

Frecuencia serológica y molecular de *Leishmania* spp y *Trypanosoma cruzi* y factores asociados en perros con signos sugestivos de infección por tripanosomátidos en Quintana Roo, México

Serological and molecular frequency of *Leishmania* spp and *Trypanosoma cruzi* and associated factors in dogs with signs suggestive of trypanosomatid infection in Quintana Roo, Mexico

Enrique Salazar Grosskelwing¹, Manuel Emilio Bolio González^{1,5},
Roger Iván Rodríguez Vivas¹, Guadalupe Miró Corrales²,
Francisco Javier Escobedo Ortegón³, Hugo Antonio Ruíz Piña³,
Elsy Nalleli Loría Cervera⁴

RESUMEN

Se realizó un estudio transversal con una muestra de 40 perros con signos clínicos sugestivos de infección por *Leishmania* spp y *Trypanosoma cruzi* en el municipio de Lázaro Cárdenas, Quintana Roo, México. Se tomaron muestras de sangre, piel y médula ósea. Se realizaron las pruebas de inmunofluorescencia indirecta (IFI) para detección de anticuerpos anti-*Leishmania infantum* e inmunocromática para detección de anticuerpos anti-*Trypanosoma cruzi* en suero. Además, se realizaron análisis moleculares, mediante PCR para la detección de *Leishmania* spp en médula ósea y piel y *T. cruzi* en médula ósea. Se realizaron análisis histopatológicos de piel y citológicos de médula ósea en busca de lesiones y agentes tripanosomátidos. Se detectaron 3 (7.5%) y 6 (15%) perros con anticuerpos anti-*L. infantum* y *T. cruzi*, respectivamente. En los análisis moleculares se detectaron 17 perros positivos a la infección por *T. cruzi* (42.5%) y ninguno a la infección por *Leishmania* spp. Los perros con baja condición corporal presentaron

¹ Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Campus de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Universidad Autónoma de Yucatán, México

España

³ Laboratorio de Zoonosis y Otras Enfermedades Transmitidas por Vectores, Centro de Investigaciones Regionales «Hideyo Noguchi», Universidad Autónoma de Yucatán, México

⁴ Laboratorio de Inmunología, Centro de Investigaciones Regionales «Hideyo Noguchi», Universidad Autónoma de Yucatán, México

⁵ E-mail: bgonza@correo.uady.mx

Recibido: 31 de enero de 2020

Aceptado para publicación: 29 de agosto de 2020

Publicado: 25 de noviembre de 2020

mayor seropositividad a *T. cruzi* mediante la prueba exacta de Fisher ($p < 0.05$). Los parásitos del género *Leishmania* no participaron activamente en los procesos patológicos de los animales estudiados; sin embargo, se observa una alta frecuencia de animales infectados por *T. cruzi*.

Palabras clave: inmunofluorescencia indirecta, *Leishmania* spp, PCR, perros, tripanosomátidos, *Trypanosoma cruzi*

ABSTRACT

A cross-sectional study was conducted with a sample of 40 dogs with clinical signs suggestive of infection by *Leishmania* spp and *Trypanosoma cruzi* in the municipality of Lázaro Cárdenas, Quintana Roo, Mexico. Blood, skin and bone marrow samples were taken. Indirect immunofluorescence (IFI) tests for detection of anti-*Leishmania infantum* and immunochromatographic test for the detection of anti-*Trypanosoma cruzi* antibodies in serum were performed. In addition, molecular analyses were performed using PCR to detect *Leishmania* spp in bone marrow and skin and *T. cruzi* in bone marrow. Histopathological analyses of the skin and cytology of the bone marrow were carried out in search of lesions and trypanosomatid agents. The results showed that 3 (7.5%) and 6 (15%) dogs with anti-*L. infantum* and *T. cruzi* antibodies were detected, respectively. Molecular analyses detected 17 dogs positive for infection by *T. cruzi* (42.5%) and none for infection by *Leishmania* spp. Dogs with low body condition showed greater seropositivity to *T. cruzi* using Fisher's exact test ($p < 0.05$). Parasites of the genus *Leishmania* did not actively participate in the pathological processes of the animals; however, a high frequency of animals infected with *T. cruzi* was observed.

Key words: dogs, indirect immunofluorescence, *Leishmania* spp, PCR, trypanosomatids, *Trypanosoma cruzi*

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades provocadas por protozoos de la familia Trypanosomatidae como la leishmaniosis y la tripanosomiasis se encuentran clasificadas por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como enfermedades desatendidas debido a que afectan a las comunidades humanas más pobres y marginadas (Alvar *et al.*, 2006; Eloy y Lucheis, 2009; Álvarez-Hernández *et al.*, 2018).

La leishmaniosis es una enfermedad distribuida casi globalmente y es causada por tripanosomátidos de la subfamilia Leishmaniinae. Se estima que unas 50 mil personas

mueren anualmente por leishmaniosis, siendo la segunda enfermedad parasitaria que más muertes humanas provoca (Oryan y Akbari, 2016). Existen alrededor de 23 especies de *Leishmania*, la mayoría de tipo zoonótica. Los vectores de estos parásitos son dípteros de la subfamilia Phlebotominae, conocidos como flebotominos. La mayoría de las especies en Europa, Asia y África pertenecen al género *Phlebotomus*, mientras que en América son del género *Lutzomyia* (Sosa Ávila *et al.*, 2014).

En el continente americano, los países de la cuenca amazónica presentan las prevalencias más altas de leishmaniosis, siendo Brasil el más afectado (Pace, 2014). En

México, los estados con mayor prevalencia son Campeche, Chiapas, Nayarit, Quintana Roo, Tabasco, Veracruz, Yucatán y Oaxaca, cuyos casos corresponden a infecciones por *L. mexicana*, *L. braziliensis* y *L. amazonensis* (Sosa Ávila *et al.*, 2014; Monroy-Ostria y Sanchez-Tejeda, 2017). Se han reportado casos de leishmaniosis visceral por *L. infantum* en humanos y perros en Guerrero (Rosete-Ortiz *et al.*, 2011) y Chiapas (Pastor-Santiago *et al.*, 2012) y por *L. mexicana* en pacientes inmunocomprometidos (Monroy-Ostria y Sanchez-Tejeda, 2017). En Quintana Roo se han determinado seroprevalencias en perros de 16.3, 9.2 y 4.6% para *L. mexicana*, *L. infantum* y *L. braziliensis*, respectivamente utilizando anticuerpos contra superóxido dismutasa de hierro excretada por el parásito (López-Céspedes *et al.*, 2012).

