the golden hamster (*Mesocricetus auratus*) is very susceptible to *L. donovani* infection;^{39,40} therefore, these rodents could be used to detect the presence of the parasite in a suspect sample.

Clinical case

In the city of Monterrey, Nuevo Leon, a 6 year old male English Bull Terrier, that originally came from Huesca province, of Aragon, Spain and had been living in Mexico for three years, was taken to the veterinary clinic.

The animal had progressive clinical signs of depression, hyporhexis, weight loss, and skin and eyesight problems. During physical examination physiological parameters were within normal ranges with the exception of (39.7°C) hyperthermia, generalized adenopathy, skin alterations: erythema, alopecia, scabs and excoriations on ear-tips. Also, the dog had alterations that reduced eyesight quite noticeably; lameness, and finally excessive nail growth (onychogryphosis). Based on the above, differential diagnoses were established for the following: leishmaniasis, demodicidosis, dermatophytosis, foliaceous pemphigus, ehrlichiosis.

Diagnosis was achieved with the following studies: hematology, blood chemistry, and serology for *Ehrlichia canis*,* anti-*E.canis* antibody detecting kit was used; skin scrapings, lymph node and bone marrow cytology were carried out.

Results of those analyses were: leukocytosis by neutrophils with deviation towards the left, anemia, azotemia and hyperproteinemia, serology results for *E.canis* were negative; skin scrapings were negative for skin mites. Finally, popliteal lymph node as well as bone marrow cytology showed the presence of *Leishmania* spp, 2 × 4.5 µm amastigotes. Once the diagnosis was confirmed, the owners decided to euthanize the animal and this was done by barbiturate overdose. Later on, necropsy was performed.

During necropsy, the most outstanding alterations

dedor de siete millones de perros están en riesgo de padecer la enfermedad.²³

La LC está diseminada en los países que poseen costas hacia el Mar Mediterráneo.^{24,25} La prevalencia de LC en España oscila entre 1.6% en Galicia a 26% en las islas Baleares;^{26,27} en la comunidad autónoma de Aragón la prevalencia es de 7% a 13%.²⁶ En el presente trabajo se acepta al perro como el principal reservorio de esta enfermedad en el sur de Europa.^{17,28-32}

Son muchas las alternativas diagnósticas en esta enfermedad; pero su sensibilidad y especificidad, y su relación costo/beneficio resulta variable.³³⁻³⁷

Sin duda, la forma más contundente de diagnosticar leishmaniosis, es demostrando presencia del parásito; sin embargo, los procedimientos poseen amplios márgenes de sensibilidad como especificidad. Por ejemplo, el diagnóstico parasitológico es específico (100%), pero su sensibilidad varía de 50% a 60% en cultivos de aspirados de ganglios linfáticos, y de 60% a 80% en aspirados de médula ósea.³⁸

El aislamiento en animales de laboratorio constituye una alternativa importante: distintos estudios indican que el hámster dorado (*Mesocricetus auratus*) es muy susceptible a la infección por *L. donovani*,^{39,40} por lo que estos roedores resultan útiles para demostrar presencia del parásito a partir de una muestra sospechosa.

Caso clínico

Se presentó a consulta en la ciudad de Monterrey, Nuevo, León, México, un perro macho de seis años de edad, Bull Terrier Inglés, de la provincia de Huesca, en Aragón, España, con tres años de estancia en México.

El animal presentó un cuadro progresivo de depresión, hiporexia, baja de peso, problemas cutáneos y visuales. Durante el examen físico se apreció que las constantes fisiológicas del animal estaban dentro de los rangos normales, con excepción de hipertermia (39.7°C), adenopatía generalizada, presentaba trastornos de la piel: eritema, alopecias, costras y escoriaciones en la punta de las orejas, región; además presentó depresión, hiporexia, baja de peso, problemas oculares que disminuían mucho su capacidad visual, problemas de cojeras, finalmente se observó crecimiento excesivo de las uñas (onicogriphosis).

Con base en lo anterior se establecieron los siguientes diagnósticos diferenciales: leishmaniosis, demodicosis, dermatofitosis, pénfigo foliáceo, ehrlichiosis.

Para establecer el diagnóstico se realizaron los siguientes exámenes: biometría hemática, química sanguínea, serología contra *Ehrlichia canis*,* se usó un paquete diagnóstico que detecta anticuerpos anti-*E.*

*SNAP 3Dx, paquete diagnóstico, Laboratorios IDEXX, España.

were recorded and samples were taken from organs in order to perform parasitological and histological examinations.

