

**PREVALENCIA DE INFECCIÓN POR *Leishmania chagasi* EN LA
POBLACIÓN CANINA (LVC) DE LA VEREDA GUATIGUARÁ DE
PIEDRECUESTA, SANTANDER**

LEIDEN LISETH MARQUEZ RODRIGUEZ

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE BIOLOGIA
BUCARAMANGA
2004**

**PREVALENCIA DE INFECCIÓN POR *Leishmania chagasi* EN LA
POBLACIÓN CANINA (LVC) DE LA VEREDA GUATIGUARÁ DE
PIEDECUESTA, SANTANDER.**

LEIDEN LISETH MARQUEZ RODRIGUEZ

**Trabajo de grado presentado como requisito
Para obtener el título de Bióloga**

Director

Victor Manuel Angulo

MD. Parasitólogo

Codirector

Katherine Luna Marin

Bacterióloga

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE BIOLOGIA

BUCARAMANGA

2004

cielo

A Dios por darme vida
A mi mami por su amor y confianza
A mi papi por iluminarme desde el

A mi hermana por aguantarme
A martín por esperarme

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a todas las personas que de una u otra manera hicieron de mi trabajo de grado un éxito, Sinceramente gracias a:

- CINTROP por financiar el trabajo y abrirme sus puertas.
- Victor Manuel Angulo, por creer en mis capacidades y dirigir mi trabajo.
- Katherine Luna, por su apoyo incondicional, su asesoría y sobre todo por su hermosa amistad.
- Ana Elvira Farfán, por entrenarme en las técnicas serológicas.
- Personal CINTROP, Por toda su colaboración.
- Adriana y Noylin, veterinarias que me colaboraron en las salidas de campo.
- Centro de zoonosis, a sus veterinarios Javier y fernando; a los estudiantes de la UCC Miguel Fernando, Juan angel y Dairo.
- Lucho Cortés, Tatiana y Juan Carlos Rojas, por su duro trabajo en las salidas de campo.
- Laboratorio de Genética, por el préstamo del microscopio de fluorescencia.
- Jorge Barros, por su asesoría en estadística.
- Ibeths, Dora, Claudia, por su apoyo en momentos difíciles.
- Johnky, Fabiola, Pachin, Delina, por su gran ayuda.
- Mi familia y amigos que estuvieron pendientes del desarrollo del proyecto.
- Todos los habitantes de la vereda Guatiguará, por su confianza.

- Todas las personas que aportaron ideas, comentarios y críticas para mejorar mi trabajo y especialmente a la escuela de Biología por los conocimientos que me brindaron.

CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN	1
2. MARCO DE REFERENCIA	4
3. OBJETIVOS	14
3.1 GENERAL	14
3.2 ESPECÍFICOS	14
4. MATERIALES Y MÉTODOS	15
4.1 AREA DE ESTUDIO	15
4.2 POBLACIÓN ANIMAL	16
4.3 MUESTRAS BIOLÓGICAS	18
4.3.1 Directos	18
4.3.2 Muestras de sangre	19
4.3.3 Extracción de ADN	19
4.4 ESTANDARIZACIÓN DE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)	20
4.4.1 PCR multiplex	20
▪ Mezcla de reacción	20
▪ Amplificación	21

4.4.2 PCR nested	21
▪ Mezcla de reacción	21
▪ Amplificación	22
4.4.3 Controles	22
4.4.4 Sensibilidad y especificidad	23
4.4.5 Electroforesis	23
4.5 ESTANDARIZACIÓN DE LA INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA (IFI)	24
4.5.1. Preparación del antígeno	24
4.5.2 controles	24
4.5.3 Conjugado	24
▪ Titulación del conjugado	24
4.5.4 Estandarización de la técnica	25
4.6 PREVALENCIA DE LA INFECCIÓN	26
4.7 ANALISIS ESTADÍSTICO	26
5. RESULTADOS	28
5.1 CARACTERISTICAS DE LA POBLACIÓN CANINA	28
5.2 ESTANDARIZACION DE LA PCR MULTIPLEX	31
5.2.1 Iniciadores	31
5.2.2 dNTPs	31
5.2.3 MgCl ₂	32
5.2.4 Buffers- aditivos	32
5.2.5 Cantidad de ADN	32

5.2.6	Cantidad de Taq ADN Polimerasa	32
5.2.7	Mezcla de reacción estandarizada.	32
5.2.8	Condiciones de amplificación (ciclos y temperaturas)	33
5.2.9	Especificidad de la PCR	35
5.2.10	Sensibilidad de la PCR	36
5.2.11	Detección de <i>L.chagasi</i> en el material clínico	37
5.3	ESTANDARIZACIÓN DE LA PCR NESTED	38
5.3.1	Iniciadores	38
5.3.2	dNTPs-MgCl ₂	38
5.3.3	Cantidad de DNA	38
5.3.4	Cantidad de Taq ADN polimerasa	38
5.3.5	Mezcla de reacción estandarizada	38
5.3.6	Condiciones de amplificación (ciclos y temperatura)	40
5.3.7	Especificidad	40
5.3.8	Sensibilidad	41
5.3.9	Detección de <i>Leishmania spp.</i> en muestras clínicas	42
5.4	ESTANDARIZACION DE LA INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA	43
5.5	COMPARACIÓN ENTRE IFI Y PCR	45
5.6	PREVALENCIA DE LA INFECCIÓN POR <i>L.chagasi</i>	46
6.	DISCUSIÓN	52
6.1	ESTANDARIZACIÓN Y COMPARACIÓN DE LAS TÉCNICAS	55

CONCLUSIONES	65
RECOMENDACIONES	66
BIBLIOGRAFÍA	67
ANEXOS	78

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Panorámica de la vereda Guatiguará.	15
Figura 2. Registro de los perros que participaron en la toma de muestra.	17
Figura 3. Examen clínico que se le realizó a cada uno de los perros.	18
Figura 4. Toma de las muestras de sangre de los perros.	19
Figura 5. Porcentajes de perros encontrados en la vereda Guatiguará de acuerdo al lugar de procedencia.	28
Figura 6. Porcentaje de perros clínicamente sintomáticos y asintomáticos encontrados en la vereda Guatiguará.	29
Figura 7. Signos clínicos más frecuentes entre la población canina de la vereda.	30
Figura 8. PCR multiplex. Amplificación de controles positivos en los que se muestran las diferencias en las temperaturas de alineamiento.	34
Figura 9. Especificidad de los iniciadores de PCR multiplex LB-3C y LC-3L entre las especies <i>L. panamensis</i> y <i>L. chagasi</i> .	35
Figura 10. Especificidad entre las especies del orden Kinetoplastida.	36
Figura 11. Diagnóstico en Sangre por PCR multiplex.	37
Figura 12. Sensibilidad de la PCR nested.	41
Figura 13. PCR Nested. Diferencia de tamaño entre los productos.	42
Figura 14. IFI negativa para anticuerpos contra <i>L. chagasi</i> .	44
Figura 15. IFI positiva para anticuerpos contra <i>L. chagasi</i> .	44

Figura 16. Distribución bimodal de los títulos de anticuerpos en la población canina estudiada.	45
Figura 17. Porcentaje de Positividad PCR e IFI.	46
Figura 18. Distribución de las prevalencias según el sexo de la población canina estudiada.	47
Figura 19. Prevalencia de infección con <i>L. chagasi</i> según el sector de procedencia de los caninos.	49

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Concentraciones ensayadas en la estandarización de la mezcla de reacción para la PCR multiplex.	20
Tabla 2. Concentraciones ensayadas en la estandarización de la mezcla de reacción para la PCR nested.	22
Tabla 3. Reactivos utilizados en la mezcla de reacción para la PCR multiplex.	33
Tabla 4. Programas de amplificación de <i>Leishmania spp.</i> para la PCR multiplex	34
Tabla 5. Reactivos utilizados en la mezcla de reacción para la PCR Primaria.	39
Tabla 6. Reactivos utilizados en la mezcla de reacción para la PCR nested.	39
Tabla 7. Programas de amplificación para la PCR primaria.	40
Tabla 8. Programas de amplificación para la PCR nested	40
Tabla 9. Títulos de IFI observados en la población canina con Leishmaniosis visceral.	45
Tabla 10. Comparación entre IFI y la PCR multiplex para la detección de <i>L. Chagasi</i> en sangre periférica de perros.	46
Tabla 11. Distribución de las prevalencias según el sexo de la población canina estudiada.	47
Tabla 12. Distribución de las prevalencias por edad de la población canina estudiada.	48
Tabla 13. Distribución de las prevalencias según el sector.	48

Tabla 14. Comparación de los títulos de IFI con presencia- ausencia de síntomas.	50
Tabla 15. Distribución de los perros positivos de acuerdo a los síntomas presentados.	50
Tabla 16. Correlación de Spearman.	51

LISTA DE ANEXOS

	Pág.
Anexo A. Extracción de ADN por el Método Fenol-Cloroformo	78
Anexo B. Preparación del antígeno IFI	79
Anexo C. Protocolo estandarizado para IFI	81
Anexo D. Cuantificación del ADN	83
Anexo E. Formato de historias clínicas	85
Anexo F. Carta de consentimiento	86

RESUMEN

TÍTULO: PREVALENCIA DE INFECCIÓN POR *Leishmania chagasi* EN LA POBLACIÓN CANINA (LVC) DE LA VEREDA GUATIGUARÁ DE PIEDECUESTA, SANTANDER.*

AUTOR: MÁRQUEZ RODRIGUEZ LEIDEN LISETH **

PALABRAS CLAVE: Leishmaniosis visceral canina, Prevalencia, PCR multiplex, PCR nested, IFI.

DESCRIPCIÓN

La leishmaniosis visceral persiste como zoonosis en algunas regiones de Colombia. A pesar que las zonas de bosque seco y muy seco en Santander, son reconocidas como endémicas, pocos son los estudios para evaluar la prevalencia de infección en los reservorios domésticos, que son la principal fuente de parásitos para los insectos vectores en el ciclo de transmisión domiciliario. Se realizó un estudio para conocer la eficiencia de la Inmunofluorescencia Indirecta (IFI), la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) multiplex y PCR nested para determinar la prevalencia de la infección en la población canina. Este estudio se realizó en un asentamiento humano de reciente constitución, compuesto por 2019 habitantes y 392 perros aproximadamente. A un total de 100 perros se les realizó examen clínico para identificar signos y síntomas característicos de la enfermedad; se estandarizó la PCR nested y la PCR multiplex con cuatro iniciadores que amplifican el gen de mini exón y su *spliced leader* respectivamente, la IFI que utilizó como antígeno promastigotes de una cepa aislada en el foco. La prevalencia de infección fue del 47% por PCR multiplex, se encontraron 39 perros positivos por IFI; 54 presentaron síntomas compatibles con la infección; 25 sintomáticos fueron positivos por PCR y 24 por IFI. No se encontró correlación entre el cuadro clínico y la positividad de las pruebas, tampoco existen diferencias significativas de infección según edad o sexo. Se demostró la utilidad de las pruebas empleadas para la detección de la infección, independiente del estado clínico del perro. Se observó una alta prevalencia de infección por *L. chagasi* en la población canina de este foco, lo cual amerita la implementación de programas de control y vigilancia.

*Trabajo de Grado

**Facultad de Ciencias. Escuela de Biología. Dr. Víctor Manuel Angulo

SUMMARY

TITLE: PREVALENCIA OF INFECTION FOR *Leishmania chagasi* IN THE CANINE POPULATION (CVL) OF THE SIDEWALK GUATIGUARÁ, PIEDECUESTA, SANTANDER*

AUTHOR: MÁRQUEZ RODRIGUEZ LEIDEN LISETH **

WORDS KEY: Canine visceral Leishmaniosis, Prevalence, PCR multiplex, PCR nested, IFI.

DESCRIPTION

The visceral leishmaniosis persists as zoonoses in some regions of Colombia. To weigh that the areas of dry and very dry forest in Santander, they are recognized as endemic, few are the studies to evaluate the infection prevalence in the domestic reservoirs that are the main source of parasites for the vectors insects in the domiciliary transmission cycle. It was carried out a study to know the efficiency of the Indirect Immunofluorescence (IFI), the Polymerase Chain Reaction (PCR) multiplex and PCR nested to determine the prevalence of the infection in the canine population. This study was carried out in a human establishment of recent constitution, composed approximately by 2019 habitants and 392 dogs. To a total of 100 dogs they were carried out clinical exam to identify signs and characteristic symptoms of the illness; it was standardized the PCR nested and the PCR multiplex with four primers that amplify the gene of mini exón and their spliced leader respectively, the IFI that used as antigen promastigotes of a stump isolated in the focus. The infection prevalence was of 47% for PCR multiplex; 39 positive dogs for IFI; 54 presented compatible symptoms with the infection; 25 symptomatic they were positive for PCR and 24 for IFI. It was not correlation between the clinical signs and the positive tests; neither significant differences of infection exist according to age or sex. The utility of the tests was demonstrated used for the detection of the infection, independent of the clinical state of the dog. A high infection prevalence was observed by *L. chagasi* in the canine population of this focus, it deserves the implementation of control programs and surveillance.