El tripanosomátido de mayor impacto en salud pública en América es *T. cruzi*, causante de la enfermedad de Chagas o tripanosomiasis americana (Carabarin-Lima *et al.*, 2013). La enfermedad afecta a cerca de ocho millones de personas en el mundo, especialmente en América Latina (Álvarez-Hernández *et al.*, 2018). Los vectores son hemípteros de la familia Reduviidae, conocidos como «vinchucas» o «chinchas besucanas», y comprenden más de 130 especies pertenecientes a tres géneros: *Triatoma*, *Rhodnius* y *Panstrongylus* (Iowa State University, 2010; Pérez-Molina y Molina, 2017). Dos tercios del territorio mexicano son endémicos de tripanosomiasis americana. Los estados con la seroprevalencia más alta en humanos son Veracruz, Morelos, Oaxaca, Yucatán, Chiapas, Guerrero y Jalisco (Rojo-Medina *et al.*, 2018). En Quintana Roo, se estableció una seroprevalencia en perros de 21.3% en la prueba de detección de anticuerpos contra superóxido dismutasa de hierro excretada por *T. cruzi* (López-Céspedes *et al.*, 2013).

Los principales reservorios de *L. mexicana* son roedores de los géneros *Peromyscus*, *Otodylomys* y *Sigmodon* (Roque y Jansen, 2014). Los reservorios de *L.*

infantum son cánidos domésticos y silvestres (Ribeiro *et al.*, 2018). Los principales animales que actúan como reservorio de *T. cruzi* son zarigüeyas, armadillos y algunos roedores (Gürtler y Cardinal, 2015). Se estima que los protozoos de esta familia se pueden alojar en al menos 150 especies de mamíferos silvestres (Eloy y Lucheis, 2009).

Las manifestaciones clínicas en los perros pueden ir desde lesiones cutáneas, como úlceras localizadas en el caso de infección por *L. mexicana* (Cruz-Chan *et al.*, 2014) hasta enfermedad multisistémica con compromiso renal y cuadro clínico pleomórfico como ocurre en muchas infecciones por *L. infantum* (Solano-Gallego *et al.*, 2011). Las principales manifestaciones clínicas de enfermedad de Chagas en perros son agrandamiento del corazón, miocarditis aguda, letargia, anorexia, ascitis, dificultad respiratoria y alteración de la conducción cardíaca (Kjos *et al.*, 2008). Muchos signos clínicos de enfermedades provocadas por tripanosomátidos en perros suelen ser inespecíficos, lo que hace casi imposible el diagnóstico sin pruebas complementarias de laboratorio. Además, la presencia de coinfecciones entre géneros y especies de esta familia de parásitos es común en zonas endémicas (Oliveira-Porfirio *et al.*, 2018; Vietri *et al.*, 2018).

El estado de Quintana Roo presenta características climáticas y ecológicas para el desarrollo de los principales vectores de tripanosomátidos (Dumonteil y Gourbière, 2004; May-Uc *et al.*, 2011) y los veterinarios de campo reportan casos de perros con manifestaciones clínicas sugestivas de leishmaniosis y tripanosomiasis canina. Sin embargo, los agentes causales no han sido debidamente diagnosticados. Debido a esto, el objetivo de esta investigación fue determinar la frecuencia serológica y molecular de infección por *Leishmania* spp y *T. cruzi* en perros con signos sugestivos a infección por tripanosomátidos, así como identificar factores asociados a los patógenos en perros del municipio de Lázaro Cárdenas, Quintana Roo, México.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales

Se incluyeron 40 perros en el estudio transeccional descriptivo mediante un muestreo no probabilístico en el municipio de Lázaro Cárdenas, Quintana Roo, entre septiembre y octubre de 2018. Se buscaron casos con cuadros clínicos sospechosos de infección por tripanosomátidos. Los perros seleccionados presentaron al menos tres de los siguientes signos clínicos: condición corporal baja, mucosas pálidas, agrandamiento de linfonodos y fiebre (Barr, 2009; Reis *et al.*, 2009), así como dermatitis ulcerativa focal, multifocal o difusa, dermatitis exfoliativa, nodular, pustular o papular, hiperqueratosis del morro, epistaxis, enfermedad corneal, conjuntivitis (Solano-Gallego *et al.*, 2011, 2017) y tos (Kjos *et al.*, 2008).

Se colectó suero, piel y médula ósea de perros que presentaban signos de enfermedad cutánea o sistémica. Además, se tomaron los principales datos del animal en una hoja de expediente clínico orientado a problemas y se realizó un examen físico general en cada uno. Los perros muestreados presentaron un rango de edad de 5 meses a 13 años.

Toma de Muestras

La muestra de sangre se colectó mediante venopunción de la vena cefálica y se colocó en tubos de plástico de 5 ml sin anticoagulante. La biopsia de piel se realizó con un sacabocados de 6 mm de diámetro, empleando un punto de sutura simple al finalizar el procedimiento. La obtención de médula ósea se realizó mediante punción costocondral. Para esto, se palpó la unión costocondral en el tercio ventral de las costillas X y XI, se realizó la antisepsia del área con solución de yodopovidona al 10% y se introdujo una aguja (21 G) perpendicularmente a través de la costilla hasta alcanzar la porción medular. Se aspiró y se extrajo de 0.3 a 0.5 ml de médula ósea (Maidana *et al.*, 2010).

Las muestras de médula ósea y piel se obtuvieron bajo anestesia general superficial. Se empleó una dosis de 0.5 mg/kg de clorhidrato de xilacina vía IM y 2 a 3 mg/kg de la combinación clorhidrato de tiletamina/zolazepam vía IV 15 minutos después de la primera droga. Cada animal fue muestreado bajo la presencia del propietario o responsable del animal, habiendo firmado una hoja de consentimiento informado. El proyecto contó con la aprobación del Comité de Bioética del Campus de Ciencias Biológicas y Agropecuarias de la Universidad Autónoma de Yucatán (Código de Registro CB-CCBA-M-2018-005).

Las muestras de sangre fueron centrifugadas a los 30 minutos de la extracción a 1600 x G durante 10 minutos. Los sueros resultantes (1 ml) se colocaron en viales de 1.5 ml y se guardaron en refrigeración (+4 °C) hasta llegar al Laboratorio de Biología Molecular del Campus de Ciencias Biológicas y Agropecuarias de la Universidad Autónoma de Yucatán, donde se almacenaron a -20 °C. Posteriormente se enviaron al laboratorio de Sanidad Animal de la Universidad Complutense de Madrid, España.