In order to detect parasite presence, smears were taken from spleen, liver, popliteal lymph node and bone marrow, placing a drop of sample from each organ on a slide and extended afterwards, with the aid of another clean slide. It was allowed to air-dry, and then fixed with 95% methanol. These samples were stained with Diff Quick®.^{**41} Also, samples of spleen, liver, popliteal lymph node and bone marrow were placed in tubes with Novy-MacNeal-Nicolle (NNN) medium, identified and placed for incubation at 27° C and examined once a week.^{36,42-44}

Likewise, samples were taken of spleen, liver, popliteal lymph node, bone marrow and skin and placed in 10% formaldehyde PBS, for histopathology studies. Cross sections of the samples were performed to insure proper penetration of the preserving solution. Samples of each organ were included in paraffin by automatic processing. Thin 5 µm sections were placed on slides and stained by hematoxylin-eosin for histopathology analysis.

Also, punctures were made in the costochondral union; the collected material was then diluted in sterile physiological saline solution and inoculated into a pair of specific pathogen free Golden Syrian hamsters (*Mesocricetus auratus*). The animals were periodically examined. When they showed signs of the disease, they were euthanized and liver and spleen impressions were set in 95% methanol; and then stained with Diff Quick®.^{*41}

Dog necropsy results

Skin

Generalized skin lesions were found, most of them exfoliating dermatitis and abrasions, especially in areas of greater friction such as elbows and hocks. Also, alopecia was observed on the snout and eye periphery.

Eyes

Conjunctivitis, blepharitis and uveitis were detected.

Mucosa

Mucosas were pale.

Lymph nodes

Generalized inflammation of all lymph nodes were

canis, también se realizaron raspados cutáneos y citología de ganglios linfáticos y de médula ósea.

Los resultados de dichos análisis fueron: leucocitosis por neutrofilia con desviación a la izquierda, anemia, azotemia e hiperproteïnemia, el resultado de la serología contra *E. canis* resultó negativo; el raspado cutáneo fue negativo a ácaros cutáneos; finalmente, la citología tanto de ganglios linfáticos poplíteos como de médula ósea reveló presencia de amastigotes de *Leishmania* spp, de 2 × 4.5 µm. Luego del diagnóstico, los dueños del animal decidieron que se le practicara eutanasia, que se realizó por sobredosis de barbitúricos, luego se practicó la necropsia.

Durante esta última se registraron las alteraciones más importantes, se tomaron muestras de los órganos para realizar estudios parasitológicos e histopatológicos.

Con el propósito de detectar la presencia del parásito, se realizaron frotis de bazo, hígado, ganglio linfático poplíteo y médula ósea, una gota de la muestra tomada de cada órgano fue depositada por separado sobre un portaobjetos, posteriormente, con la ayuda de otro portaobjetos limpio, se extendió la muestra, y se dejó secar al aire, para luego fijarla con metanol al 95%; estas muestras se tiñeron con Diff Quick®.^{*41} Además se tomaron muestras de bazo, hígado, ganglio linfático poplíteo y médula ósea, que fueron vertidas en el interior de tubos con medio Novy-MacNeal-Nicolle (NNN), se les identificó y colocó en incubación a 27°C y se examinaron una vez por semana.^{36,42-44}

Con la finalidad de realizar los estudios de histopatología, luego de su sacrificio se tomaron muestras del animal de hígado, bazo, ganglio linfático poplíteo y piel, todos los órganos fueron pasados a solución de formaldehído al 10% en PBS, realizándose cortes en dirección al hilio de cada órgano para que la solución conservadora penetrara bien en los tejidos, las muestras de cada órgano se incluyeron en parafina mediante procesamiento automático. Después se realizaron cortes de 5 µm para obtener laminillas que se tiñeron mediante la técnica de hematoxilina-eosina para su ulterior análisis histopatológico.

Además se realizaron punciones de la unión costochondral, el material recolectado se diluyó en 2 mL de solución salina fisiológica estéril y se inoculó en un par de hámsteres Sirio Dorado (*Mesocricetus auratus*) libres de patógenos específicos; los animales fueron examinados periódicamente, cuando presentaron signos de la enfermedad se les sacrificó; se realizaron improntas de hígado y bazo que se fijaron con metanol al 95%; estas muestras se tiñeron con Diff Quick®.^{**41}

*Satin Set, Baxter, Estados Unidos de América.

**Satin Set, Baxter, Estados Unidos de América.

observed, especially of the popliteal, inguinal, sub-maxillary, mesenteric and axillary nodes.

Muscles

Most of the muscle mass was pale and there was atrophy in cranium and masticator muscles.

Joints

Inflammation was seen in elbow, coxae and patella-femoro-tibial articulations.

Kidneys

Both kidneys were slightly fibrous when cut, especially towards the poles.

Liver

Overgrown, congested with rounded borders.

Spleen

Overgrown (30.5 cm in length), congested with rounded borders.

Parasitology results

Leishmania spp 2 x 4.5 µm amastigotes were seen in all smears of spleen, liver, popliteal lymph node and bone marrow (Figure 1). While most of the NNN inoculated tubes were contaminated with bacteria, one tube with bone marrow sample had development of slightly motile *Leishmania* spp promastigotes (Figure 2).