* Work of Grade

** Sciences Faculty. Biology School. Dr. Víctor Manuel Angulo

INTRODUCCIÓN

La leishmaniosis visceral cuyo agente etiológico es *Leishmania donovani* es uno de los mayores problemas de salud en países tropicales y subtropicales a nivel mundial, involucra 400.000 nuevos casos anualmente con 12 millones de personas infectadas y 350 millones más se encuentran en riesgo de adquirir la infección (Belli A.*et al.*, 1998).

En Colombia la leishmaniosis visceral es causada usualmente por *Leishmania chagasi* y afecta principalmente niños menores de 10 años (Wilson, 1996). Los casos de leishmaniosis visceral se han reportado en regiones de bosque seco tropical con presencia de abundantes rocas y animales domésticos. El perro se considera el principal reservorio y el responsable de la persistencia de leishmaniosis visceral, originando un ciclo doméstico el cual se constituye en la principal fuente de parásitos para los vectores, que eventualmente se transmitirán al hombre (Minsalud, 1996). La frecuente ausencia de signos clínicos en los perros y la dificultad de una detección directa del parásito, así como un rápido y eficaz método indirecto de diagnóstico de la infección canina ha sido un gran obstáculo para tomar las medidas de control adecuadas y así interrumpir con el ciclo de transmisión entre los animales y el hombre.

Las técnicas clásicas de diagnóstico para leishmaniosis visceral tienen un gran número de limitaciones: El examen parasitológico directo al microscopio a pesar de ser rápido y de bajo costo tienen una sensibilidad muy limitada (Belli A.*et al.*, 1998); las técnicas de cultivo son un poco más sensibles pero son más dispendiosas y son más susceptibles a contaminaciones microbianas, además algunas cepas crecen mejor que otras y en los casos

de infecciones mixtas (leishmaniosis visceral y leishmaniosis cutánea) pueden pasar inadvertidas (Belli A. *et al.*, 1998); las técnicas serológicas presentan la desventaja de reacciones cruzadas de antígenos de *Leishmania spp.* con anticuerpos inducidos por otros Kinetoplastida como *Trypanosoma cruzi* (Mathis, 1995).

La identificación de especies se ha realizado convencionalmente por electroforesis de isoenzimas o por anticuerpos monoclonales, el primero es un proceso largo y costoso que requiere cultivar parásitos a gran escala y el segundo es usado para identificar especies en cultivos pero no es muy sensible para el análisis de especímenes clínicos (Belli A. *et al.*, 1998).

Las técnicas moleculares como la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) constituyen una herramienta rápida, sensible y específica que detecta la infección por *Leishmania spp.* (Ashford *et al.*, 1995). Varios protocolos se han reportado para la detección de *Leishmania donovani* agente causal de leishmaniosis visceral canina, sin embargo, se hace necesario simplificar y optimizar los métodos de preparación de muestras y el protocolo de amplificación.

Los programas de control para leishmaniosis visceral incluyen la eliminación o el tratamiento de perros infectados, también incluyen el tratamiento de los casos humanos, el control del vector o la eliminación de otros animales que podrían ser reservorios (Paranhos-silva *et al.*, 1996; Ashford *et al.*, 1998). La eliminación de perros infectados resulta una de las mejores opciones y para llevarla a cabo es necesario determinar en éstos de manera precoz, la infección por *Leishmania spp.* especialmente, en perros asintomáticos ya que en éstos las pruebas diagnósticas tradicionales tienen su mayor debilidad.

Rescatando la información presentada por el Instituto Nacional de Salud en la que se afirma que la falta de tratamiento oportuno de la leishmaniosis visceral puede causar mortalidad del 100% en niños menores de 5 años y que en algunas partes, aún con tratamiento, la mortalidad llega al 15% y teniendo en cuenta el suceso de salud pública de 7 casos de leishmaniosis visceral entre 1999 -2001 en el asentamiento humano localizado en la vereda Guatiguará del municipio de Piedecuesta cuya población es de 2.019 personas, de las cuales 242 son niños menores de siete años que conviven con aproximadamente 392 perros; se hace necesario primero: estandarizar una prueba para el diagnóstico de la infección canina que supere las limitaciones de las técnicas parasitológicas y serológicas en cuanto a la sensibilidad y especificidad; segundo: determinar la prevalencia de la infección por *Leishmania spp.* en los perros, para realizar con éxito programas de control y vigilancia epidemiológica ayudando a la disminución de los índices de morbilidad y mortalidad en los niños menores de siete años, quienes son mas susceptibles a desarrollar la enfermedad.

2. MARCO DE REFERENCIA

La leishmaniosis es un grupo de enfermedades ampliamente distribuidas por el mundo causada por parásitos protozoarios pertenecientes al género *Leishmania spp.* (Kinetoplastida: Tripanosomatidae) transmitida por la picadura de pequeños dípteros del género *Lutzomyia spp.* (Díptera: Psychodidae: Phlebotominae) en el nuevo mundo y del género *Phlebotomus spp.* en el viejo mundo. Los flebótomos son conocidos comúnmente en las diferentes regiones de Colombia tales como: Palomilla, aludo, capotilla, chitra, aliblanco, arenilla, pringador, mantablanca, juanblanco, quemador, mosco blanco, chorilo, jején, ya te vi, entre otros (Minsalud, 1994).

La leishmaniosis presenta un amplio rango de manifestaciones clínicas entre las cuales se encuentran: leishmaniosis cutánea que se manifiesta con una gran variedad de lesiones cutáneas de las cuales la mas conocida es úlcera cutánea crónica, que deja en los pacientes una cicatriz característica; leishmaniosis mucosa que causa destrucción de las mucosas de la nariz, boca y laringe; leishmaniosis visceral asociada con la diseminación de la infección a los órganos reticuloendoteliales, puede ser mortal si no se trata a tiempo (Minsalud, 1994). Otros síndromes menos usuales incluyen la leishmaniosis cutánea difusa que producen lesiones nodulares en la piel; la leishmaniosis dérmica post Kala-azar que produce un brote cutáneo generalizado (OMS, 1998) y actualmente un tipo de leishmaniosis cutánea no ulcerativa producida por *Leishmania chagasi* en Costa Rica y Honduras (Neva *et al.*, 1997).

Según la Organización Mundial de la Salud (1998) la leishmaniosis existe en forma endémica en 88 países (21 en el nuevo mundo y 66 en el viejo mundo)

en zonas tropicales y subtropicales. Anualmente se presenta 1.5 – 2.0 millones de casos nuevos en el mundo, de los cuales aproximadamente de 1.0 a 1.5 corresponde a leishmaniosis cutánea y 400.000 a leishmaniosis visceral, lo cual eleva la prevalencia a 12 millones de casos, la población en riesgo a 350 millones de personas y existe un incremento real en el número de personas infectadas. Entre los principales factores que determinan este aumento, se encuentran los cambios ecológicos hechos por el hombre, los demográficos y el desarrollo económico. Esto es más evidente en América tropical debido a la destrucción masiva de la selva primaria, el rápido crecimiento de la población humana, el desarrollo de la agricultura, los asentamientos rurales, los fenómenos de migración y la rápida urbanización mundial que han inducido condiciones que ahora soportan las poblaciones del vector y de los reservorios (Vélez & Agudelo, 1997; OMS, 1998). Durante los últimos 20 años en gran parte de países latinoamericanos se ha presentado una inusitada migración de personas de áreas rurales a urbanas, los nuevos migrantes traen consigo perros, gallinas y cerdos los cuales mantienen alrededor de sus casas. Estas condiciones crean un excelente hábitat para los flebótomos, la densidad de estas especies alrededor de las casas y en refugios animales pueden alcanzar niveles muy altos en esas comunidades, además puede existir la introducción de especies de *Leishmania spp.* en nuevas regiones cuando perros infectados son transportados de áreas endémicas a no endémicas (Tesh, 1995).

En América, Brasil y Venezuela son los países con más casos diagnosticados de leishmaniosis, pero también existe en Paraguay, Argentina, Bolivia, Colombia, Guatemala, México, el Salvador y Guayanas (Casas *et al.*, 1983). En Colombia la leishmaniosis está ampliamente distribuida por la mayor parte del país. Existe un gran foco de leishmaniosis cutánea en la Costa Caribe (Córdoba, Sucre y Bolívar) y otros focos de *L. cutánea* y *L. visceral* localizados en el Valle del río Magdalena, Tolima, Huila,

Santander y Cundinamarca. La mayoría de los casos diagnosticados son de leishmaniosis cutánea, pero la que causa mortalidad es la forma visceral (Vélez & Agudelo, 1997).

La leishmaniosis visceral fue descrita inicialmente en 1903 por Leishman y Donovan, su agente causal fue denominado *Leishmania donovani*. En el mismo año Laveran y Mesnil al examinar el material de Donovan creyeron que el parásito invadía globulos rojos y le dieron el nombre de *Piroplasma donovani* en honor a Donovan, pero Ross, también basado en el estudio del mismo material los separa del género *Piroplasma* y crea un nuevo género *Leishmania* en honor a Leishman, así el parásito queda registrado *Leishmania donovani* (Laveran & Mesnil, 1903; Ross, 1903). Rogers en 1904 logró cultivar el parásito por primera vez observando las formas flageladas, Patton en 1907 reportó que las formas leptomonas se encontraban en el interior de los insectos vectores. Nicolle en 1908 registró que mamíferos incluyendo el perro podrían actuar como reservorios de leishmanias (WHO sitio web, 2003).

En Colombia la leishmaniosis visceral fue reportada por primera vez en 1944 por Gast Galvis en una niña procedente de San Vicente de Chucurí, Santander (Casas *et al.*, 1983). Entre 1960 y 1965 Gómez Vargas describen tres casos procedentes de Lebrija y Piedecuesta Santander. Corredor *et al.* (1969) detectaron un perro infectado naturalmente en Melgar. En 1970 Pérez *et al.* describieron un caso en la Peña Cundinamarca y Cantillo *et al.* (1970) informaron cinco casos procedentes de Melgar y Tocaima Tolima. Robledo y Mejía (1971) detectan un caso en Coyaima Tolima, en 1976 Camacho Sánchez describe tres casos en el corregimiento de la Peña Sucre. Casas *et al.* (1983) reportan dos casos provenientes de la zona rural del valle entre Girón y Piedecuesta, que fueron diagnosticados en 1975 y en 1978. Corredor *et al.* (1980) recopilaron 107 casos reportados hasta este año en

Colombia; entre 1985 y 1990 se registraron 255 casos de los cuales el departamento del Tolima aportó aproximadamente el 41%, cada uno de los departamentos de Córdoba y Sucre el 18% y los departamentos de Bolívar, Cundinamarca y Huila el 6% cada uno (Minsalud, 1994). Desde 1997 a 1999 en Santander, se han informado diez nuevos casos, dos provenientes de Barrancabermeja, siete casos en el municipio de Piedecuesta y un caso en Floridablanca.

La leishmaniosis visceral presenta infecciones sintomáticas o formas subclínicas que pueden ser completamente asintomáticos o mostrar una forma oligosintomática de la enfermedad (D' Oliveira *et al.*, 1997). Cuando la enfermedad progresa, el periodo de tiempo entre la exposición con el vector infectado y la enfermedad sintomática tiene un rango de diez días a 2,8 años; comúnmente el periodo de incubación es de tres a ocho meses (Wilson & Streit, 1996). Generalmente el sitio de la inoculación es inaparente, sin embargo una pequeña papula (leishmanioma) podría formarse en esa zona. El compromiso de la médula ósea lleva a anemia, leucopenia, trombocitopenia y el compromiso hepático ocasiona disminución en la producción de protrombina, que sumada a la disminución en el número de plaquetas provoca hemorragias; hay hipoalbuminemia que se asocia con desnutrición y con edemas (Minsalud, 1994). Los síntomas predominantes son fiebre intermitente, malestar general, enflaquecimiento progresivo, anorexia, palidez y hemorragias. Los signos clínicos habituales incluyen esplenomegalia, hepatomegalia, anemia, microadenopatías y pérdida de peso (Angulo *et al.*, 1998).

De otra parte estudios epidemiológicos indican que los factores de riesgo predisponentes al desarrollo de leishmaniosis visceral son principalmente: ser menor de edad, la desnutrición y posiblemente factores genéticos

(Campos *et al.*, 1983; Lainson, 1983; D' Oliveira *et al.*, 1997; Noyes *et al.*, 1997).

El pico de edad para desarrollar leishmaniosis visceral varía en diferentes regiones geográficas. En África la leishmaniosis visceral afecta a jóvenes adultos mientras que en la india perjudica a niños y jóvenes adultos, en Latinoamérica, la enfermedad ocurre principalmente en niños menores de diez años (Wilson & Streit, 1997) y en Colombia la frecuencia es del 86.5% en menores de cinco años y 6% para mayores de 15 años (Casas *et al.*, 1983).