La biopsia de piel se cortó en dos fragmentos similares inmediatamente después de su obtención. La muestra de piel destinada para el análisis histopatológico fue depositada en una solución de formalina tamponada al 10 % y conservada a temperatura ambiente (Pimentel *et al.*, 2008). La otra parte, destinada para el análisis molecular, se depositó en una solución de etanol al 100% en una proporción 1:10 y se mantuvo a temperatura ambiente (Alqaydi y Roy, 2016). Esta técnica de conservación se ha empleado para muestras de piel y órganos de murciélagos en la detección de *L. mexicana* con resultados satisfactorios (Berzunza-Cruz *et al.*, 2015). Para el análisis citológico, una gota de médula ósea fue extendida entre dos portaobjetos y secada al aire. Para el análisis molecular, se depositaron 2 gotas de médula ósea en un tubo para biología molecular (Eppendorf, Alemania) de 1.5 ml con 200 μ l

de buffer NET-10 (10 mM de NaCl, 10 mM EDTA y 10 mM de Tris HCl con 25 mg/ml de gentamicina). Las muestras en el buffer se conservaron entre -15 y -10 °C hasta su procesamiento.

Análisis de las Muestras

Inmunofluorescencia indirecta

La prueba de inmunofluorescencia indirecta (IFI) es la prueba de referencia para el diagnóstico de la leishmaniosis canina recomendada por la OIE (Moreno *et al.*, 2017). Tiene una sensibilidad entre 87 y 100% y especificidad entre 77 y 100%. Se empleó la metodología descrita por Moreno *et al.* (2014), que consiste en la fijación de anticuerpos del suero problema en una placa con promastigotes. Una vez aplicada la muestra de suero en la placa, se adicionó un conjugado de anti-inmunoglobulinas caninas marcadas con isotiocianato de fluoresceína. La mezcla final se observó al microscopio con luz ultravioleta luego de una serie de diluciones. Se consideró el punto de corte a partir de la dilución 1/100. Los sueros que presentaron un título menor al punto de corte fueron considerados como sospechosos (Miró, 2007).

Prueba serológica inmunocromática para detección de anticuerpos anti-Trypanosoma cruzi

Se empleó la prueba rápida Chagas Ab Rapid (SD BioLine, Corea) para la detección de inmunoglobulina G (IgG) anti-*T. cruzi*. La prueba tiene una sensibilidad de 90.7-99.3% y especificidad de 94-100% (Ji *et al.*, 2009; Sánchez-Camargo *et al.*, 2014).

Análisis histopatológico de piel

Se siguió la metodología descrita por Terán *et al.* (2013) para el corte, montaje y tinción de muestras fijadas en formalina tamponada. Se empleó la tinción hematoxilina-eosina.

Análisis citológico de médula ósea

Luego de secarse, cada extensión de médula ósea fue fijada y teñida en campo con el kit Diff-Quick (Pimentel *et al.*, 2015). Las laminillas fijadas y teñidas se conservaron a temperatura ambiente.

Extracción y purificación de ácidos nucleicos

Las muestras de piel fueron removidas de la solución fijadora hasta secar por completo y se depositaron en un vial de 1.5 ml. Se almacenaron durante 24 h en ultracongelación a -80 °C. Después, cada muestra congelada se maceró con un pistilo en un tubo tipo Eppendorf de 1.5 ml para facilitar su digestión. El procedimiento se realizó con el estuche comercial DNeasy Blood and Tissue (Qiagen, 2006). El material obtenido de la purificación se congeló a -20 °C hasta su amplificación.

Para determinar su pureza, se midió la absorbancia de la elución a 260 nm y a 280 nm en un espectrofotómetro NanoDrop 2000 (Thermo Fisher), usando como blanco la solución AE del kit empleado para la extracción. El cociente de absorbancias A260/A280 nm mayor a 1.7 es indicador de la pureza del ADN del extracto analizado (Risueño *et al.*, 2018).

PCR ITS1 Leishmania spp

Se realizó el procedimiento en los extractos de piel y médula ósea. El espaciador interno ribosomal 1 (ITS1) se encuentra en el operón ribosomal, entre los genes que codifican para la región 18S y 5.8S (Schönian *et al.*, 2003). Esta región conservada posee mayor variabilidad entre especies que otras regiones del operón, razón por la cual se emplea para caracterizar al parásito a nivel de especie. La secuencia del ITS1 está repetida varios cientos de veces en el genoma (Baldwin *et al.*, 1995), por lo que se puede detectar de 0.1 a 0.2 parásitos por reacción

(Nasereddin *et al.*, 2008; Ranasinghe *et al.*, 2015). Se usó un extracto de cultivo de promastigotes de la cepa MHET/MX/97/Hd18 de *L. mexicana* como control positivo. Se emplearon los cebadores LITSR: 5'-CTG GAT CAT TTT CCG ATG -3' (*forward*) y L5.8S: 5'-TGA TAC CAC TTA TCG CAC TT -3' (*reverse*) (Lima *et al.*, 2017). Los iniciadores generan un amplicón de 300 a 350 pb para cualquier especie de *Leishmania* con una variación ligera en el peso molecular entre cada especie (Céspedes-Chaves *et al.*, 2016). Se empleó el estuche GoTaq Green Master Mix, siguiendo el procedimiento recomendado por el fabricante (Promega Corporation, 2016) en un termociclador MyCycler Thermal Cycler System. Se empleó el marcador molecular DNA Leader Molecular Weight Marker 100 bp.6. Se usaron las condiciones de PCR descritas por Lima *et al.* (2017), con una temperatura de desnaturalización inicial de 95 °C durante tres min, seguido de 35 ciclos con 40 s de desnaturalización a 95 °C, 53 °C de alineamiento por 45 s y 72 °C durante un min de extensión. Finalmente, una temperatura de extensión de 70 °C durante 6 min. El producto amplificado se sometió a electroforesis en geles de agarosa al 2% con 10 µl de bromuro de etidio (10 mg/ml) por cada 100 ml de gel, aplicando un voltaje de 90 V durante 45 min.

PCR *kdNA Trypanosoma cruzi*

Se realizó la PCR para detección de *T. cruzi* en los extractos de médula ósea empleando los oligonucleótidos Tc121: 5'-AAA TAA TGT ACG GGG KGA GAT GCA TGA -3' (*forward*) y Tc122: 5'-GGT TCG ATT GGG GTT GGT GTA ATA TA -3' (*reverse*) (Virreira *et al.*, 2018), que amplifican una región del ADN del kinetoplasto con un peso molecular de 300 pb. Como control positivo se usó un cultivo de tripomastigotes de la cepa H4 de *T. cruzi*. Se empleó el kit DreamTaq Green (Thermo Scientific), bajo condiciones similares a las reportadas por Saavedra *et al.* (2013); es decir, desnaturalización inicial

de 94 °C por 3 min, 35 ciclos de 94 °C de desnaturalización, 63.6 °C de alineamiento y 72 °C de extensión, cada fase con una duración de 1 min. Para la extensión final se mantuvo la temperatura anterior durante 5 min. La electroforesis se realizó bajo condiciones similares al ensayo anterior, pero por 25 min.