Histopathology results

Hemorrhagic areas were found in encephalon white matter. The most constant lesion in skin was a mixed infiltrate formed by macrophages, lymphocytes, plasmatic cells and the presence of parasites. Heart showed hyaline degeneration and cardiac fiber necrosis. Microscopically, spleen white pulp was atrophied with depletion of the arterial cuffs. Infected plasmatic cells and macrophages infiltrated the white pulp; the same happened with the red pulp with depletion of parasitized macrophages (Figure 3) that were observed in vein lumen. A large amount of plasmatic cells were found in the red pulp. In liver, there were fat changes, Kupffer cells hypertrophy and hyperplasia with parasites within the cells as well as granulomas; the portal tract and sinusoids contained mononuclear cell infiltrates. Finally, necrosis was observed in individual hepatocytes, as well as bile retention. Germinal cen-

Resultados de la necropsia del perro

Piel

Se observaron lesiones cutáneas generalizadas caracterizadas por dermatitis exfoliativa y escoriaciones en piel, en particular en regiones de mayor roce (codos y corvejones), además de que se observaron zonas de alopecia en el tabique nasal y periferia de los ojos.

Ojos

Se detectó conjuntivitis, blefaritis y uveítis.

Mucosas

Se apreció palidez de mucosas.

Ganglios linfáticos

Se observa inflamación generalizada de todos los nódulos linfáticos, en particular los poplíteos, inguinales, submaxilares, mesentéricos y axilares.

Músculos

Palidez en la mayoría de la masa muscular, en particular atrofia de los músculos masticatorios y del cráneo.

Articulaciones

Se apreció inflamación de las articulaciones del codo, coxofemoral y femurotibio rotuliana.

Riñones

Ligeramente fibrosos al corte, en particular hacia los polos de ambos riñones.

Hígado

Aumentado de tamaño, congestionado y con bordes redondeados.

Bazo

Aumentado de tamaño (30.5 cm de largo), congestionado y con bordes redondeados.

Resultados parasitológicos

En todos los frotis realizados a partir de bazo, hígado, ganglio linfático poplíteo y médula ósea se apreciaron amastigotes de *Leishmania* spp, de 2 x 4.5 µm (Figura

ters of lymph nodes were destroyed and follicles were not formed correctly, also depletion of lymphocytes of the paracortex and macrophages with parasites were observed; in medulla there was a strong infiltration of plasmatic cells and abundant hemosiderin contained within macrophages. Bone marrow had hyperplasia involving all its elements. Kidneys showed glomeruli distension and congestion with protein deposits in Bowman's space; presence of hyaline cylinders in convoluted tubules, degeneration and necrosis of tubule epithelium cells. Interstitial pneumonia with mononuclear infiltration of alveoli walls were observed in lungs, with lung hemorrhages, as well as moderate atelectasis and emphysema areas.

1), mientras que la mayoría de los tubos de NNN inoculados se contaminaron con bacterias, pero en un tubo que contenía muestras de médula ósea se logró apreciar el desarrollo de promastigotes de *Leishmania* spp con moderada motilidad (Figura 2).

Resultados del análisis histopatológico

A nivel de encéfalo se observaron áreas hemorrágicas en sustancia blanca. En piel la lesión más constante es un infiltrado mixto formado de macrófagos, linfocitos y células plasmáticas y presencia de parásitos. En corazón hubo degeneración hialina y necrosis de fibras cardíacas. En bazo se observó microscópicamente que la

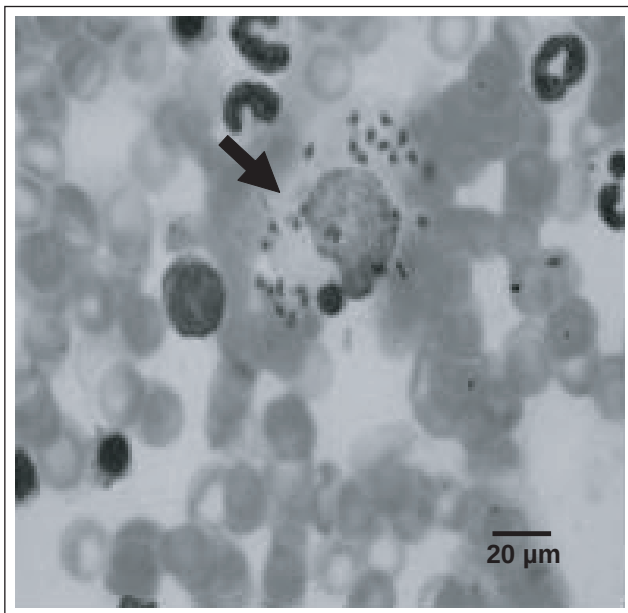


Figura 1: Macrófago de perro infectado con amastigotes de *Leishmania* sp (flecha) 40 X.