Respecto a los agentes etiológicos de la leishmaniosis visceral, están agrupados en el complejo donovani, *Leishmania donovani* en la india y África; *Leishmania infantum* en regiones mediterráneas y *Leishmania chagasi* en el nuevo mundo, éstas dos últimas son indistinguibles desde el punto de vista isoenzimático y RFLPs (Berman, 1997).

En cuanto al vector en América se han descrito más de 350 especies del género *Lutzomyia spp.* (Young & Duncan, 1994) y en Colombia 128 especies (Molina, 1998) de las cuales han sido encontradas infectadas naturalmente e incriminadas como vectores de leishmaniosis visceral a *Lutzomyia longipalpis* y a *Lutzomyia evansi* (Vélez & Agudelo, 1997), generalmente en los focos de leishmaniosis visceral la predominancia de *Lutzomyia longipalpis* es del 87-99.9 % sobre las otras especies de *Lutzomyia* (Ferro *et al.*, 1995). En el estado adulto, estos flebótomos son pequeños insectos que miden de 2 a 5 mm de longitud, tienen un periodo de vida en la naturaleza de 20 a 30 días; tanto los machos como las hembras se alimentan de los jugos y sustancias azucaradas de las plantas, además las hembras son hematófagas y se alimentan de la sangre de una variedad de vertebrados entre los que se incluyen el hombre, animales silvestres y domésticos como zorros, perezosos, marsupiales, osos hormigueros, equinos, cerdos, perros, y aves

de corral (Morrison *et al.*, 1995). Para el caso de la leishmaniosis visceral el perro se considera como el principal reservorio doméstico, aunque también se han incriminado al asno y el caballo (WHO sitio web, 2003), los principales reservorios silvestres son cánidos como *Cerdocyon thous* (zorro) (Dedet, 1993; Almeida *et al.*, 1996) y marsupiales como el *Didelphis marsupialis* (chucha o zarigüeya) considerado como un reservorio en Colombia (CIDEIM, 1996).

Desde el primer perro infectado descubierto por Pedroso (1913) en Brasil, estos animales han sido encontrados con la enfermedad en muchas áreas endémicas. En España, la prevalencia de la leishmaniosis canina en la comunidad de Cataluña es de 18% (Portus *et al.*, 1987); en otros países europeos mediterráneos como en Italia la prevalencia es del 14.4% (Brandonisio *et al.*, 1992); en Francia en los Alpes marítimos las prevalencias encontradas varían de 3.2 al 17.1% (Jambou *et al.*, 1986). Falqueto (1983) reportó en Viana Brasil, una prevalencia del 16.9%, Canese *et al.* (2002) un 32% en Paraguay y Delgado *et al.* (1998) encontró una prevalencia de 5.6% en Venezuela. En Colombia actualmente se están realizando trabajos en leishmaniosis caninas, pero no se han reportado prevalencias para *L. visceral*.

Las manifestaciones clínicas de la leishmaniosis visceral canina incluyen pérdida de peso, somnolencias, anorexia, diarrea, vómito, estornudo, tos y debilidad muscular. Entre las afecciones viscerales más frecuentes se encuentra la pérdida de pelo, atrofia muscular, algunos perros presentan pérdida de peso a pesar de su apetito voraz y el déficit grave de la condición física se asocia con anorexia y otros signos de insuficiencia renal, depresión mental, poliuria, polidipsia y vómito. La disminución de la actividad física esta asociada con trastornos en la locomoción, neuralgia, poliartritis, polimiositis, hendidura en cojines plantares, úlceras interdigitales o lesiones osteolíticas y

periostitis proliferativa. La temperatura corporal a veces fluctúa pero casi siempre es normal (Acha & Szyfres, 1992). Además pueden presentar lesiones cutáneas como úlceras, heridas que no cicatrizan, piel seca, caspa depilaciones alrededor de los ojos, hemorragias nasales, inflamación de ganglios linfáticos, hígado y bazo (Mem. do Oswaldo Cruz *on line*).

Cuando se hace un estudio serológico en la población, se destaca que mas de un 50% de todos los perros seropositivos son asintomáticos (Jambou, 1986; Abranches *et al.*, 1991; Brandonisio, 1992) y a pesar de esto presentan respuesta inmune celular (Cabral & O' Grady, 1993). Se ha podido demostrar que la capacidad de infectar flebótomos es idéntica en los perros asintomáticos y en los sintomáticos (Molina *et al.*, 1994), por tanto, desde el punto de vista epidemiológico hay que considerar a estos perros como auténticos portadores. El problema práctico está en la decisión a tomar ante un perro con leishmaniosis: sacrificio o tratamiento. La OMS recomienda el sacrificio de perros con leishmaniosis como medida de control, sin embargo, esta medida no es práctica si se tiene en cuenta que los perros asintomáticos no están bajo sospecha y la falta de una técnica rápida y efectiva que confirme la infección.

El diagnóstico de la enfermedad puede ser: Parasitológico, mediante la visualización de amastigotes en frotis de material obtenido por punción de bazo, hígado, medula ósea, ganglios linfáticos, sangre, piel o mediante técnicas de cultivo, esto hace un diagnóstico definitivo (Casas *et al.*, 1983; Sundar *et al.*, 1988); serológico, mediante la utilización de inmunofluorescencia indirecta (IFI), Test de aglutinación directa (DAT) o ELISA (Harith *et al.*, 1987). La información concerniente a la infección y seroconversión es limitada para leishmaniosis canina, Slappendel (1988) reportó que un 20% de los perros con parásitos confirmados fueron seronegativos por IFI. Dye *et al.* 1992 en un estudio de perros centinelas

sugieren que la máxima sensibilidad para IFI es del 80%. Abranches *et al.* En 1991 confirmó infección en sólo el 48.2% de perros con títulos significativos y sólo el 16.7% de los perros con títulos moderados. Lanotte (1975) y Abranches (1991) no encontraron correlación entre el título de anticuerpos y la gravedad de la enfermedad, además, sugieren que la serología no puede ser un indicador de la infección. Rioux y colaboradores encontraron que muchos de los perros seropositivos son asintomáticos y Cabral en 1992 demostró la existencia de respuesta inmune celular específica para *Leishmania spp.* en perros seronegativos (Rioux *et al.*, 1985)

La prueba de inmunofluorescencia indirecta (Duxbury & Sadun, 1964) es una técnica en la cual, promastigotes de *Leishmania spp.* son previamente fijados para la identificación de inmunoglobulinas específicas (anticuerpos de la clase IgG), presentes en el suero del perro; estas se adhieren a la membrana del parásito donde se detectan por medio de un conjugado (anti-IgG) marcado con isotiocianato de fluoresceína. La reacción se lee al microscopio de fluorescencia y se define el título como la última dilución del suero a la cual se le observa fluorescencia (color verde manzana) en toda la periferia de los promastigotes. La reacción es negativa cuando el parásito se observa completamente rojo.

Para la detección de parásitos de *Leishmania spp.* se ha utilizado la tecnología del ADN usando el ADN nuclear y el ADN del kinetoplasto (kDNA) se han desarrollado pruebas que permiten diferenciar especies, secuencias blanco han sido reportadas por Wirth & Pratt (1983); Lopes *et.al.* (1984); Lopes & Wirth (1986); Wirth *et.al.* (1986); Rodgers *et.al.* (1990); Howard *et. al.* (1991); Uliana *et. al.* (1994). Una desventaja en estas pruebas es el uso de *sets* de iniciadores y reacciones específicas para cada parásito o especie en particular; el uso de múltiples PCR incrementan sustancialmente el costo y dificulta el análisis. La PCR Multiplex es un método en el cual se usa una

mezcla de *sets* de iniciadores, cada uno de éstos es específico para el ADN de un organismo particular. Teóricamente se podría sobrellevar éstos problemas y permitir la detección de los múltiples agentes etiológicos en algunos pacientes, animales o insectos con un simple ensayo.

Ashford *et al.* en 1995, compararon la PCR con serología para detectar leishmaniosis visceral canina; cuando usaron PCR como una definición de infección determinaron la sensibilidad de la serología en 63% y la especificidad de 68%; cuando definieron la infección como cultivo / hámster positivo, la sensibilidad de la serología fue de 81%. Todos los perros que fueron positivos por cultivo o por inoculación de hámster fueron positivos por PCR mostrando una sensibilidad del 100% y todos los perros del centro de investigaciones de la universidad de Harvard que no habían estado en contacto con el parásito fueron negativos, revelando una especificidad del 100%.

Los genes del mini-exon de los protozoarios tripanosomatidos presentan un buen blanco para la detección e identificación en los ensayos de PCR, éstos genes están ausentes en los reservorios vertebrados y en los vectores invertebrados pero están presentes como múltiples repeticiones en *tandem* en los genomas del parásito, cada repetición contiene una secuencia exon altamente conservada de 39 nucleótidos (nt), una secuencia intron transcrita moderadamente variable de 55 a 101 nt y otra altamente variable de 205 a 1350 nt no transcrita de la región intergénica (Ramos *et al.* 1996). La longitud y la secuencia de nucleótidos de las repeticiones del mini-exon sirven para diferenciar la variación entre los diferentes grupos de *Leishmania spp.* (Hassan *et.al.*, 1993; Fernandes *et.al.*, 1994). Recientemente Ken Katakura y colaboradores en 1998 utilizaron un nested PCR que utiliza como blanco el gen del miniexón (para identificar especies de *Leishmania*) arrojando excelentes resultados.

Se han usado diferentes iniciadores para detectar *Leishmania donovani* de muestras humanas (Smyth *et al.*, 1992); e iniciadores que dirigen la amplificación de la región conservada, con los cuales se han detectado las especies de *Leishmania*. (Rodgers *et al.*, 1990; Ashford *et al.*, 1985). En los últimos años, Costa *et al.* (2000) utilizó una PCR basada en la detección del kADN en especímenes de sangre venosa y médula ósea de sintomáticos y asintomáticos, demostrando una gran sensibilidad. La tecnología de PCR aplicada al diagnóstico de leishmaniosis visceral, cada día ofrece mejores resultados y nuevas alternativas (Quinnell *et al.*, 2001; Campbell, 2000)

3. OBJETIVOS

3.1. GENERAL

Determinar la prevalencia de infección por *L. chagasi* en la población canina (LVC) de la vereda Guatiguará de Piedecuesta, Santander, mediante pruebas serológicas y moleculares.

3.2. ESPECÍFICOS:

- Establecer el protocolo para la PCR multiplex con los iniciadores que amplifican la multicopia del gen SL RNA (miniexon).
- Establecer el protocolo para la PCR nested con los iniciadores que amplifican el gen del miniexon.
- Establecer la prueba de inmunofluorescencia indirecta como método serológico para diagnosticar LVC
- Comparar la sensibilidad de las pruebas en las diferentes presentaciones clínicas de la enfermedad en perros.
- Determinar la prevalencia de la infección por *L. chagasi* mediante las pruebas de PCR e IFI.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 AREA DE ESTUDIO

El área geográfica de la población de estudio es de aproximadamente 20 kilómetros cuadrados, está ubicada en la vereda Guatiguará (Figura 1), municipio de Piedecuesta, departamento de Santander a una latitud $07^{\circ}00'00''\text{N}$ y longitud $73^{\circ}05'20''\text{W}$. Está dividida en tres zonas: Nueva Colombia (NC), Altos de Guatiguará (AG) y Bajos de Guatiguará (BG).

Figura 1. Panorámica de la vereda Guatiguará. Fotografía Junny Martínez



Está ubicada en el costado norte del valle entre Piedecuesta y la vereda Palo gordo (Girón), sobre la ladera sur de la mesa de Ruitoque. El terreno es montañoso, quebrado y pedregoso, de clima cálido, caracterizado como un bosque seco tropical (bs-T) (Espinal, 1991) con humedad relativa del 85%,

pluviosidad media anual de 1.770 mm, temperatura media anual de 22.6°C (IDEAM, 2000) y una altitud de 965 -1091 msnm. En la zona baja del valle la vegetación es relativamente abundante con presencia de monocultivos de caña de azúcar y pasto para forraje de ganado. En Altos de Guatiguará se forman parcelas donde se cultiva piña, yuca y maracuyá, en mayor o menor grado; en la zona NC donde se concentra la mayor parte de la población, la vegetación es escasa, excepto en los alrededores donde todavía se presenta vegetación nativa pertenecientes a las familias Asteraceae, Cyperaceae, Euphorbiaceae, Ericaceae y Poaceae entre otras.

La vereda se encuentra en el costado nor-oriental de Piedecuesta y tiene dos vías de acceso: a través de Piedecuesta y de Ruitoque. Según el censo realizado por la secretaría de salud en mayo del 2000, hay una población de 2019 habitantes, 242 niños menores de 7 años y 392 perros.