Factores Asociados

Para el análisis de factores asociados los signos clínicos de 40 perros fueron divididos en dos grupos. Perros con signos clínicos compatibles con leishmaniosis fueron considerados aquellos que presentaron uno de los siguientes signos: dermatitis ulcerativa focal, multifocal o difusa, dermatitis exfoliativa, nodular, pustular o papular, hiperqueratosis del morro, epistaxis, enfermedad corneal, conjuntivitis (Solano-Gallego *et al.*, 2011), y perros con tos fueron asignados al grupo sugestivo de tripanosomiasis americana (Bonilla *et al.*, 2018). Los signos clínicos de condición corporal baja, mucosas pálidas, agrandamiento de nódulos linfoides y fiebre fueron signos incluidos en ambos grupos (Barr, 2009; Reis *et al.*, 2009).

Debido al reducido número de casos positivos a anticuerpos anti-*L. infantum* y PCR a *Leishmania* spp, solo se realizó el análisis de factores asociados con los resultados de *T. cruzi*. Para ello se usaron como variables independientes el sexo (macho, hembra), edad (>1 año, ≤1 año), condición corporal (baja, superior) de acuerdo con Freeman *et al.* (2011), fiebre (sí, no) de acuerdo con Eldredge *et al.* (2007), mucosas pálidas (sí, no), nódulos linfoides agrandados (sí, no) y tos (presente, ausente). Se usó como prueba tamiz la prueba exacta de Fisher (Pértega-Díaz y Pita-Fernández, 2004). Las variables con $p < 0.2$ fueron analizadas mediante una prueba de regresión logística con el programa SPSS. La asociación se consideró significativa si presentaba un valor $p < 0.05$.

Cuadro 1. Perros positivos a las pruebas diagnósticas de leishmaniasis y tripanosomiasis en el municipio de Lázaro Cárdenas, Quintana Roo, México (2018)

ID	IFI <i>L. infantum</i>	Anticuerpos anti- <i>T. cruzi</i>	PCR kDNA <i>T. cruzi</i>
1	-	-	+
4	-	-	+
6	+	+	+
7	-	-	+
10	-	+	+
12	S ¹	-	-
13	+	-	-
14	+	+	+
15	S	-	+
17	S	+	+
19	-	-	+
24	-	-	+
25	S	-	-
26	S	+	+
28	-	-	+
32	-	-	+
33	-	+	+
34	-	-	+
35	-	-	+
37	-	-	+

¹ Sospechoso

RESULTADOS

En el Cuadro 1 se presentan los animales positivos a anticuerpos anti-*L. infantum*, anti-*T. cruzi* y positivos a la PCR de *T. cruzi*. El 7.5% de perros fueron positivos a anticuerpos anti-*L. infantum* (3/40) y 12.5% resultaron sospechosos (5/40). Asimismo, 15% fue positivo a anticuerpos anti-*T. cruzi* (6/40). Ninguna de las muestras de médula ósea y piel resultaron positivas a la PCR para *Leishmania* spp. En el Cuadro 1 también se puede observar que 64.7% (11/17) de los perros positivos a la infección por *T. cruzi* en

la PCR no presentaron anticuerpos anti-*T. cruzi* y que todos los perros positivos a anticuerpos anti-*T. cruzi* fueron positivos a la infección por *T. cruzi* en la PCR (6/6). Asimismo, 66.6% (2/3) de los perros positivos a anticuerpos anti-*L. infantum* también resultaron positivos a anticuerpos anti-*T. cruzi* y a la PCR de *T. cruzi*. Se presentó un perro (1/3) que solamente fue positivo a anticuerpos anti-*L. infantum*.

En las pruebas de PCR realizadas en médula ósea, 42.5% (17/40) de los perros resultaron positivos a la infección por *T. cruzi* (Figura 1).

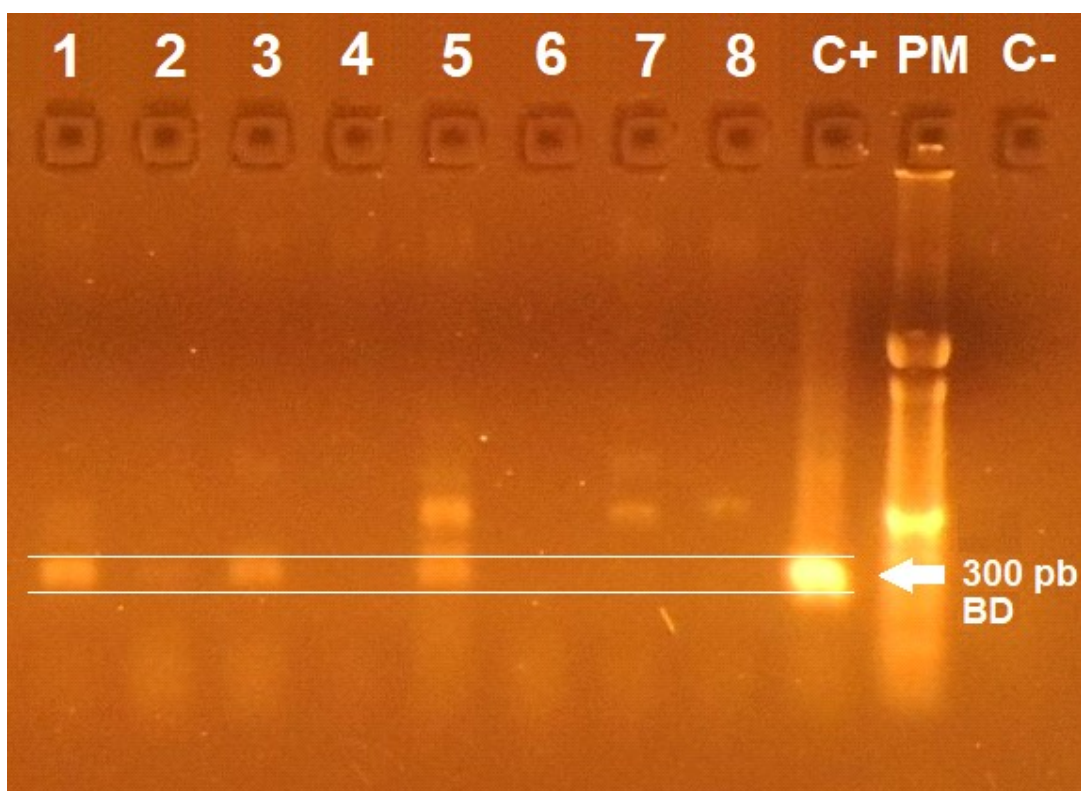


Figura 1. Análisis de PCR para la detección de kDNA *T. cruzi* a partir de extractos de médula ósea de perros con sospecha de tripanosomiasis. Se aprecian bandas de 300 pb en los carriles 1, 2, 3 y 5. C+: control positivo. PM: peso molecular. C-: control negativo. BD: banda diagnóstica