Figure 1: Dog macrophage infected with *Leishmania* sp amastigotes (arrow) 40 X.

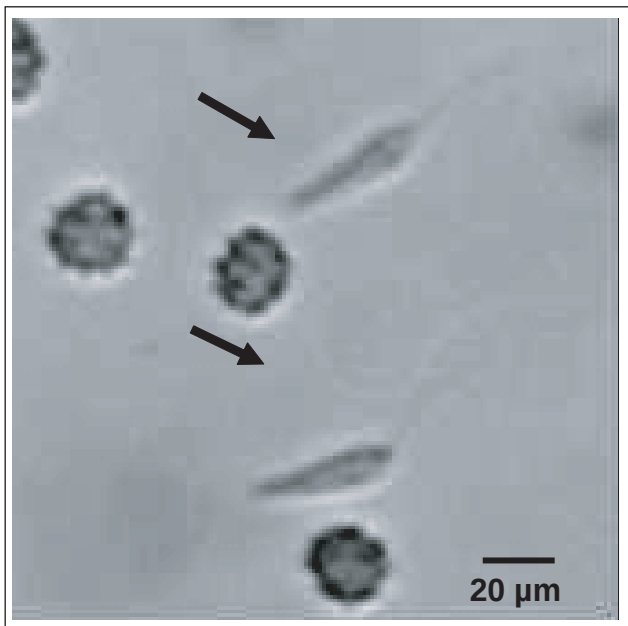


Figura 2: Promastigotes de *Leishmania* spp en medio NNN (flechas) 40 X.

Figure 2: *Leishmania* spp promastigotes in NNN medium (arrows) 40 X.

Isolation in hamster results

After three months, the animals started to show symptoms of the disease. They were euthanized and spleen and liver impressions were made. Microscopic observation revealed abundant presence of *Leishmania* spp amastigotes.

In this case study, it can be deduced that the animal had been previously infected before entering the country, since the place of origin, Aragon, Spain is considered a CL endemic zone;²⁶ likewise, CL incubation period is variable, since in an experimental CL case it was shown to last 25 months;^{20,21} also naturally infected animals have prolonged periods of symptom absence,²² this makes the premature detection of the disease quite difficult.

Even though most of the diagnosed cases in the United States have been dogs that returned from Mediterranean countries where the disease is enzootic,² it is clear that international tourism, migration and the fact that people want to travel with their pets have made the entry of infected animals into non-endemic zones a growing risk.⁴⁵ Leishmaniasis foci have been detected in rural zones of Ohio, Oklahoma and Texas.⁴⁶⁻⁴⁷ During the summer of 1999, a group of hunting dogs of a hunting club in Dutchess Co., New York, United States, presented articular aches, hair loss, skin lesions and kidney failure. Several dogs died. Histopathological studies of joint capsule fluid showed *Leishmania* spp amastigote forms in one of them; 39/93 animals were affected and the parasite was isolated from 15/39 of the animals. Microorganisms were typified as *Leishmania infantum* zymodeme MON1 by the Institute of Public Health in Rome.

In two separate studies, Ciaramella *et al.*¹⁶ and Kou-

pulpa blanca se presentó atrofiada y con depleción de la vaina periarteriolar. Células plasmáticas y macrófagos infectados infiltraron la pulpa blanca, también la pulpa roja se presentó infiltrada y con depleción con macrófagos parasitados (Figura 3), los cuales se observan en el lumen de las venas; por último, se observó gran número de células plasmáticas en la pulpa roja. En el hígado se advierten cambios grasos, además hay hipertrofia e hiperplasia de las células de Kupffer, con presencia de parásitos en dichas células, así como de granulomas; el tracto portal y los sinusoides contienen un infiltrado de células mononucleares. Por último, se observó necrosis individual de hepatocitos, además de retención de bilis. En ganglios linfáticos se apreció que los centros germinales están destruidos y los folículos no se forman correctamente, también se observó depleción de linfocitos en el paracórtex y macrófagos parasitados, en la médula se observó un fuerte infiltrado de células plasmáticas, abundante hemosiderina contenida en macrófagos. En médula ósea se presentó hiperplasia que involucra todos los elementos. En riñón hubo distensión y congestión glomerular con depósitos de material proteínico en el espacio de Bowman. Presencia de cilindros hialinos en túbulos contorneados, degeneración y necrosis de células del epitelio de túbulos. En pulmón se advirtió neumonía intersticial con infiltrado mononuclear en las paredes alveolares y hemorragias pulmonares, también se observaron áreas moderadas de atelectasia y enfisema.