4.2 POBLACIÓN ANIMAL

De los 392 perros reportados en el área de estudio, 123 fueron llevados por sus propietarios, atendiendo el llamado que se les hizo a los habitantes para participar en la jornada de toma de muestras, después de realizar un trabajo social en el que se dio a conocer la enfermedad y la importancia del perro en el ciclo de transmisión. El veterinario les realizó un examen clínico para identificar signos y síntomas característicos de la enfermedad como: desnutrición, lesiones ulcerativas o descamativas, uñas largas, zonas alopécicas de la piel y se les llenó una historia clínica (ver anexo). De estos 123, se tomaron 100 perros, los cuales tenían las muestras completas para las pruebas serológicas y moleculares.

Figura 2. Registro de los perros que participaron en la toma de muestra. Los propietarios proporcionaron los datos requeridos para el estudio. Fotografía: Luis Alberto Cortes.



Un perro se consideró en buen estado si estaba bien alimentado, sin signos de enflaquecimiento; su piel y su pelaje se observaban sanos, brillantes; su dentadura completa y/o en buenas condiciones, sin pulgas, sarna o garrapatas. Con estado general regular se consideraron aquellos perros que presentaban signos de enflaquecimiento, con algunas lesiones en la piel, mostraban síntomas de fatiga o cansancio y finalmente un perro en mal estado evidenciaba su desnutrición, la piel presentaba lesiones grandes, alopecia y presencia de ectoparásitos (pulgas, ácaros), carecían de dientes o estaban partidos y desgastados (www.vetmed.wisc.edu)

Figura 3. Examen clínico que se le realizó a cada uno de los perros. En la fotografía se observa como se tomó la temperatura corporal. Fotografía: Luis Alberto Cortes.



4.3 MUESTRAS BIOLÓGICAS

4.3.1 Directos A todos los caninos se les hizo un frotis de aposición de cortes en orejas; A los que presentaron lesiones en la piel se les hizo raspado. Estas muestras fueron teñidas con la coloración de Giemsa y examinadas microscópicamente en 100x con aceite de inmersión para detectar amastigotes de *Leishmania spp*

4.3.2 Muestras de sangre Se tomaron dos muestras de sangre de la vena radial a todos los perros. La primera se tomó en un tubo al vacío con capacidad para 5ml sin anticoagulante, las muestras fueron centrifugadas a 3000 rpm durante 20 minutos, se tomó cuidadosamente el suero y se alicuotó en dos tubos eppendorf codificados; luego fueron almacenados a - 20 °C hasta el momento de su procesamiento por la prueba serológica.

La segunda muestra se tomó en un tubo al vacío de 5 ml con anticoagulante EDTA, esta sangre se mezcló con una proporción 1:1 de 6M HCl Guanidina-0.2M EDTA (pH8) en tubos de polipropileno y guardados a temperatura ambiente mínimo 15 días hasta su uso en la PCR.

Figura 4. Toma de las muestras de sangre de los perros. La sangre se tomó de la vena radial, en las extremidades superiores. Fotografía: Luis Alberto Cortes



4.3.3 Extracción de ADN Las muestras lisadas con HCl Guanidina- EDTA, fueron calentadas por 10 minutos con agua en ebullición para desnaturalizar el DNA concatenado del minicírculo del kDNA, luego se tomaron 200µl de sangre y se agregaron 6µg/µl de proteinasa k; se almacenó a 37 °C toda la noche ó a 65 °C durante dos horas. Se calentó la muestra en ebullición 10 minutos para inactivar la enzima y luego se procedió con el protocolo de extracción, por el método de Fenol Cloroformo. (Sambrook *et al.*, 1998) estandarizado por el CINTROP y se realizó la cuantificación de ADN por el método Dot Spot (ver anexo).

Para evitar la contaminación entre las muestras se realizaron máximo cuatro extracciones por día, incluyendo el control negativo y el control positivo en cada proceso de extracción.

4.4 ESTANDARIZACIÓN DE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

4.4.1 PCR multiplex Se estandarizó la técnica según Harris *et al.*, 1998. Se utilizaron los iniciadores que amplifican el *spliced leader* (SL) RNA mini-exón:

LU-5 A 5' TTTATTGGTATGCGAAACTTC 3'

LB-3C 5' CGTC/GCCGAACCCCGTGTC 3'

LM-3A 5' GCACCGCACCGGA/GCCAC 3'

LC-3L 5' GCCCGCGC/TGTCACCACCAT 3'.

- **Mezcla de reacción** Para la estandarización de la PCR, la mezcla de reacción no estuvo restringida a un protocolo definido; los ensayos dependían de los resultados obtenidos que además, se alternaban con los cambios de temperaturas y número de ciclos, para esto se ensayaron diferentes concentraciones

Tabla 1. Concentraciones ensayadas en la estandarización de la mezcla de reacción para la PCR multiplex

Reactivo	Concentración
dNTPs	0.1mM; 0.2mM; 0.25mM
MgCl ₂	1.5mM; 2.0mM; 2.5mM
Iniciadores	0.2mM; 0.4mM; 0.6mM
Taq DNA polimerasa	0.5 - 2.5 U (Promega Corporation, Madison, USA)
Buffer: 10X	1X
DMS	5% - 10%
DTT	5% - 10%

Realizados los ensayos, después de éxitos y fracasos se determinaron las concentraciones utilizadas para el diagnóstico de Leishmaniosis visceral en perros, en un volumen final de 20 μ l.

Se hicieron ensayos para corroborar la correcta amplificación de los iniciadores; se realizaron varias mezclas de reacción agregando a todas el iniciador común LU-5 A y a cada mezcla un iniciador diferente; como muestra se agregó ADN de cepa de *L. braziliensis*, aislada de un paciente confirmado con L. cutánea (6110401); de *L.chagasi* aislada de un paciente con L.V (LV060900GU) y un ADN de una cepa aislada de una lesión mucosa (6190601)

▪ **Amplificación** La amplificación se realizó en un termociclador *minicycler*™ PTC-150 programado con diferentes temperaturas, tiempos y ciclos necesarios para obtener éxito en los resultados. Tomando como referencia los ensayos realizados por Harris *et al.* (1998), se hicieron modificaciones principalmente en la temperatura de alineamiento, se probaron temperaturas de 54°C, 58°C, 60°C y 64°C; en los ciclos de amplificación se programaron 30, 35 y 40 ciclos.

4.4.2 PCR nested Se utilizaron los iniciadores que amplifican el gen del mini exon (Katakura *et al.*, 1998) los cuales se utilizaron en el nested PCR:

S-1629 5' GGAATTCAATAT/AAGTACAGAACTG3'
S-1630 5' GGAAGCTTCTGTACTT/ATATTGGTA3'
MIN-S1 5' GGTATGCGAACTTCCGGA/GA3'
MEX-A1 5' GGTATACTTATATAGCGTTAG3'

▪ **Mezcla de reacción** Esta PCR consta de dos mezclas de reacción. La primera es una PCR primaria que contiene todos los componentes de la PCR con sus respectivas concentraciones y una nested PCR que utiliza el

producto amplificado de la primera como ADN. Para estandarizar éstas mezclas de reacción se trabajó según Katakura *et al.* 1998 probando diferentes concentraciones así:

Tabla 2. Concentraciones ensayadas en la estandarización de la mezcla de reacción para la PCR nested

Reactivos	Concentración
dNTPs	0.1mM; 0.2mM; 0.3mM;
MgCl ₂	1.2mM; 1.5mM; 2.0mM
Iniciadores	0.2mM; 0.4mM
Taq DNA polimerasa	0.5 - 2.5 U (Promega Corporation, Madison, USA)
Buffer: 10x	1x
DMS	5% - 10%
DTT	5% - 10%

▪ **Amplificación** La amplificación se realizó en un termociclador *minicycler*™ PTC-150 programado con diferentes temperaturas, tiempos y ciclos según Katakura *et.al.* 1998. Variando las condiciones hasta una óptima amplificación.

4.4.3 Controles Se tomaron cepas de *Leishmania* aisladas de un paciente confirmado con L. visceral del foco (LV060900GU), para evaluar los primers. El control positivo fue la sangre de perro infectada artificialmente con *Leishmania spp.* y un perro infectado naturalmente de la vereda Guatiguará. El control negativo fue la sangre de un perro sano que nunca estuvo en área endémica para leishmaniosis visceral. Para controlar la eventual contaminación en la mezcla de reacción de la PCR, el control de reacción contiene todos los componentes de la mezcla de reacción sin el DNA de la muestra.

4.4.4 Sensibilidad y especificidad Para determinar la sensibilidad de los iniciadores se realizaron soluciones de ADN de la cepa aislada del foco a diferentes concentraciones. Promastigotes de *Leishmania spp.* en medio RPMI, se lavaron con 3ml de PBS y se centrifugaron a 3000 rpm por 20 minutos; después de descartar el sobrenadante se le agregó al botón 1 ml de PBS; se hicieron las diluciones: 1/10; 1/100; 1/1000 y se contaron los parásitos en la cámara de Neubauer. Se infectó sangre con 10, 100, 1.000 hasta 1.000.000 de parásitos para hacerle la extracción del ADN y amplificarlas.

La especificidad se corroboró con el ADN del perro sin infección con *Leishmania spp.* y con el ADN de otros parásitos como *Trypanosoma cruzi*. Para el caso del multiplex PCR Se amplificó ADN de *Leishmania panamensis* (Cepa aislada de una lesión cutánea de un paciente confirmado y tratado por leishmaniosis cutánea (6110401) perteneciente al complejo *braziliensis*.

4.4.5 Electroforesis Para la detección del producto amplificado se realizó la electroforesis en gel de poliacrilamida 6%. Se prepara la solución de trabajo, mezclando 5 ml de TBE 1X y 1.2 ml de acrilamida, luego se adicionan simultáneamente 40 µl de Persulfato de amonio 10% y 7 µl de TEMED. La solución de trabajo se debe agregar inmediatamente en la cámara de electroforesis, se deja polimerizar por 20 minutos. Los pozos del gel se lavan con agua destilada y buffer TBE 1X. En la cámara de electroforesis se adiciona en la parte superior y en la inferior buffer TBE 1X. Se ubica el minigel en la cámara, se siembran 6 µl de muestra por pozo, el marcador de peso molecular y se corre a 60 voltios por una hora y media.

Para la coloración del gel de poliacrilamida, se coloca primero en la solución fijadora (150 ml ddH₂O, 18 ml etanol absoluto y 2 ml ácido acético) por 10 minutos. Luego se retira de la solución fijadora y se adiciona la solución de

plata (50 ml ddH₂O, 25 ml de solución fijadora y 0.18 gr AgNO₃) por 10 minutos. Se limpia cuidadosamente y se adiciona la solución reveladora (150 ml ddH₂O, 4.5 gr de NaOH y 1.0 ml de formaldehído) hasta que aparezcan las bandas y nuevamente se pasa a la solución fijadora.

4.5 ESTANDARIZACIÓN DE LA INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA (IFI)

4.5.1 Antígeno El antígeno se preparó utilizando el protocolo estandarizado en el CINTROP-UIS (ver anexo). Se emplearon promastigotes de *Leishmania spp.* en fase exponencial, en medio RPMI libres de contaminación bacteriana y fúngica. Esta cepa fue aislada de un paciente confirmado con LV del área de estudio (LVO6O900GU).

4.5.2 controles El control negativo fue un suero de perro que nunca estuvo en área endémica para leishmaniosis visceral. El control positivo fue el suero de un perro positivo por las pruebas PCR y ELISA de la vereda Guatiguará y sueros confirmados como positivos en otros centros de referencia. Para la estandarización se realizaron diluciones de los sueros de 1:2 hasta 1:4096.

4.5.3 Conjugado Se utilizó como conjugado el anti-anticuerpo ANTI-DOG IgG (molécula total) marcado con isotiocianato de fluoresceína desarrollado en conejo (SIGMA), mantenido en alícuotas a -20°C, de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

- **Titulación del conjugado** Para la preparación del conjugado se calculó el número de pozos totales, cada placa tenía 18 pozos y en cada uno se agregaron 15 µl del conjugado, así:

Número de placas x Número de pozos x 15µl conjugado. Por ejemplo, para preparar 450µl a una concentración de Azul de Evans 1:500 a partir de 1/100 se utilizó:

$$V1C1 = V2C2$$

$$V1 * 1/100 = 450 * 1/500$$

$$V1 = 450/5$$

$$V1 = 90\mu\text{l AE } 1\%$$

90µl AE 1% + 360 PBS pH 7.2.

Para un conjugado 1:150 a ésta mezcla se le saca el volumen que se agrega de conjugado, en este caso: $450/150 = 3.0\mu\text{l}$

4.5.4 Estandarización de la técnica Se estandarizó la técnica en perros tomando como referencia el trabajo de Silva *et al.* (2001) y el protocolo Duxbury & Sadun (1964) para humanos modificado por el CINTROP.

Se tomó 1:8 como corte, según esto el criterio de positividad de las muestras que se adoptó fue que por lo menos la mitad de los parásitos presenten una fluorescencia verde brillante evidente de toda la superficie o de todo el contorno (Canese *et al.*, 2002).