Los perros del estudio presentaron los siguientes signos clínicos: condición corporal baja (60%), úlcera cutánea (32.5%), mucosas pálidas (20%), fiebre (15%), agrandamiento de nódulos linfoides (15%), tos (10%), soplo cardíaco (2.5%) y epistaxis (2.5%).

En los estudios histopatológicos no se hallaron fases de desarrollo de tripanosomátidos (amastigotes) dentro o fuera de células fagocíticas. Las lesiones histopatológicas observadas se presentan en el Cuadro 2, siendo la presencia de infiltrado inflamatorio dérmico e hiperplasia epidérmica las

más frecuentes. Los tipos de infiltrados inflamatorios dérmicos fueron histiocítico (52.5%), supurativo (25.0%), linfocítico (17.5%) y piogranulomatoso (5.0 %). Las probables causas primarias de dermatopatía fueron de origen bacteriano (22.5%), neoplásico (17.5%), micótico (12.5%), alérgico (5%) y parasitario por *Demodex* spp (2.5%).

En ninguna de las 40 muestras de médula ósea se observaron fases de desarrollo de tripanosomátidos dentro o fuera de histiocitos. Incidentalmente, se hallaron microfilarias en seis casos (15%).

Cuadro 2. Frecuencia de lesiones halladas en el análisis histopatológico de perros (n=40) con signos clínicos sugestivos a tripanosomátidos

Localización	Lesión	Frecuencia absoluta	Frecuencia relativa (%)
Epidermis	Hiperplasia	19	47.5
	Úlcera	13	32.5
	Hiperqueratosis	10	25.0
	Espongiosis	4	10.0
	Infiltrado inflamatorio	2	5.0
	Erosión	1	2.5
	Anaplasia	1	2.5
Dermis	Infiltrado inflamatorio	30	75.0
	Úlcera	9	22.5
	Congestión	7	17.5
	Necrosis	2	5.0

En el análisis de asociación con los casos positivos a anticuerpos anti-*T. cruzi* se encontró que la condición corporal y mucosas pálidas presentaron un valor $p < 0.2$ en la prueba exacta de Fisher y fueron incluidas en el análisis de regresión logística. Asimismo, las variables sexo, condición corporal, fiebre, mucosas pálidas y nódulos linfoides agrandados tuvieron valores de $p < 0.2$ con la PCR para *T. cruzi* y fueron incluidas en otro análisis de regresión logística. Únicamente la variable condición corporal baja en los perros positivos a anticuerpos anti-*T. cruzi* presentó un valor de $p = 0.035$ en la prueba exacta de Fisher. En el análisis de regresión logística de los casos positivos a anticuerpos anti-*T. cruzi* y PCR kDNA de *T. cruzi* no se encontró significancia en las variables estudiadas.

DISCUSIÓN

Las frecuencias de perros positivos en los análisis serológicos para la detección de anticuerpos anti-*L. infantum* y anti-*T. cruzi*

en el presente estudio fueron relativamente similares a las seroprevalencias reportadas por otros autores en la región. Así, López-Céspedes *et al.* (2012) obtuvieron una seroprevalencia en perros para *L. infantum* en Quintana Roo ligeramente mayor (9.2%) y López-Céspedes *et al.* (2013) encontraron una seroprevalencia de perros positivos a anticuerpos anti-*T. cruzi* de 21.3%, siendo en el presente estudio de 15%.

Por otro lado, la frecuencia de perros positivos en la PCR para *T. cruzi* resultó mayor (42.5%) en comparación con la frecuencia de positivos en la prueba de detección de anticuerpos anti-*T. cruzi* (15%), posiblemente debido a que los perros fueron muestreados cuando se encontraban en la etapa aguda de la infección. La seroconversión ocurre alrededor de las tres semanas de la infección, acompañada de un descenso en la parasitemia. Los anticuerpos persisten en el animal por el resto de su vida, independientemente de si desarrolla signos de enfermedad crónica (Barr, 2009).

La presencia de anticuerpos anti-*L. infantum* en perros positivos y sospechosos a la prueba de IFI, a pesar de la ausencia de casos positivos en la PCR para *Leishmania* spp, podría deberse a la infección por el agente en animales resistentes a la enfermedad, especialmente en aquellos que resultaron negativos a la prueba serológica y molecular de *T. cruzi*. Solano-Gallego *et al.* (2009) afirman que alrededor de la mitad de los perros infectados con *L. infantum* son resistentes al patógeno. En ellos, la infección desencadena predominantemente una respuesta inmunitaria tipo Th1 con un nivel de anticuerpos anti-*L. infantum* bajo a medio, pudiéndose detectar o no al patógeno mediante PCR debido a la baja carga parasitaria. Si el resultado de la prueba de IFI es dudoso, Miró (2007) recomienda repetir el análisis a los 30-45 días o emplear otra prueba diagnóstica.

Respecto a las muestras biológicas empleadas en este estudio, se demuestra que la médula ósea en perros es un tejido útil para el diagnóstico molecular de *T. cruzi*. Se han reportado casos caninos donde se hallan amastigotes de *T. cruzi* en médula ósea en exámenes citológicos (Almeida *et al.*, 2013); sin embargo, no se llegaron a observar en la presente investigación. De la misma manera, se pueden observar amastigotes en piel de humanos infectados (Hemmige *et al.*, 2012), pero no se han reportado en perros y tampoco se observaron en los análisis histopatológicos de lesiones cutáneas en este estudio. *T. cruzi* no fue buscado en los tejidos donde regularmente se encuentran los pseudoquistes de amastigotes (miocardio, intestino delgado o bazo) (Kjos *et al.*, 2008), debido a que la investigación se centró en animales vivos, todos ellos domiciliados. En cambio, la obtención de médula ósea en perros en la unión costocondral es una técnica rápida y segura, considerada la técnica de elección para la obtención de este tejido para el diagnóstico de la leishmaniosis canina (Maidana *et al.*, 2010).