Resultado del aislamiento en hámster

Luego de un periodo de tres meses, los animales presentaron síntomas de la enfermedad, se les sacrificó y se realizaron improntas de bazo e hígado. Su obser-

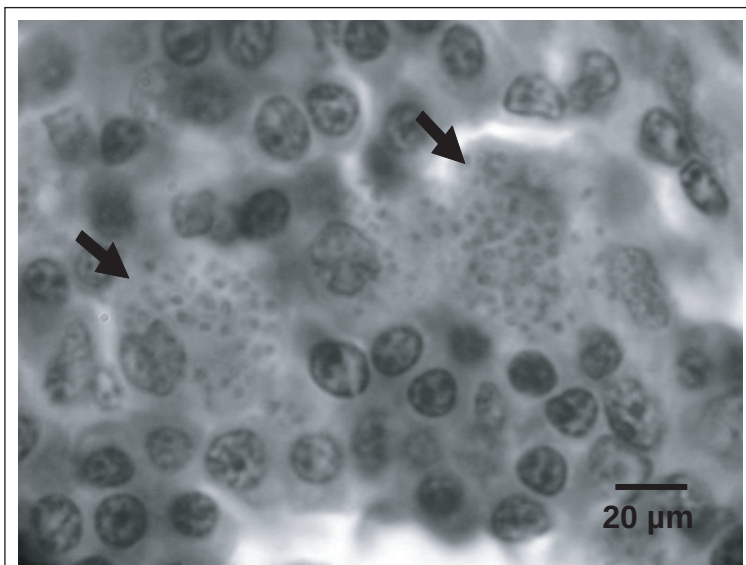


Figura 3: Granulomas por *Leishmania* en bazo de perro (flechas) 40 X.

Figure 3: Granulomas by *Leishmania* in dog spleen (arrows) 40 X.

tinias *et al.*⁴⁸ observed clinical signs associated with the disease in 150 dogs of each group and reported the same symptoms as observed in this study.

A sampling of hunting dogs in other Mexican states revealed more cases. In the year 2000 more than ten thousand serum samples were taken from hunting dogs throughout North America; 1.8% of the animals had positive antibody titers.¹² This gave evidence to the fact that CL is present in the United States of America, especially in the southern states. Even though vector participation is fundamental for the dissemination of the disease there are few studies in relation to vectors of *Leishmania* in the south of the United States of America and the north of Mexico.

Diverse species of *Lutzomyia* have been found in the United States of America and in Mexico.^{2,49} Two species of *Lutzomyia* have shown *Leishmania* transmission capability. Experimentally, hamsters have been infected with *L. diabolica* previously infected with *Leishmania*;¹⁰ also, *Lutzomyia longipalpis* has been shown capable of withstanding the development of *Leishmania* species that are present in Europe.⁵⁰ Likewise, *Leishmania* has been successfully transmitted to puppies using *Rhipicephalus sanguineus* as a vector. Furthermore, it has been suggested that Culicoides mosquitoes may also transmit the disease.² This in turn would make it possible that animals such as the one in this case could at some time be an infection source for other animals and even humans; therefore, it is suggested that for animals that come into the country they should have a *Leishmania* negative test, especially those animals that come from endemic zones, such as the Mediterranean basin.

Acknowledgements

Carlos Alberto Martinez Garza and Saul Martinez G., are thanked for having sent the clinical case.

Referencias

1. Slappendel RJ, Green CE. Infectious Diseases of the Dog and Cat. Philadelphia: WB Saunders Company, 1990.
2. Bravo L, Frank LA, Brenneman KA. Canine Leishmaniasis in the United States. The Compendium 1993; 15: 699-708.
3. Moreno J, Nieto J, Chamizo C, Gonzalez F, Blanco F, Barker DC *et al.* The immune response and PBMC subset in canine visceral leishmaniasis before and after chemotherapy. Vet Immunol Pathol 1999; 71:181-195.
4. Rodriguez N, Aguilar CM, Barrios MA, Barker CD. Detection of *Leishmania braziliensis* in naturally infected individual sandflies by the polymerase chain reaction. Trans R Soc Trop Med Hyg 1999; 93: 47-49.
5. Hu XS, Yang W, Lu H, Yan H, Cheng J, Ma Y *et al.* Sequencing a specific kinetoplast DNA fragment of *Leishmania*

vación microscópica reveló presencia de abundantes amastigotes de *Leishmania* spp.

En este caso se puede deducir que el animal se encontraba previamente infectado antes de su ingreso al país, ya que el sitio de procedencia del animal, Aragón, España, es considerado como zona endémica de LC;²⁶ por otro lado, el periodo de incubación de LC es variable, puede llegar hasta 25 meses en el caso de LC experimental;^{20,21} asimismo, en animales infectados de forma natural se presentan periodos prolongados de ausencia de síntomas,²² ello dificultaría la detección de la enfermedad de forma prematura.