Se realizaron ensayos utilizando varias concentraciones de Azul de Evans 1%

1:750 1:3000

1:1000 1:4000

1:1500 1:5000

1:2000

Además se probaron varias concentraciones del conjugado con las diluciones de AE 1% que presentaron los mejores resultados:

1:50	1:200
1:100	1:250
1:150	1:300

A medida que se realizaban los ensayos se probaron los tiempos de incubación de 30, 45 minutos y 1 hora; además de los tiempos de lavado en PBS y en agua destilada.

4.6 PREVALENCIA DE LA INFECCIÓN

Se determinó la prevalencia de la infección en la vereda Guatiguará mediante la proporción de perros positivos con cada una de las técnicas, sobre el total de perros examinados así:

$$\text{Prevalencia} = \frac{\text{Perros positivos}}{\text{No total perros examinados}} \times 100$$

En la prueba serológica (IFI) se midieron los niveles de anticuerpos para *Leishmania* y en las moleculares se demostró la presencia del parásito evidenciando su ADN.

4.7 ANALISIS ESTADÍSTICO

Los datos se tabularon en el programa SPSS (*Statistical Package for Social Studies*) versión 11.0 y se utilizó STATISTIX (Windows) para la estadística descriptiva.

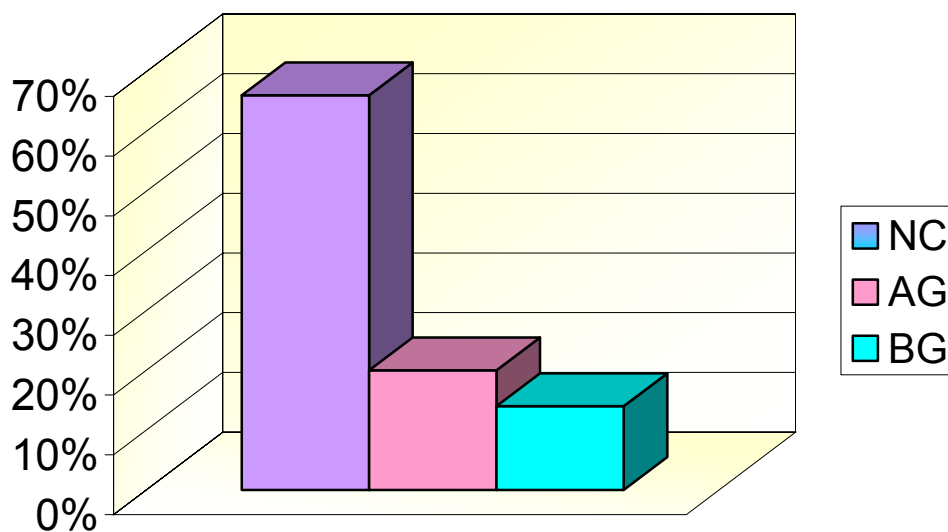
La relación entre las pruebas serológicas y moleculares, las prevalencias según edad, sector, sexo y raza se determinaron mediante un Chi cuadrado (X^2) con un nivel de significancia de 0.005. Las correlaciones entre los signos clínicos y la positividad de las pruebas se calcularon por el índice de correlación de Spearman.

5. RESULTADOS

5.1 CARACTERISTICAS DE LA POBLACIÓN CANINA

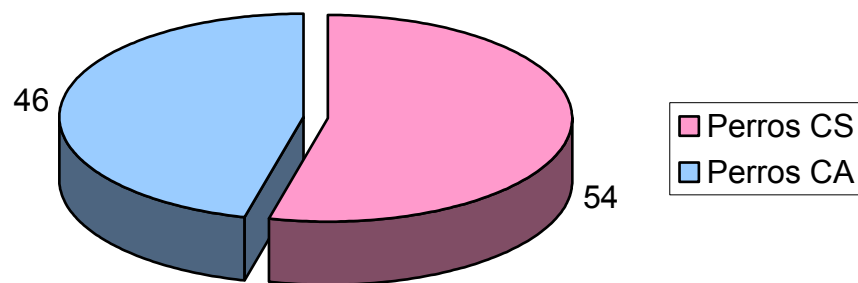
Se analizó el 25.5% (100/392) de la población canina total de la vereda Guatiguará. De éstos el 52% fueron machos y el 48% hembras. La distribución por edad, muestra una media de 19 meses, aunque más de la mitad de la población (58%) tenían edades inferiores a un año. La mayoría de la población correspondía a Nueva Colombia con el 66% seguido de Altos de Guatiguará con 20% y por último Bajos de Guatiguará (Figura5). Se encontraron razas como Pastor Alemán, Boxer, French-Poodle, Doberman y Pitbull, y los mestizos que constituían el 74%.

Figura 5. Porcentajes de perros encontrados en la vereda Guatiguará de acuerdo al lugar de procedencia. NC, Nueva Colombia; AG, Altos de Guatiguará; BG, Bajos de Guatiguará.



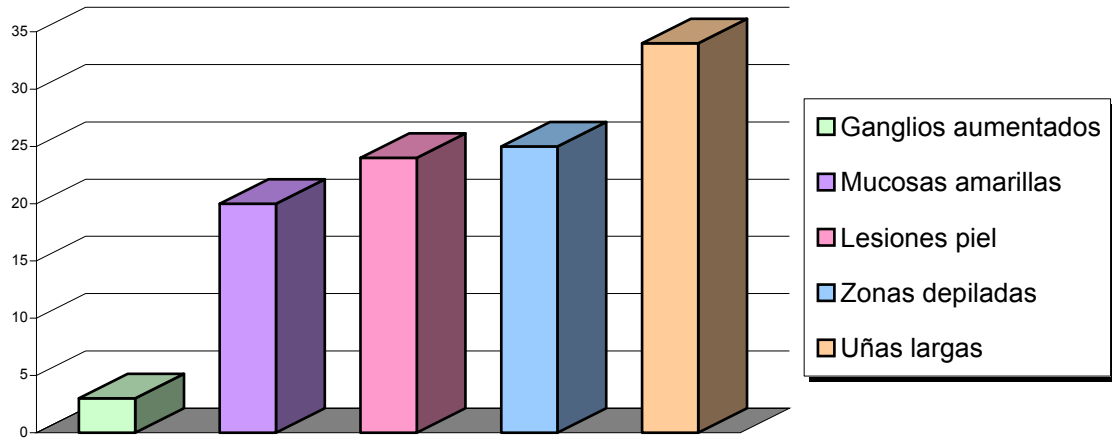
Después de realizar el examen clínico en el que se identificaron signos y síntomas de Leishmaniosis visceral, se observó que el 54% de los perros son clínicamente sintomáticos (Figura 6). El 34 % presentó un estado general bueno; el 57% regular y finalmente el 9% se encontraba en pésimas condiciones, acompañados de de pulgas, garrapatas, ácaros y sarna.

Figura 6. Porcentaje de perros clínicamente sintomáticos y asintomáticos encontrados en la vereda Guatiguará



La figura 7 muestra los signos clínicos más frecuentes, además de la frecuencia cardíaca que fue normal en el 91% de los perros examinados; sólo en el 7% se detectó disritmia cardíaca. La frecuencia respiratoria y el sistema digestivo se consideraron normales, ruidos respiratorios y heces diarreicas se presentaron muy esporádicamente (3%).

Figura 7. 1. Signos clínicos más frecuentes entre la población canina de la vereda. 2. **a**, uñas largas (onicogrifos). **b**, Lesiones en la piel (dermatitis). **c**, zonas depiladas (alopecia). **d** enflaquecimiento



Fuente. www.vetmed.wisc.edu/pbs/zoonoses.html

De acuerdo al concepto de algunos habitantes, la causa más frecuente de muerte entre los perros fue el envenenamiento, aunque muchos afirmaban desconocer dichas causas. También se presentaron muertes por parvovirus, moquillo, asma y un pequeño grupo nació muerto. Se encontró un tiempo de permanencia en la región hasta de dos años en el 69%, pero sólo el 31% de los perros han permanecido siempre en la región. En la infección leishmaniásica, más que la edad del perro su tiempo de residencia en la región es el mejor indicador de exposición a la infección por *Leishmania chagasi*.

5.3 ESTANDARIZACION DE LA PCR MULTIPLEX

5.2.1 Iniciadores Los iniciadores presentaban de 17 a 21 pares de bases (pb) y un alto contenido de enlaces G-C, obteniendo una temperatura de alineamiento entre 54°C y 66°C. En la mezcla de reacción, inicialmente se utilizaron 0.4µM del iniciador LU-5A y 0.2µM de los iniciadores restantes, estas cantidades fueron sugeridas por los autores; al aumentar la concentración de éstos, en la amplificación se evidenciaron bandas parásitas que podrían atribuirse a la elevada concentración de iniciadores o a la baja temperatura de alineamiento utilizada.

5.2.12 dNTPs Las concentraciones de dNTPs se ensayaron combinadas con el cloruro de magnesio (MgCl₂). En la primera mezcla las concentraciones de cloruro de magnesio eran constantes (1.5 mM) mientras las concentraciones de dNTPs se incrementaban entre 0.1mM y 0.3mM. Los mejores resultados se obtuvieron con 0.2mM de cada dNTPs (dATP, dCTP, dGTP y dTTP). Con concentraciones mas bajas se logró amplificación pero se redujo considerablemente el producto.

5.2.13 **MgCl₂** En la segunda mezcla las concentraciones de dNTPs se mantuvieron constantes (0.2mM) y se incrementaba gradualmente el cloruro de magnesio de 1.5 mM a 3.0 mM. La amplificación fue específica y el producto se evidenció intensamente con 1.5 mM.

5.2.14 **Buffers- aditivos** Se comparó la reacción al agregar cloruro de potasio (KCl) más el buffer 1X con la mezcla que contenía 10% de DMS. La segunda opción mostró una gran eficiencia en la amplificación, aumentó la cantidad del producto y la especificidad. También se experimentó con DTT 1 mM pero éste aumentó el bandeo inespecífico.

5.2.15 **Cantidad de ADN** Se ensayaron cantidades de ADN entre 8 ng/20µl y 32.5 ng/20µl en la mezcla de reacción, produciéndose amplificación, al probar con cantidades menores a 4 ng/20µl algunos productos no se hicieron evidentes.

5.2.16 **Cantidad de Taq ADN Polimerasa** Se probaron diferentes concentraciones de Taq ADN Polimerasa (Promega), la más eficiente fue de 2U/20µl de mezcla de reacción. Además se trabajó con Taq ADN Polimerasa (Gibco), ésta, a pesar que produjo amplificación, el producto no fue tan visible y claro como en la Taq de Promega.

5.2.17 **Mezcla de reacción estandarizada** Se determinaron las concentraciones que se utilizaron en las mezclas de reacción para el diagnóstico de L. visceral canina, como se muestra en la tabla 3.

Tabla 3. Reactivos utilizados en la mezcla de reacción para la PCR multiplex. Las concentraciones se presentan para un volumen final de 20µl.

REACTIVOS	CONCENTRACIÓN	VOLUMEN(µl)
dNTPs	0.2 mM	4
MgCl ₂	1.5mM	1.2
Buffer 10x	1x.	2
DMS	10%	2
LU-5 A	0.4 mM	0.4
LB-3C	0.2mM	0.2
LM-3A	0.2mM	0.2
LC-3L	0.2mM	0.2
Taq DNA pol	2.0 u.	0.4
H ₂ O dd	-	5.4
ADN	-	4
Aceite mineral	-	20

5.2.18 **Condiciones de amplificación (Ciclos y temperaturas)** En la programación de ciclos y temperaturas a 54°C, se presentaba mucho bandeo inespecífico (Tabla 4). Se probaron entonces temperaturas de 54°C 58°C, 60°C, 62°C y 64°C, (figura 8) teniendo presente el porcentaje G-C y la longitud de los iniciadores. Con temperaturas inferiores a 60°C hubo un aumento visible en el producto, pero aparecieron algunas bandas inespecíficas. A temperaturas superiores decrece la amplificación y en algunas ocasiones no hubo producto.

Figura 8. PCR multiplex. Amplificación de controles positivos en los que se muestran las diferencias en las temperaturas de alineamiento. **Línea 6** Marcador 100 pb. **Líneas 1–3** 54°C. **Líneas 4-5 y 7** 64°C. **Línea 8** 62 °C. **Línea 9** Control de reacción. **Línea 10** Control negativo. **Línea 11** 58°C.