El único factor que presentó asociación significativa en el análisis estadístico fue la condición corporal. Esta variable es un signo relacionado con la infección por *T. cruzi* en perros reportado por varios autores (Ortiz *et al.*, 2016; Curtis-Robles *et al.*, 2018), aunque se encuentra también en numerosas patologías. Sin embargo, Carrillo-Peraza *et al.* (2014) no encontraron esta asociación en perros en Molas, Yucatán, pero hallaron una asociación significativa con la edad, concluyendo que los perros adultos tenían mayor probabilidad de resultar positivos a anticuerpos anti-*T. cruzi*.

La presente investigación revela que la probabilidad de hallar casos positivos a la infección por *T. cruzi* es mayor que la probabilidad de hallar casos positivos a la infección por *L. infantum* en pruebas serológicas y moleculares en perros con signos sugestivos de infección por tripanosomátidos en el municipio de Lázaro Cárdenas, Quintana Roo.

CONCLUSIÓN

Los perros con signos clínicos sugestivos a infección por tripanosomátidos en Lázaro Cárdenas, Quintana Roo, México, presentan baja frecuencia de anticuerpos IgG anti-*L. infantum* sin que se detecte molecularmente la presencia del agente. Asimismo, estos perros presentan alta frecuencia molecular de infección por *T. cruzi* y baja frecuencia de anticuerpos de la clase IgG. La condición corporal baja en perros se asoció a la presencia de anticuerpos IgG anti-*T. cruzi*.

LITERATURA CITADA

1. Almeida A, Paula D, Otton M, Jaune F, Cruz R, Madeira M, *et al.* 2013. Natural infection by *Trypanosoma cruzi* in one dog in central western Brazil: a

- case report. *Rev Inst Med Trop S Paulo* 55: 287-289. doi: 10.1590/S0036-46652013000400011
2. **Alqaydi M, Roy R. 2016.** Quantitative and qualitative study of STR DNA from ethanol and formalin fixed tissues. *Forensic Sci Int* 262: 18-29. doi: 10.1016/j.forsciint.2016.02.011
 3. **Alvar J, Yactayo S, Bern C. 2006.** Leishmaniasis and poverty. *Trends Parasitol* 22: 552-557. doi: 10.1016/j.pt.2006.09.004
 4. **Álvarez-Hernández DA, Franyuti-Kelly GA, Díaz-López R, González-Chávez AM, González-Hermosillo D, Vázquez-López R. 2018.** Chagas disease: current perspectives on a forgotten disease. *Rev Med Hosp Gen (Mex)* 81: 154-164. doi: 10.1016/j.hgmx.2016.09.010
 5. **Baldwin BG, Sanderson MJ, Porter JM, Wojciechowski MF, Campbell CS, Donoghue MJ. 1995.** The ITS region of nuclear ribosomal DNA: a valuable source of evidence on angiosperm phylogeny. *Ann Mo Bot Gard* 82: 247-277. doi: 10.2307/2399880
 6. **Barr SC. 2009.** Canine Chagas' disease (American trypanosomiasis) in North America. *Vet Clin N Am-Small* 39: 1055-1064. doi: 10.1016/j.cvsm.2009.06.004
 7. **Berzunza-Cruz M, Rodríguez-Moreno A, Gutiérrez-Granados G, González-Salazar C, Stephens CR, Hidalgo-Mihart M, et al. 2015.** *Leishmania* (L) *mexicana* infected bats in Mexico: novel potential reservoirs. *PLoS Neglect Trop D* 9: e0003438. doi: 10.1371/journal.pntd.0003438
 8. **Bonilla MC, Herrero-Acosta MV, Urbina-Villalobos A, Dolz G. 2018.** Detección de anticuerpos contra *Trypanosoma cruzi* en caninos de Costa Rica. *Cien Vet* 36: 1-14. doi: 10.15359/rev.36-2.1
 9. **Carabarin-Lima A, González-Vázquez MC, Rodríguez-Morales O, Baylón-Pacheco L, Rosales-Encina JL, Reyes-López PA, Arce-Fonseca M. 2013.** Chagas disease (American trypanosomiasis) in Mexico: an update. *Acta Trop* 127: 126-135. doi: 10.1016/j.actatropica.2013.04.007
 10. **Carrillo-Peraza JR, Manrique-Saide P, Rodríguez-Buenfil JC, Escobedo-Ortegón JF, Rodríguez-Vivas RI, Bolio-González ME, Barrera-Pérez M, et al. 2014.** Estudio serológico de la tripanosomiasis americana y factores asociados en perros de una comunidad rural de Yucatán, México. *Arch Med Vet* 46: 75-81. doi: 10.4067/S0301-732X2014-000100011
 11. **Céspedes-Chaves E, Portillo N, Thomaz-Soccol V, Gonçalves AL, González-Brítez N. 2016.** Estandarización de la técnica de PCR-RFLP de la región ITS1 para la caracterización molecular de *Leishmania* (L) *infantum* en muestras caninas. *Mem Inst Investig Cienc Salud* 14: 24-33. doi: 10.18004/mem.iics/1812-9528/2016.014(03)24-033
 12. **Cruz-Chan JA, Aguilar-Cetina AC, Villanueva-Lizama L, Martínez-Vega P, Ramírez-Sierra M, Rosado-Vallado M, Guillermo-Cordero JL, et al. 2014.** A canine model of experimental infection with *Leishmania* (L) *mexicana*. *Parasite Vector* 7: 361. doi: 10.1186/1756-3305-7-361
 13. **Curtis-Robles R, Auckland LD, Hodo CL, Snowden KF, Nabity MB, Hamer SA. 2018.** *Trypanosoma cruzi* discrete typing unit TcIV implicated in a case of acute disseminated canine Chagas disease. *Vet Parasitol Reg Stud Reports* 12: 85-88. doi: 10.1016/j.vprsr.2018.-02.006
 14. **Dumonteil E, Gourbière S. 2004.** Predicción de la abundancia y tasa de infección de *Triatoma dimidiata*: un mapa de riesgo de transmisión natural de la enfermedad de Chagas en la Península de Yucatán, México. *Biomedica* 15: 221-231. doi: 10.32776/revbiomed.v15i4.394