A pesar de que la mayoría de los casos diagnosticados en perros en Estados Unidos son de animales que retornan de países mediterráneos, donde la enfermedad es enzoótica,² está claro que el turismo internacional, la migración y la costumbre creciente de las personas por hacerse acompañar de sus animales, incrementa el riesgo de entrada de animales infectados a zonas no endémicas.⁴⁵ A pesar de esto último, se han logrado detectar focos de leishmaniosis en zonas rurales de Ohio, Oklahoma y Texas.⁴⁶⁻⁴⁷ Durante el verano de 1999, un grupo de perros de caza de un club de caza en Dutchess Co., en Nueva York, Estados Unidos, presentaron dolor articular, pérdida de pelo, lesiones cutáneas y falla renal; varios perros murieron, el examen histopatológico del fluido articular de uno de ellos reveló presencia de formas de amastigote de *Leishmania* spp, además se detectaron 39/93 animales y el parásito fue aislado de 15/39 de los animales, los microorganismos fueron tipificados como *Leishmania infantum* zimodemo MON1 en el Instituto de Salud Pública de Roma.

En dos estudios realizados por separado, Ciaramella *et al.*¹⁶ y Koutinas *et al.*⁴⁸ observaron los signos clínicos asociados con la enfermedad en 150 perros de cada grupo, y notificaron los mismos síntomas que se observaron en este trabajo.

Un muestreo en perros de caza de otros estados, en México, reveló más casos. En 2000 fueron recolectados y examinados más de diez mil sueros de perros de caza a través de Norteamérica; y se detectaron títulos positivos de anticuerpos en 1.8% de los animales.¹² Lo anterior deja de manifiesto que la LC está presente en Estados Unidos de América, particularmente en el sur; a pesar de que es fundamental la participación del vector para que la enfermedad se presente, no obstante existen pocos estudios respecto de los vectores de *Leishmania* en el sur de Estados Unidos y en el norte de México.

Diversas especies de *Lutzomyia* se han encontrado en Estados Unidos y en México,^{2,49} dos especies de *Lutzomyia* han mostrado capacidad para transmitir *Leishmania*; de forma experimental se ha logrado infectar hámsteres con *L. diabolica* previamente infectada con

- donovani* for polymerase chain reaction amplification in diagnosis of leishmaniasis in bone marrow and blood samples. J Parasitol 2000 ; 86: 822-826.
6. Desjeux P. Leishmaniasis. Public health aspects and control. Clin Dermatol 1996; 14:417-423.
 7. Killick-Kendrick R. Phlebotomine vectors of leishmaniasis: a review. Med Vet Entomol 1990; 4: 1-24.
 8. Canto-Lara SB, Van Wynsberghe NR, Vargas-Gonzalez A, Ojeda-Farfan FF, Andrade-Narváez FJ. Use of Monoclonal Antibodies for the identification of *Leishmania* spp. Isolated from humans and wild rodents in the State of Campeche, Mexico. Mem Inst Oswaldo Cruz 1999; 94: 305-309
 9. Van Wynsberghe NR, Canto-Lara SB, Damian-Centeno AG, Itza-Ortiz MF, Andrade-Narvaez FJ. Retention of *Leishmania (Leishmania) mexicana* in Naturally infected Rodents from the State of Campeche, Mexico. Mem Inst Oswaldo Cruz 2000; 95:595-600.
 10. Craig TM, Barton CL, Mercer SH, Droleskey BE, Jones LP. Dermal leishmaniasis in a Texas cat. Am J trop Med Hyg 1986; 37: 49-52.
 11. Sellon RK, Menard MM, Meuten DJ, Lengerich EJ, Steuer FJ, Breitschwerdt EB. Endemic Visceral Leishmaniasis in a Dog from Texas. J Vet Int Med 1993;7: 16-19.
 12. Schantz P, Jackson J, Rooney J, Akey B, Duprey Z, Breitschwerdt E *et al.* Emergence of visceral leishmaniasis in dogs in North America. Canine Leishmaniasis an update. Proceeding of International Canine Leishmaniasis Forum. 1999 mayo 20-24; Creta, Grecia. Creta, Grecia: Hoechst Roussel Vet, 2001:4-16.
 13. Rosypal AC, Troy GC, Zajac AM, Duncan RB, Waki K, Chang KP *et al.* Emergence zoonotic canine leishmaniasis in the United States: Isolation and immunohistochemical detection of *Leishmania infantum* from foxhounds from Virginia. J Eukaryot Microbiol 2003; 50: 691-693.
 14. Dereure J, Pratlong F, Dedet JP. Geographical distribution and the identification of parasites causing canine leishmaniasis in the Mediterranean Basin. Canine Leishmaniasis an update. Proceeding of International Canine Leishmaniasis Forum. 1999 enero 28-31; Barcelona, España. Barcelona, España: Hoechst Roussel Vet, 1999:18-25.
 15. Pinelli E, Victor PM, Rutten G, Ruitenber EJ. Cellular immune responses in canine leishmaniasis. Canine Leishmaniasis an update. Proceeding of International Canine Leishmaniasis Forum. 1999 enero 28-31; Barcelona, España. Barcelona, España: Hoechst Roussel Vet, 1999:60-64.
 16. Ciaramella P, Olivia G, De Luna R, Gradoni L, Ambrosio R, Cortese L *et al.* A retrospective clinical study of canine leishmaniasis in 150 dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. Vet Rec 1997; 141: 539-543.
 17. Campino L, Santos-Gomes G, Riça Capela JM, Cortes S, Abraches P. Infectivity of amastigotes of *Leishmania infantum* in a canine model for leishmaniasis. Vet Parasitol 2000; 92: 269-275.
 18. Ferrer LM. Clinical aspects of canine leishmaniasis: Canine Leishmaniasis an update. Proceeding of Inter-