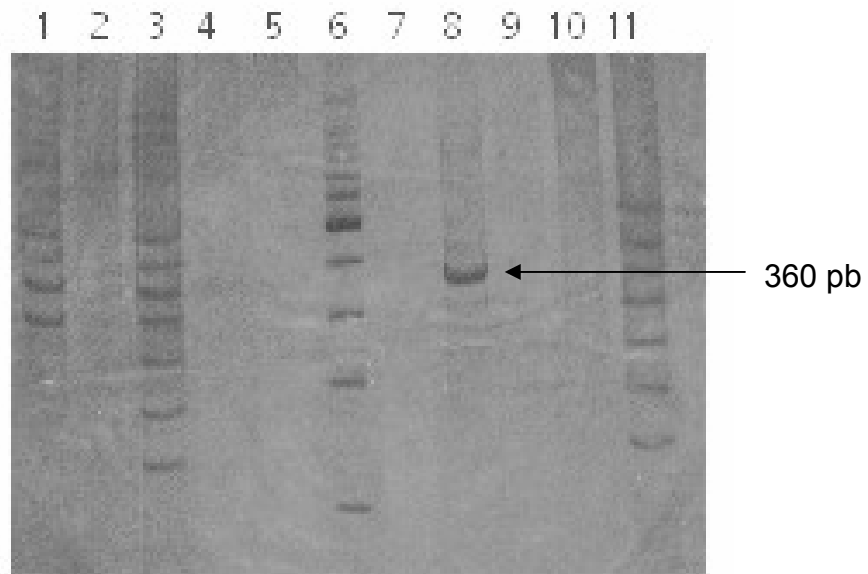


Tabla 4. Programas de amplificación de *Leishmania spp.* para la PCR multiplex

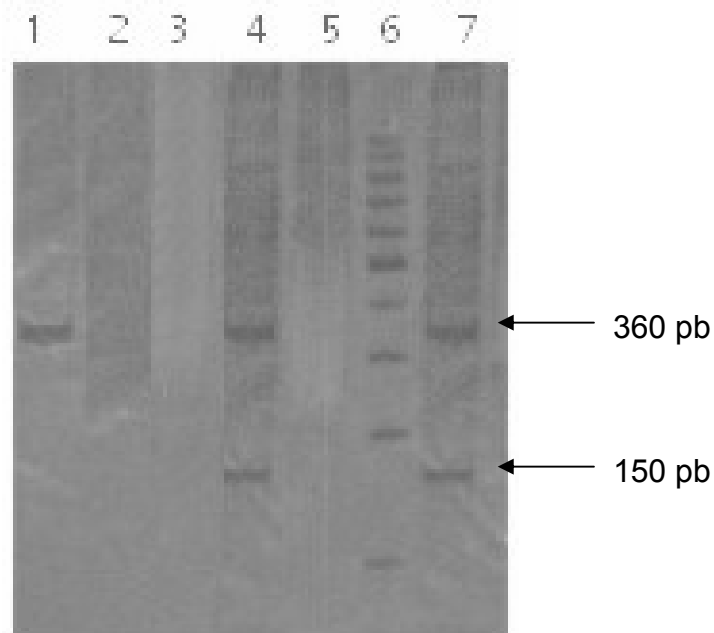
ETAPA	TEMPERATURA	TIEMPO
Desnaturalización	95°C	5 min
35 ciclos		
Desnaturalización	95°C	30 seg
Alineamiento	60°C	45 seg
Polimerización	72°C	30 seg
Extensión final	72°C	5 min

En ésta PCR multiplex los productos esperados son:

Complejo *L. Donovanii* 351 – 397 pb
 Complejo *L. Mexicana* 218 – 240 pb
 Complejo *L. Braziliensis* 146 – 149 pb

Terminada la estandarización, se probó la correcta amplificación de los iniciadores de la reacción múltiple, mezclando cepas de *L.chagasi* (LV060900GU) y *L. panamensis* (6110401). Al realizar la mezcla de reacción con un par de iniciadores específicos para cada complejo, no hubo amplificación; ésta sólo se produjo con la mezcla de los cuatro iniciadores, evidenciando una banda de aproximadamente 150 pb para el complejo *L.braziliensis* y otra de 360 pb que corresponde al complejo *L.donovani*. (Figura 9).

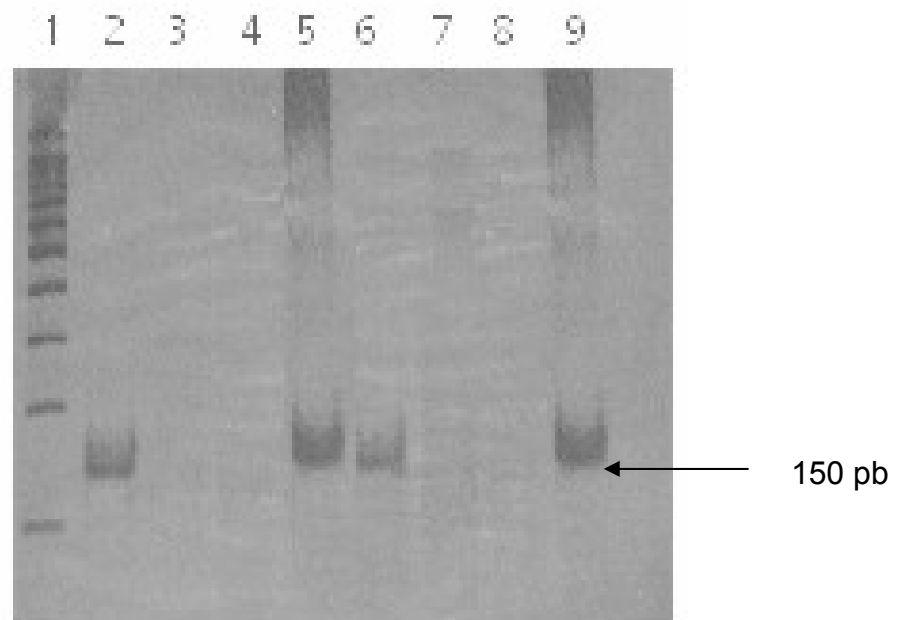
Figura 9. Especificidad de los iniciadores de PCR multiplex LB-3C y LC-3L entre las especies *L. panamensis* y *L. chagasi*. **Línea 6** Marcador 100 pb. **Línea 1** Control positivo (cepa *L. chagasi*). **Línea 2** control negativo. **Línea 3** Control de reacción. **Líneas 4 y 7** Mezcla de *L. panamensis* y *L. chagasi*. **Línea 5** Control positivo amplificado con el iniciador LC-3L.



5.2.19 Especificidad de la PCR La especificidad entre especies se evaluó con cepas de *Leishmania spp.* de diferentes complejos, además de dos cepas de *Trypanosoma spp.* La figura 10, muestra la amplificación de la

cepa *L. panamensis*, sangre infectada con esta cepa, además de las cepas de *T. cruzi* y *T. rangeli* evidenciando la especificidad de la reacción y su capacidad para diferenciar complejos entre las *Leishmania spp.* cabe anotar que para la especificidad además de probar los diferentes complejos y especies de *Trypanosoma*, se pasaron 20 sangres de perros totalmente negativos que nunca habían visitado la Vereda Guatiguará. En estas sangres no hubo amplificación de la banda diagnóstica de 360 pb, arrojando una especificidad del 100%.

Figura 10. Especificidad entre las especies del orden Kinetoplastida. 6 µl de ADN de las cepas indicadas se amplificaron por PCR multiplex. **Línea 1** Marcador 100pb. **Líneas 2 y 6** Control Positivo (sangre infectada con *L. panamensis*). **Línea 3** Control negativo. **Línea 4** Control de reacción. **Línea 5** Cepa *L. panamensis*. **Línea 7** *T. cruzi*. **Línea 8** *T. rangeli*.

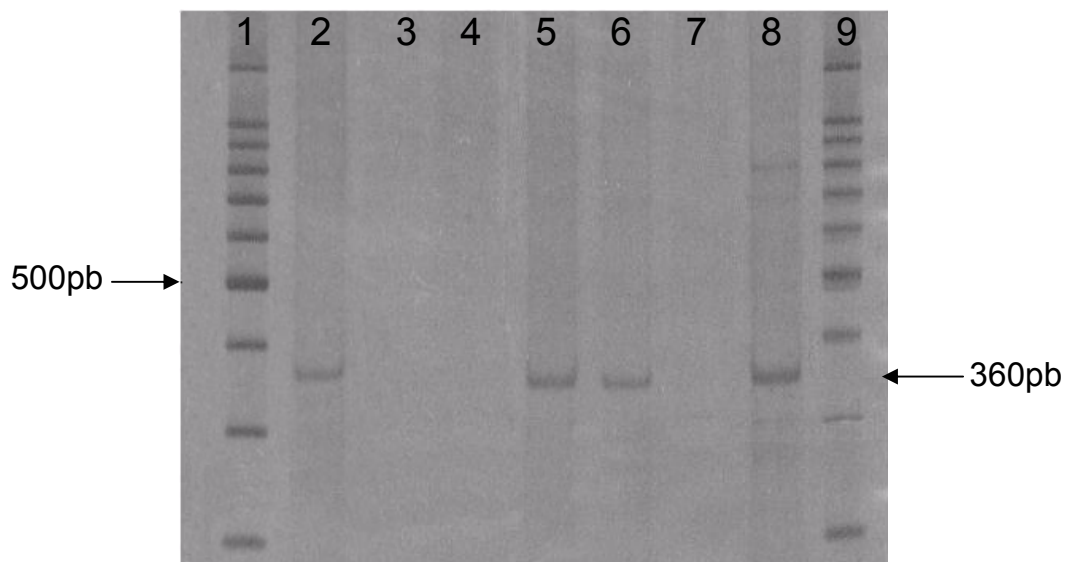


5.2.20 **Sensibilidad de la PCR** La sensibilidad se determinó por amplificaciones de diluciones seriadas de ADN de *L. chagasi* y sangre de

perro infectada artificialmente con diferentes cantidades de parásitos contados en la cámara de Neubauer. Esta PCR detectó alrededor de 10 parásitos (1pg).

5.2.11 Detección de *L.chagasi* en el material clínico La detección de *L.chagasi* en las muestras de sangre de los caninos se llevó a cabo finalizadas todas las pruebas de estandarización. El ADN de 100 perros, se amplificó para visualizar la banda de 360 pb correspondiente al complejo *L.donovani* (Figura 11). El fragmento apareció en 47 perros considerándolos positivos para la infección con *L.chagasi*.

Figura 11. Diagnóstico en Sangre por PCR: **Línea 1 y 9** Marcador de Peso molecular (100pb). **Línea 2** Control positivo (Perro Infectado). **Línea 3** Control de Reacción, **Línea 4** Control Negativo. **Línea 5 y 6** Perros positivos. **Línea 7** Perro Negativo. **Línea 8** Control Positivo (Parásitos de *Leishmania*).



5.3 ESTANDARIZACIÓN DE LA PCR NESTED

5.3.1 Iniciadores Los iniciadores de la PCR primaria tienen 25 y 26 pb, los de la PCR nested 20 y 22 pb. El porcentaje G-C de las dos reacciones oscilan entre 34.6% y 52.5%. La mezcla de reacción se preparó con 0.4 μ M de los iniciadores S-1629, S-1630 y 0.25 μ M de MIN-S1, MEX-A1, estas concentraciones fueron constantes en toda la estandarización, ya que el producto amplificado fue muy evidente.

5.3.2 dNTPs-MgCl₂ Al igual que la estandarización anterior, se jugó con las combinaciones de estos dos componentes, al final 0.20 mM de dNTPs y 2.0 mM de cloruro de magnesio arrojaron unas bandas claras sin productos inespecíficos.

5.3.3 Cantidad de DNA A pesar de las recomendaciones de Katakura *et al.* (1998) de usar 1 μ l de ADN al realizar los ensayos se encontró que el ADN extraído de sangre contenía aproximadamente 2 ng y no eran suficientes para la amplificación, se aumentó la cantidad de ADN a 3 μ l para la PCR primaria y 2 μ l para la PCR nested que contienen alrededor de 6 ng de ADN.

5.3.4 Cantidad de Taq ADN polimerasa Se ensayaron varias concentraciones de Taq tanto para la PCR primaria como para la nested. Se pasaron los controles positivos con 0.5 U, 1.0 U, 1.5 U, 2.0 U y 2.5 U alternando estas concentraciones para las dos reacciones. La combinación más eficiente fue de 2.5U para la PCR primaria y 2.0U para la nested.

5.3.5 Mezcla de reacción estandarizada Se determinaron las concentraciones que se utilizaron en las mezclas de reacción para el diagnóstico de L. visceral canina (Tabla 5).

Tabla 5. Reactivos utilizados en la mezcla de reacción para la PCR Primaria Las concentraciones se presentan para un volumen final de 20µl.

REACTIVOS	CONCENTRACIÓN	VOLUMEN(µl)
dNTPs	0.2 mM	4
MgCl ₂	2.0mM	1.6
Buffer 10x	1x.	2
DMS	10%	2
S1629	0.4 mM	0.4
S1630	0.4mM	0.4
Taq DNA pol	2.5 u.	0.5
H ₂ O dd	-	5.4
ADN	-	3
Aceite mineral	-	20

Tabla 6. Reactivos utilizados en la mezcla de reacción para la PCR nested Las concentraciones se presentan para un volumen final de 20µl.