15. **Eldredge DM, Carlson LD, Carlson DG, Giffin JM. 2007.** Dog owner's home veterinary handbook. 4th ed. Hoboken: Wiley Publishing. 573 p.
16. **Eloy L, Lucheis S. 2009.** Canine trypanosomiasis: etiology of infection and implications for public health. *J Venom Anim Toxins* 15: 589-611. doi: 10.1590/S1678-91992009000400002
17. **Freeman L, Becvarova I, Cave N, MacKey C, Nguyen P, Rama B, et al. 2011.** WSAVA nutritional assessment guidelines. *J Small Anim Pract* 52: 385-396. doi: 10.1111/j.1748-5827.2011.01079.x
18. **Gürtler RE, Cardinal MV. 2015.** Reservoir host competence and the role of domestic and commensal hosts in the transmission of *Trypanosoma cruzi*. *Acta Trop* 151: 32-50. doi: 10.1016/j.actatropica.2015.05.029
19. **Hemmige V, Tanowitz H, Sethi A. 2012.** *Trypanosoma cruzi* infection: a review with emphasis on cutaneous manifestations. *Int J Dermatol* 51: 501-508. doi: 10.1111/j.1365-4632.2011.05380.x
20. **Iowa State University. 2010.** Enfermedad de Chagas. [Internet]. Disponible en: http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/es/trypanosomiasis_american-es.pdf
21. **Ji MJ, Noh JS, Cho BK, Cho YS, Kim SJ, Yoon BS. 2009.** Evaluation of SD BIOLINE Chagas Ab Rapid kit. *Korean J Lab Med* 29: 48-52. doi: 10.3343/kjlm.2009.29.1.48
22. **Kjos SA, Snowden KF, Craig TM, Lewis B, Ronald N, Olson JK. 2008.** Distribution and characterization of canine Chagas disease in Texas. *Vet Parasitol* 152: 249-256. doi: 10.1016/j.vetpar.2007.12.021
23. **Lima EC, Barbosa-Júnior WL, Brito ME, Melo FL, Filho SP, Medeiros ZM. 2017.** Characterization of *Leishmania* (L) *infantum chagasi* in visceral leishmaniasis associated with HIV co-infection in northeastern Brazil. *Rev Inst Med Trop Sp* 59: 3-7. doi: 10.1590/S1678-9946201759048
24. **López-Céspedes A, Longoni SS, Sauri-Arceo CH, Rodríguez-Vivas RI, Villegas N, Escobedo-Ortegón J, Barrera-Pérez MA, et al. 2013.** Seroprevalence of antibodies against the excreted antigen superoxide dismutase by *Trypanosoma cruzi* in dogs from the Yucatan Peninsula (Mexico). *Zoonoses Public Hlth* 60: 277-283. doi: 10.1111/j.1863-2378.2012.01520.x
25. **López-Céspedes A, Longoni SS, Sauri-Arceo CH, Sánchez-Moreno M, Rodríguez-Vivas RI, Escobedo-Ortegón FJ, Barrera-Pérez MA, et al. 2012.** *Leishmania* spp epidemiology of canine leishmaniasis in the Yucatan Peninsula. *Sci World J* 2012: 945871. doi: 10.1100/2012/945871
26. **Maidana HR, Llano EG, Báez AD, Cabrera WR. 2010.** Comparación de tres sitios anatómicos de extracción de muestras de medula ósea para el diagnóstico de leishmaniosis canina. *Rev Vet* 21: 144-147.
27. **May-Uc E, Arana HA, Rebollar-Téllez EA. 2011.** Distribución de flebotominos (Diptera: Psychodidae) en Quintana Roo, México. *Acta Zool Mex* 2: 273-289.
28. **Miró G. 2007.** Leishmaniosis canina: situación actual en Europa, diagnóstico y control. *Acta Sci Vet* 35(Suppl 2): 227-229.
29. **Monroy-Ostria A, Sanchez-Tejeda G. 2017.** Survey of cutaneous leishmaniasis in Mexico: *Leishmania* species, clinical expressions and risk factor. [Internet] Available in: <https://www.intechopen.com/books/the-epidemiology-and-ecology-of-leishmaniasis/survey-of-cutaneous-leishmaniasis-in-mexico-leishmania-species-clinical-expressions-and-risk-factors>

30. **Moreno I, Álvarez J, García N, de la Fuente S, Martínez I, Marino E, Toraño A. 2014.** Detection of anti-*Leishmania infantum* antibodies in sylvatic lagomorphs from an epidemic area of Madrid using the indirect immunofluorescence antibody test. *Vet Parasitol* 199: 264-267. doi: 10.1016/j.vetpar.2013.10.010
31. **Moreno I, García N, De la Cruz ML, Martínez I. 2017.** Brote de leishmaniasis en Fuenlabrada y otros municipios de la comunidad de Madrid. España: Comunidad de Madrid. 136 p.
32. **Nasreddin A, Bensoussan-Hermano E, Schönian G, Baneth G, Jaffe CL. 2008.** Molecular diagnosis of old world cutaneous leishmaniasis and species identification by use of a reverse line blot hybridization assay. *J Clin Microbiol* 46: 2848-2855. doi: 10.1128/JCM.00951-08
33. **Ortiz S, Ceballos MJ, González CR, Reyes C, Gómez V, García A, Solari A. 2016.** *Trypanosoma cruzi* diversity in infected dogs from areas of the north coast of Chile. *Vet Parasitol Reg Stud Rep* 5: 42-47. doi: 10.1016/j.vprsr.2016.-09.004
34. **Oryan A, Akbari M. 2016.** Worldwide risk factors in leishmaniasis. *Asian Pac J Trop Med* 9: 925-932. doi: 10.1016/j.apjtm.2016.06.021
35. **Pace D. 2014.** Leishmaniasis. *J Infect* 69: S10-S18.
36. **Pastor-Santiago JA, Chávez-López S, Guzmán-Bracho C, Flisser A, Olivio-Díaz A. 2012.** American visceral leishmaniasis in Chiapas, Mexico. *Am J Trop Med Hyg* 86: 108-114. doi: 10.4269/ajtmh.2012.10-0561
37. **Pérez-Molina JA, Molina I. 2017.** Chagas disease. *Lancet* 391: 82-94. doi: 10.1016/S0140-6736(17)31612-4
38. **Pértega-Díaz S, Pita-Fernández S. 2004.** Asociación de variables cualitativas: El test exacto de Fisher y el test de McNemar. *Cad Aten Primaria* 11: 304-308.
39. **Pimentel D, Ramos RA, Santana M, Maia C, Carvalho G, Da Silva H, Alves L. 2015.** Prevalence of zoonotic visceral leishmaniasis in dogs in an endemic area of Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop* 48: 491-493. doi: 10.1590/0037-8682-0224-2014
40. **Pimentel DS, Albuquerque ER, Faustino MA, Maia FC, Nascimento-Ramos RA, Alves LC. 2008.** Alterações estruturais hepáticas e esplênicas em cães naturalmente infectados por *Leishmania (Leishmania) chagasi*. *Med Vet* 2: 23-27.
41. **Porfirio GE, Santos FM, de Macedo GC, Barreto WT, Campos JB, Meyers AC, André MR, et al. 2018.** Maintenance of *Trypanosoma cruzi*, *T. evansi* and *Leishmania* spp by domestic dogs and wild mammals in a rural settlement in Brazil-Bolivian border. *Int J Parasitol Parasites Wildl* 7: 398-404. doi: 10.1016/j.ijppaw.2018.10.004
42. **Promega Corporation. 2016.** GoTaq Green Master Mix. [Internet]. Available in: <https://www.promega.com/-/media/files/resources/protocols/product-information-sheets/g/gotaq-green-master-mix-protocol.pdf>
43. **Qiagen. 2006.** DNeasy Blood & Tissue Handbook. [Internet]. Available in: file:///C:/Users/mggar/AppData/Local/Temp/HB-2061-002_HB_DNY_Blood_-Tissue_0120_WW.pdf
44. **Ranasinghe S, Wickremasinghe R, Hulangamuwa S, Sirimanna G, Opathella G, Maingon RD, et al. 2015.** Polymerase chain reaction detection of *Leishmania* DNA in skin biopsy samples in Sri Lanka where the causative agent of cutaneous leishmaniasis is *Leishmania donovani*. *Mem I Oswaldo Cruz* 110: 1017-1023. doi: 10.1590/0074-02760150286
45. **Reis AB, Martins-Filho OA, Teixeira-Carvalho A, Giunchetti RC, Carneiro CM, Mayrink W, Tafuri WL, Corrêa-Oliveira R.** Systemic and compartmentalized immune response in canine visceral leishmaniasis. *Vet Immunol Immunop* 128: 87-95. doi: 10.1016/j.vetimm.2008.10.307