Leishmania;¹⁰ asimismo, *Lutzomyia longipalpis* ha mostrado soportar el desarrollo de las especies de *Leishmania* presentes en Europa,⁵⁰ incluso se ha logrado transmitir *Leishmania* a cachorros usando como vector a *Rhipicephalus sanguineus*, y se ha planteado la posibilidad de que mosquitos del género *Culicoides* también transmitan la enfermedad.² Lo anterior posibilita que animales como el del presente caso pudieran, en un momento dado, ser fuente de infección para otros animales e incluso para seres humanos; por ello se recomienda, en los análisis de laboratorio, que se exigen para el ingreso de perros al país, se incluya el diagnóstico de *Leishmania*, en especial en animales de zonas endémicas, como la Cuenca Mediterránea.

Agradecimientos

Se agradece a Carlos Alberto Martínez Garza y Saúl Martínez G, la remisión del caso clínico.

-
- national Canine Leishmaniasis Forum. 1999 enero 28-31; Barcelona, España. Barcelona, España: Hoechst Roussel Vet, 1999:6-10.
 19. Hommel M, Jaffe CL, Travi B, Milon G. Experimental models for leishmaniasis and for testing anti-leishmanial vaccines. Ann Trop Med Parasitol 1995; 89: 55-73.
 20. Slappendel RJ. Canine leishmaniasis. A review based on 95 cases in the Netherlands. Vet Q 1988;10: 1-17.
 21. Oliveira GGS, Santoro F, Sadigursky M. The subclinical form of experimental visceral leishmaniasis in dog. Mem Inst Oswaldo Cruz 1993;88: 243-248.
 22. Santos-Gomes G, Campino L, Abranches P. Canine Experimental Infection: Intradermal inoculation of *Leishmania infantum* promastigotes. Mem Inst Oswaldo Cruz 2000;95: 193-198.
 23. Reithinger R, Teodoro U, Davies CR. Topical insecticide treatment to protect dogs from sand fly vectors of leishmaniasis. Emerg Infect Dis 2001;7: 872-876.
 24. Fernandez-Perez FJ, Mendez S, de la Fuente C, Gomez-Muñoz MT, Cuquerella M, Alunda JM. Short Report: Improved diagnosis and Follow-Up of Canine Leishmaniasis using Amastigote-Based Indirect Immunofluorescence. Am J Trop Med Hyg 1999; 61 652-653.
 25. Roura X, Sanchez A, Ferrer L. Diagnosis of canine leishmaniasis by a polymerase chain reaction technique. Vet Rec 1999; 144: 262-264.
 26. Alvar J. Las leishmaniasis: de la biología al control. 2^{da} ed. Salamanca España: Laboratorios Intervet, 2001:17-194.
 27. Matas Mir B, Rovira de Alos J. Estudio epidemiológico de la leishmaniosis canina en la isla de Mallorca. Palma de Mallorca: Gobierno Balear. Cancillería de sanidad y seguridad Social, 1989
 28. WHO. Control of Leishmaniasis. Report of WHO expert committee. Technical report series 793. Geneva: WHO,1990.
 29. Ashford DA, Bozza M, Freire M, Miranda JC, Sherlock