REACTIVOS	CONCENTRACIÓN	VOLUMEN(µl)
dNTPs	0.2 mM	4
MgCl ₂	2.0mM	1.6
Buffer 10x	1x.	2
DMS	10%	2
MIN-S1	0.25 mM	0.25
MEX-A1	0.25mM	0.25
Taq DNA pol	2.0 u.	0.4
H ₂ O dd	-	5.4
ADN	-	2
Aceite mineral	-	20

5.3.6 Condiciones de amplificación (ciclos y temperatura) La PCR primaria y la nested presentaron iguales condiciones, excepto en la temperatura de alineamiento que en la PCR nested se aumentó de 50 a 55°C, además al ensayar con 25, 30 y 35 ciclos; se observó un claro y mayor producto con 35 ciclos (tabla 7,8)

Tabla 7. Programas de amplificación para la PCR primaria.

ETAPA	TEMPERATURA	TIEMPO
Desnaturalización	95°C	5 min
35 ciclos		
desnaturalización	95°C	1 min
Alineamiento	50°C	30 seg
polimerización	72°C	1min
Extensión final	72°C	10min

Tabla 8. Programas de amplificación para la PCR nested

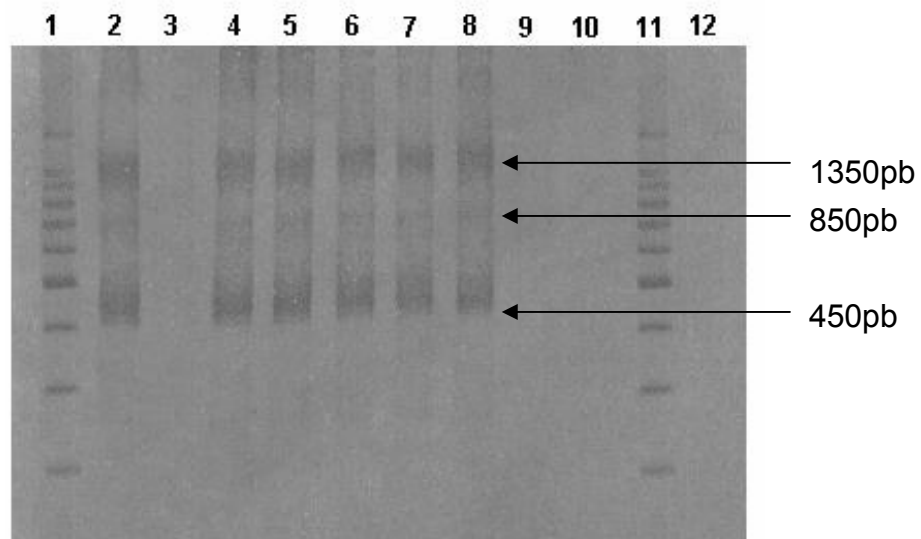
ETAPA	TEMPERATURA	TIEMPO
Desnaturalización	95°C	5 min
35 ciclos		
desnaturalización	95°C	1 min
Alineamiento	55°C	30 seg
polimerización	72°C	1 min
Extensión final	72°C	10 min

5.3.7 Especificidad La especificidad de la PCR se evaluó con cepas de *T. cruzi* y *T. rangeli*, en las que no se presentaron las bandas diagnósticas de 450, 900 y 1350 pares de bases. Además se amplificaron 10 muestras de perros considerados verdaderos negativos en los que no se evidenció el producto.

5.3.8 Sensibilidad Diluciones seriadas de ADN de *Leishmania* aislada del foco, se realizaron para medir la sensibilidad de la PCR primaria seguida de la PCR nested. La reacción fue positiva cuando se usaron más de 10 pg del ADN total (100 parásitos) como blanco (Figura 12).

La PCR nested no incrementó la sensibilidad, a pesar que su ADN era el producto amplificado de la PCR primaria.

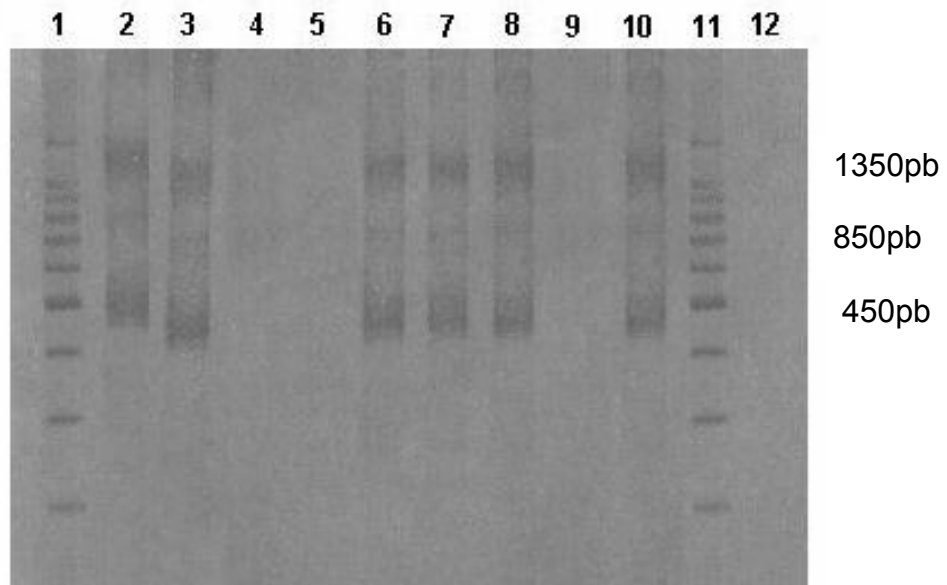
Figura 12. Sensibilidad de la PCR nested. Diluciones sucesivas de ADN de *L. Chagasi*
Líneas 1 y 11 Marcador 100 pb. **Línea 2** Control positivo, cepa *L.chagasi*. **Línea 3** Control negativo. **Línea 4** 10^6 parásitos. **Línea 5** 10^5 parásitos. **Línea 6** 10^4 parásitos. **Línea 7** 10^3 parásitos. **Línea 8** 100 parásitos. **Línea 9** 10 parásitos. **Línea 10** 1 parásito. **Línea 12** Control de Reacción



El producto más pequeño de la PCR primaria fue de aproximadamente 450 pb, el cual es comparable con la unidad del gen del mini-exon del complejo *L.donovani*. Las otras bandas presentadas, son múltiplos de 450 pb correspondientes a las múltiples repeticiones de la unidad del mini-exon. Un exceso terminal de 13 nucleótidos (nt) en el iniciador S-1629 Y 16 nt en el S-

1630 generan productos que son 29 nt mas grandes que la repetición genómica. El producto de la PCR nested fue 44 nt mas pequeña que la generada por la PCR primaria, esta diferencia de tamaño se ve claramente en la figura 13, líneas 2 y 3.

Figura 13. PCR Nested. Diferencia de tamaño entre los productos. **Líneas 1 y 11** Marcador 100 pb. **Línea 2** Producto amplificado PCR primaria. **Línea 3** Producto amplificado PCR Nested. **Línea 4** Control Negativo. **Líneas 5 y 9** Perros Negativos. **Líneas 6-8** Perros Positivos. **Línea 10** Control Positivo (Perro infectado). **Línea 12** Control de reacción



5.3.9 Detección de *Leishmania spp.* en muestras clínicas Se pasaron las muestras que resultaron positivas por PCR multiplex (47) y 10 negativos, por la baja sensibilidad de la prueba, fueron positivos a la infección por *Leishmania spp.* 16 perros (Figura 13).

5.4 ESTANDARIZACION DE LA INMUNOFLORESCENCIA INDIRECTA

Los ensayos realizados con los controles negativos, utilizando varias concentraciones de azul de evans (AE 1%) combinados con diferentes títulos del conjugado, mostraron que con el conjugado 1:80 y AE desde 1:750 hasta 1:5000, revelaron fluorescencia sólo hasta la dilución 1:16, ésta fue muy baja teniendo en cuenta que el antígeno proviene de una cepa del área en estudio. Al experimentar conjugado 1:100 y 1:150, la fluorescencia mostró su máxima aparición con dos cruces hasta la dilución 1:512, siendo la mejor y más consistente hasta el momento. Los controles negativos se mantuvieron rojos desde la dilución 1:4. Finalizando el bloque de combinaciones posibles se ensayaron conjugados desde 1:200 hasta 1:400 con AE de 1:1000 hasta 1:5000, éstas evidenciaron buena fluorescencia en los positivos pero también en los negativos quienes presentaron color verde en la dilución 1:16.

Con los resultados arrojados en estos bloques experimentales se alteraron los tiempos de incubación y tiempos de lavados. Nuevamente la combinación conjugado 1:100 AE 1% 1:5000 con un tiempo de 45 minutos presentó una excelente fluorescencia en los controles positivos y un rojo intenso en los negativos (Figuras 14 y 15). Con tiempos de incubación de 30 minutos la fluorescencia no fue tan brillante y los parásitos no eran verdes totalmente; con una hora, las placas mostraban partículas que interferían con la lectura y los negativos mostraron fluorescencia hasta 1:8. La incubación de 45 minutos reveló una buena fluorescencia sin interferencias y buen comportamiento de los controles negativos y blancos.

Figura 14. IFI negativa para anticuerpos contra *L. chagasi*



Figura 15. IFI positiva para anticuerpos contra *L. chagasi*. Dilución del suero 1: 32

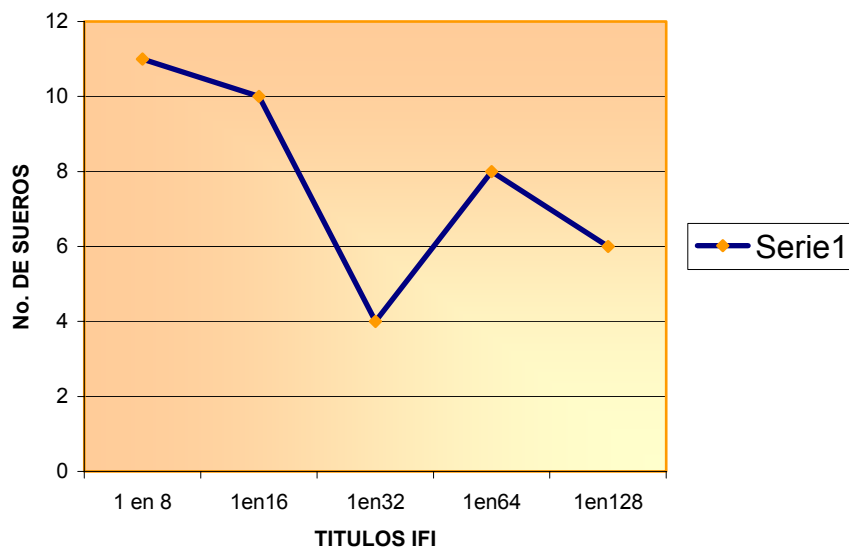


Estandarizada la técnica se procesaron 30 sueros de perros completamente sanos que nunca estuvieron en área endémica para L.V; esto con el fin de establecer el punto de corte. Con los resultados se estableció el promedio más dos desviaciones estándar y se determinó como punto de corte la dilución 1:8, considerándose positivos, a partir de esta dilución (Tabla 9). La figura 16 muestra la distribución bimodal de los títulos de anticuerpos de la población estudiada.

Tabla 9. Títulos de IFI observados en la población canina con Leishmaniosis visceral.

Título IFI	Nro Observado	%
1:8	11/39	28.2
1:16	10/39	25.6
1:32	4/39	10.3
1:64	8/39	20.5
1:128	6/39	15.4

Figura 16. Distribución bimodal de los títulos de anticuerpos en la población canina estudiada.



5.5 COMPARACIÓN ENTRE IFI Y PCR

Se estableció una correlación entre los resultados de PCR e IFI positivos: el 69.2% de perros IFI positivos fueron también PCR positivos. Inversamente entre los perros PCR positivos se encontraron anticuerpos específicos en un

57.4%. Existen diferencias significativas entre la PCR multiplex y la prueba serológica ($X^2 = 12.68$ $P= 0.0004$), como lo muestra la tabla 10.

Tabla 10. Comparación entre IFI y la PCR multiplex para la detección de *L. chagasi* en sangre periférica de perros.

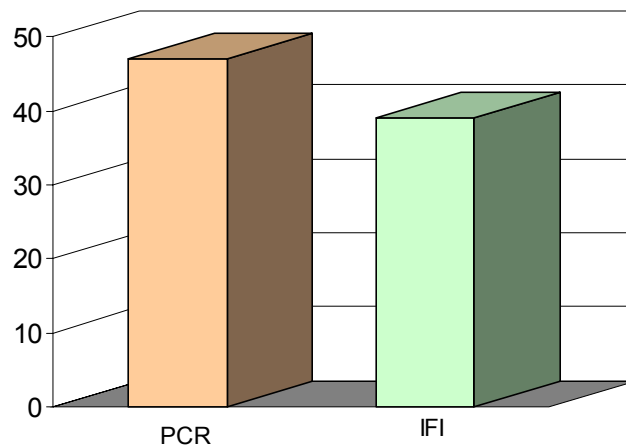
PCR	IFI POSITIVO	IFI NEGATIVO	TOTAL
POSITIVO	27	20	47
NEGATIVO	12	41	53
TOTAL	39	61	100

$X^2 = 12.68$ $P= 0.0004$ $GL=1$

5.6 PREVALENCIA DE LA INFECCIÓN POR *L. chagasi*

La prevalencia observada en la vereda Guatiguará fue del 47% determinada por la prueba molecular PCR multiplex debido a su alta especificidad y sensibilidad. Se detectó un 39% de perros positivos por la prueba serológica (Figura 17).