46. **Ribeiro RR, Michalick MSM, da Silva ME, Dos Santos CCP, Frézard FJG, da Silva SM.** Canine leishmaniasis: an overview of the current status and strategies for control. *Biomed Res Int* 2018: 3296893. doi:10.1155/2018/3296893
47. **Risueño J, Ortuño M, Pérez-Cutillas P, Goyena E, Maia C, Cortes S, Arcenillas I, et al.** 2018. Epidemiological and genetic studies suggest a common *Leishmania infantum* transmission cycle in wildlife, dogs and humans associated to vector abundance in Southeast Spain. *Vet Parasitol* 259: 61-67. doi: 10.1016/j.vetpar.2018.05.012
48. **Rojo-Medina J, Ruiz-Matus C, Salazar-Schettino PM, González-Roldán JF.** 2018. Enfermedad de Chagas en México. *Gac Med Mex* 154: 605-612.
49. **Roque AL, Jansen AM.** 2014. Wild and synanthropic reservoirs of *Leishmania* species in the Americas. *Int J Parasitol Parasites Wildl* 3: 251-262. doi: 10.1016/j.ijppaw.2014.08.004
50. **Rosete-Ortíz DM, Berzunza-Cruz S, Salaiza-Suazo NL, González C, Treviño-Garza N, Ruiz-Remigio A, Gudiño-Zayas ME, et al.** 2011. Canine leishmaniasis in Mexico: the detection of a new focus of canine leishmaniasis in the state of Guerrero correlates with an increase of human cases. *Bol Med Hosp Infant Mex* 68: 88-93.
51. **Saavedra M, Zulantay I, Apt W, Martínez G, Rojas A, Rodríguez J.** 2013. Chronic Chagas disease: PCR-xenodiagnosis without previous microscopic observation is a useful tool to detect viable *Trypanosoma cruzi*. *Biol Res* 46: 295-298. doi: 10.4067/S0716-97602013000300011
52. **Sánchez-Camargo CL, Albajar-Viñas P, Wilkins PP, Nieto J, Leiby DA, Paris L, Scollo K, Flórez C, Guzmán-Bracho C, et al.** 2014. Comparative evaluation of 11 commercialized rapid diagnostic tests for detecting *Trypanosoma cruzi* antibodies in serum banks in areas of endemicity and nonendemicity. *J Clin Microbiol* 52: 2506-2512. doi: 10.1128/JCM.00144-14
53. **Schönian G, Nasereddin A, Dinse N, Schweynoch C, Schallig HD, Presber W, Jaffe CL.** 2003. PCR diagnosis and characterization of *Leishmania* in local and imported clinical samples. *Diagn Micr Infec Dis* 47: 349-358. doi: 10.1016/s0732-8893(03)00093-2
54. **Solano-Gallego L, Koutinas A, Miró G, Cardoso L, Pennisi MG, Ferrer L, et al.** 2009. Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniasis. *Vet Parasitol* 165: 1-18. doi: 10.1016/j.vetpar.2009.05.022
55. **Solano-Gallego L, Miró G, Koutinas A, Cardoso L, Pennisi M, Ferrer L, Oliva G, et al.** 2011. Leishvet guidelines for the practical management of canine leishmaniasis. *Parasite Vector* 4: 86. doi: 10.1186/1756-3305-4-86
56. **Solano-Gallego L, Cardoso L, Pennisi MG, Petersen C, Bourdeau P, Oliva G, Miró G, et al.** 2017. Diagnostic challenges in the era of canine *Leishmania infantum* vaccines. *Trends Parasitol* 33: 706-717. doi: 10.1016/j.pt.2017.06.004
57. **Sosa-Ávila EJ, Caro-Lozano J, Zúñiga-Carrasco IR.** 2014. Perfil epidemiológico de la leishmaniasis: una enfermedad olvidada en México. *Enferm Infec Micr Cl* 34: 31-36.

58. **Terán SL, Fierros LM, Botello NR, Hernández AL, Molina MO, Aguirre AM, et al. 2013.** Histología e inmunohistoquímica: manual de métodos. México: Univ. Nacional Autónoma de México. 28 p.
59. **Viettri M, Herrera L, Aguilar CM, Morocoima A, Reyes J, Lares M, Lozano-Arias D, et al. 2018.** Molecular diagnosis of *Trypanosoma cruzi*/*Leishmania* spp coinfection in domestic, peridomestic and wild mammals of Venezuelan co-endemic areas. *Vet Parasitol Reg Stud Rep* 14: 123-130. doi: 10.1016/j.vprsr.2018.10.002
60. **Virreira M, Alonso-Vega C, Solano M, Jijena J, Brutus L, Bustamante Z, Truyens C, et al. 2018.** Congenital Chagas disease in Bolivia is not associated with DNA polymorphism of *Trypanosoma cruzi*. *Am J Trop Med Hyg* 75: 871-879.