- Italo, Eulalio C *et al.* Comparison of the polymerase chain reaction and serology for the detection of canine visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* 1995; 53: 251-255.
30. Bourdoiseau G, Bonnefont C, Hoareau E, Boehrerger C, Stolle T, Chabanne L. Specific IgG1 and IgG2 antibody and lymphocyte subset levels in naturally *Leishmania infantum*-infected treated and untreated dogs. *Vet Immunol Immunopathol* 1997; 59: 21-30.
 31. Cabral M, O'Grady JE, Gomes S, Sousa JC, Thompson H, Alexander J. The immunology of canine leishmaniasis: strong evidence for a developing disease spectrum from asymptomatic dog. *Vet Parasitol* 1998; 76: 173-180.
 32. Cavaliero T, Arnold P, Mathis A, Glaus T, Hofmann-Lehmann R, Deplazes P. Clinical, serological, and Parasitologic Follow-Up after Long-Term Allopurinol Therapy of Dogs Naturally Infected with *Leishmania infantum*. *J Vet Intern Med* 1999; 13:330-334.
 33. Harith AE, Kolk AHJ, Kager PA, Leeuwenburg J, Faber FJ, Muigai R *et al.* Evaluation of a newly developed direct agglutination test (DAT) for serodiagnosis and ser-epidemiological studies of visceral leishmaniasis: comparison with IFAT and ELISA. *Trans R Soc Med Trop Hyg* 1987; 81: 603-606.
 34. Portús M. Diagnóstico de la leishmaniosis canina. I Jornadas técnicas sobre pequeños animales; 1987 julio 2-6; Madrid, España. Madrid, España:1Universidad Complutense, 1987:10-23.
 35. Dunan S, Toga I. Immunologie et leishmaniose. *Pratique Medicale et Chirurgicale de l'Animal de Compagnie* 1988; 5 Suppl 1:81-87.
 36. Groulade P, Bourdeau P. Moyens pratiques de mise en évidence des leishmanies. *Pratique Médicale et Chirurgicale de l'Animal de Compagnie* 1988 ; 5 Suppl 1: 73-101.
 37. Medrano FJ, Jimenez-Mejias E, Calderon E, Regordan C, Leal M. An easy and quick method for the diagnosis of visceral leishmaniosis in HIV-1 infected individuals. *ADIS* 1993; 7:1399.
 38. Boelaert M, El Safi S, Goetghebeur E, Gomes-Pereira S, Le Ray D, Van der Stuyft P. Latent class analysis permits unbiased estimates of the validity of DAT for the diagnosis of visceral leishmaniasis. *Trop Med Int Health* 1999; 4(5):395-401.
 39. Stauber LA. The origin and significance of the distribution of parasites in visceral leishmaniasis. *Trans New York Acad Sci* 1966; 28:635-643.
 40. Keithly JS. Infectivity of *Leishmania donovani* amastigotes and promastigotes for golden hamster. *J Protozool* 1976; 23:244-245.
 41. Requena JM, Soto M, Doria MD, Alonso A. Immune and clinical parameters associated with *Leishmania infantum* infection in the golden hamster model. *Vet Immunol Immunopathol* 2000;76:269-281
 42. Evans, D. Handbook on Isolation Characterization and Cryopreservation of *Leishmania*. Geneva: *UNDP/World Bank/WHO Special Program for Research and Training in Tropical Diseases (TDR)*, 1989.
 43. WHO. Manual on Visceral Leishmaniasis Control. Geneva: WHO/LEISH/96.40, 1996:51-70.
 44. Zijlstra EE, El-Hassan AM. Leishmaniasis in Sudan: Visceral leishmaniasis. *Trans R Soc Med Hyg* 2001; 95 Suppl 1:27-58.
 45. Slappendel R, Teseke E. A review of canine leishmaniasis presenting outside endemic areas. Canine Leishmaniasis an update. *Proceeding of International Canine Leishmaniasis Forum. 1999 enero 28-31; Barcelona, España. Barcelona, España: Hoechst Roussel Vet, 1999:54-59.*
 46. Anderson DC, Buckner RG, Glenn BL, Mac Vean DW. Endemic canine leishmaniasis. *Vet Pathol* 1980;17: 94-96.
 47. Swenson CL, Silverman J, Stromberg PC, Johnson SE, Wilkie DA, Eaton KA *et al.* Visceral leishmaniasis in an English foxhound from Ohio research colony. *J Am Vet Med Asso* 1988; 9: 1089-1092.
 48. Koutinas AF, Polizopoulou ZS, Saridomichelakis MN, Argyriadis D, Fytianou A, Plevraki KG. Clinical considerations on Canine Visceral Leishmaniasis in Greece: A Retrospective Study of 158 Cases (1989-1996). *J Am Anim Hosp Assoc* 1999;35: 376-383.
 49. Young DG, Lawyer PG. New World vectors of leishmaniasis. In: Harris KF, editor. *Current Topics in Vector Research*. New York: Springer-Verlag, 1987:29-71
 50. Miles MA, Vexenat JA, Furtado-Campos JH, Fonseca de Castro JA. Canine leishmaniosis in Latin America: Control strategies for visceral leishmaniosis. Canine Leishmaniasis an update. *Proceeding of International Canine Leishmaniasis Forum. 1999 enero 28-31; Barcelona, España. Barcelona, España: Hoechst Roussel Vet, 1999:46-53.*