Figura 17. Porcentaje de Positividad de la PCR e IFI



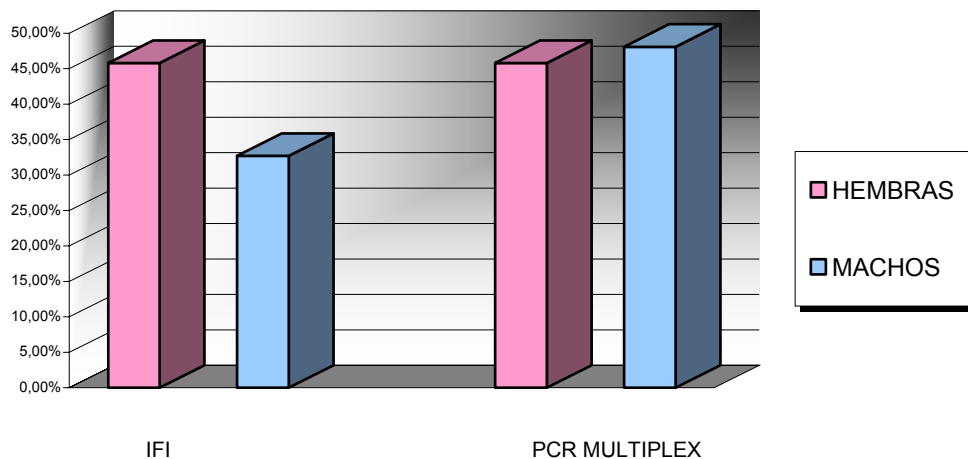
Al analizar la distribución de la población por sexo, se observó que las tasas de infección para cada uno de los sexos no se establecieron diferencias significantes ($\chi^2 = 0.79$ $p = 0.3752$) como lo muestra la tabla 11.

Tabla 11. Distribución de las prevalencias según el sexo de la población canina estudiada.

Sexo	Nro observado	IFI $\geq 1:8$	%	PCR multiplex	%
Hembras	48	22	45.8	22	45.8
Machos	52	17	32.7	25	48.1
Total	100	39	39	47	47

$\chi^2 = 0.79$ P 0.3752 GL= 1

Figura 18. Distribución de las prevalencias según el sexo de la población canina estudiada.



La distribución por edad se presenta en la tabla 12. Los resultados muestran una alta heterogeneidad pero no hay diferencias significativas en cuanto a la infección. Las prevalencias más altas se presentaron entre 12 y 24 meses.

Tabla 12. Distribución de las prevalencias por edad de la población canina estudiada.

Edad (meses)	Nro observado	IFI ≥ 1:8	%	PCR multiplex	%
0 – 6	33	12	36.4	17	51.5
6 - 12	25	8	32.0	14	56.0
12 – 18	15	6	40.0	9	60.0
18-24	11	7	63.6	5	45.4
24 -36	8	2	25.0	0	0.0
> 36	8	4	50.9	2	25.0
Total	100	39	39	47	47

$$X^2 = 5.40 \quad p = 0.3689 \quad GL = 5$$

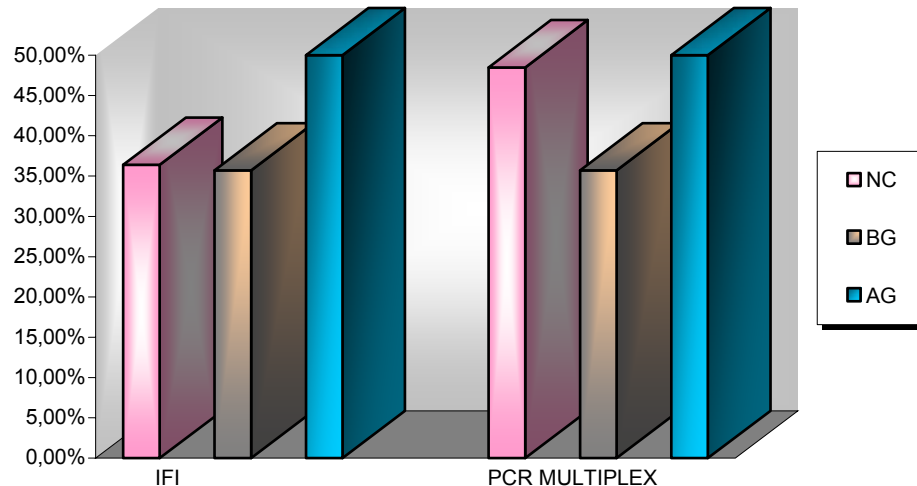
De otra parte, se analizó la positividad de los perros según el sector de donde provenían. (Figura 19). Nueva Colombia fue el sector con mayor número de perros (66%) y la prevalencia como se ve en la tabla13 fue igual tanto en IFI como en PCR multiplex en Altos de Guatiguará y Bajos de Guatiguará,

Tabla 13 Distribución de las prevalencias según el sector.

Sector	Nro observado	IFI ≥ 1:8	%	PCR multiplex	%
NC	66	24	36.4	32	48.5
AG	20	10	50.0	10	50.0
BG	14	5	35.7	5	35.7
Total	100	39	39	47	47

$$X^2 = 0.40 \quad p = 0.4179 \quad GL = 2$$

Figura 19. Prevalencia de infección con *L. chagasi* según el sector sector de procedencia de los caninos



Teniendo en cuenta que la zona estudiada corresponde a una población con un nivel socio-económico bajo, no se encontraron muchos perros de raza. El 74% eran mestizos y no mostraron diferencias estadísticamente significantes en su tasa de infección ya que el 43.2% (32/74) fue positivo por IFI y el 47.3% (35/74) positivos por PCR multiplex. Sin embargo, entre los tres perros Pastor Alemán, dos fueron positivos por ambas pruebas y entre los tres de raza Doberman, uno fue positivo por PCR y todos fueron positivos por IFI.

Al comparar los resultados de las pruebas con el examen clínico realizado a los perros, se observó que 46/100 no presentaron síntomas relacionados a LVC, de estos al 47.8% se les detectó el parásito en la PCR. Se consideraron síntomas moderados, cuando los perros presentaban de 2 a 3 síntomas característicos para LV y evidentes si presentaban más de 3 síntomas

Tabla 14. Comparación de los títulos de IFI con presencia - ausencia de síntomas.

Título	Nro observado	Síntomas moderados	Síntomas evidentes	Total	%
1:8	11	4	2	6	54.5
1:16	10	4	3	7	70.0
1:32	4	1	1	2	50.0
1:64	8	3	2	5	62.5
1:128	6	3	1	4	66.6
Total	39	15	9	24	61.5

Tabla 15. Distribución de los perros positivos de acuerdo a los síntomas presentados

SÍNTOMAS	IFI POSITIVO	PCR MUL POSITIVO
Ausencia	15	22
Moderado	15	14
Evidente	9	11
Total	39	47

$$X^2 = 0.82 \quad P = 0.6631 \quad GL = 2$$

Tabla 16. Correlación de Spearman. No existe relación entre los signos clínicos más frecuentes y la positividad en las técnicas empleadas.

SINTOMAS	IFI	MULTIPLEX
Enflaque	-0.2022	-0.0913
Estadogr	-0.2695	-0.1239
Explora m	0.1606	0.0428
Explorag	-0.0998	-0.0693
Freccard	0.0408	0.1171
Frecresp	-0.0973	-0.1758
Lesiones	0.0653	0.0235
Sistcirc	0.1398	-0.0086
Sistdige	0.1142	-0.1277
Uñas	-0.1186	0.0557
Zonasdep	-0.1337	0.0593

6 DISCUSIÓN

La Leishmaniosis visceral canina (LVC) tiene una importancia epidemiológica mayor que la humana; siempre ha llamado la atención la alta prevalencia de los casos en perros y la baja en humanos. Sin ánimo de explicarla en forma definitiva, esta relación debe ponderarse de acuerdo a que la prevalencia de LVC recoge casos clínicos y subclínicos, mientras que en humanos se refiere a casos clínicos declarados (Alvar *et al.*, 1994); los casos clínicos aparecen muy variados: van desde animales aparentemente sanos, hasta severamente comprometidos. Los perros son más susceptibles debido a que están más expuestos a los insectos vectores y los amastigotes de *Leishmania spp* se ubican en la piel, lugar fácilmente accesible a los vectores (Arias *et al.*, 1996; Canese *et al.*, 2002).

La rata de urbanización incrementó la incidencia de la enfermedad reduciéndose en áreas rurales (WHO, 2003). Las alteraciones en los ambientes rurales y de constantes movimientos migratorios de la población a la periferia de las ciudades han provocado este incremento, como ocurre en la Vereda Guatiguará. La destrucción del ambiente, la deforestación y el incremento en la crisis social, son factores a favor de la urbanización de la leishmaniosis visceral (Silva *et al.*, 2001). En las áreas urbanas y periurbanas los perros son el mejor reservorio del parásito y su introducción puede ser responsable del origen de un nuevo foco (Marzochi *et al.*, 1994).

La presencia de perros en el peri-domicilio y la dispersión de estos animales, confirman la importancia epidemiológica de los perros como principal fuente de infección para *Lutzomyia longipalpis* en la transmisión de leishmaniosis visceral al hombre y a otros animales (Silva *et al.*, 2001). En la vereda

Guatiguará en el 2000 había alrededor de 400 perros y 2000 habitantes aproximadamente. De los 100 perros muestreados el 66% correspondía al sector de Nueva Colombia, el más antiguo y grande de la vereda; el 20% provenían de Altos de Guatiguará y el 14% de Bajos de Guatiguará.

Al realizar el examen clínico de los perros, los signos más frecuentes incluyen alopecia, ulceraciones costrosas, descamación, queratitis, crecimiento de uñas, enflaquecimiento, diarrea, apatía general, anemia, hipo pigmentación y artritis entre otros.

La alopecia ocurre por la presencia del parásito en el folículo piloso, el disturbio en el metabolismo hepático del ácido pantoteico y por un proceso inmunomediado. El alargamiento de las uñas es atribuido a un estímulo de la matriz ungueal y la apatía que acompaña a un cuadro de disminución o desgaste natural de las uñas. (www.geocites.com)

La patogenia de LVC es semejante a la humana, con la formación de un leishmanioma en la zona de la picadura del insecto y la inoculación del parásito, después ocurre una visceralización de la forma parasitaria para los órganos linfoides e hígado y finalmente una diseminación para la piel. (www.geocites.com)

Strauss-Ayali & Baneth (2001) encontraron en un trabajo realizado en Israel que los signos clínicos más frecuentes fueron la dermatitis y las lesiones en la piel con un 56 y 50.6% respectivamente. En este estudio, el enflaquecimiento fue el signo clínico más sobresaliente con un 60%, también observado por Laveran (1917), Alencar (1959) y Marzochi *et al.*, (1985) en perros naturalmente infectados. No se deben confundir las úlceras de leishmaniosis visceral canina con la leishmaniosis tegumentaria canina que se presenta como úlceras con bordes levantados, fondo granulomatoso con

o sin exudado. Las lesiones en piel que son frecuentemente reportadas en LVC se observaron en este estudio como simples, pequeñas o múltiples lesiones cutáneas, costras altamente simétricas y se pueden ver en diferentes áreas del cuerpo incluidas orejas, hocico, patas y genitales; estos puntos pueden sugerir que en estas áreas del cuerpo los vectores inocularon el parásito; estas observaciones coinciden con las descritas por Vidor *et al.* (1991). El 3% de los perros presentó aumento en ganglios linfáticos, sin embargo, Abranches *et al.* (1991) reportó un 60.7% de este signo.

La proporción de perros clínicamente asintomáticos fue del 46% similar a lo observado en Italia (50%) por Poezio *et al.* (1981) y en Grecia por Malamos (1947). De otra parte, los clínicamente sintomáticos fueron el 54% de la población estudiada.

Nuestro estudio confirma la opinión de otros autores quienes desde Alder y Theodor 1932, 1935, han verificado que la leishmaniosis canina tiene un prolongado periodo asintomático. Esto implica que más de la mitad de los perros parasitados no muestran síntomas. Los perros asintomáticos pueden vivir 7 años sin presentar signos clínicos de la infección, mas una vez iniciado su proceso desencadena inevitablemente en la muerte.

La transmisión de *Leishmania spp* de perros asintomáticos ha sido investigada por numerosos autores. Hasibeder *et al.* (1992) realizó una distinción entre dos cursos clínicos diferentes para perros naturalmente infectados. Tipo A: Perros que desarrollan la enfermedad después de un periodo latente durante el cual ellos son asintomáticos pero serológicamente positivos; ellos participan en la transmisión de *Leishmania spp* hasta su muerte. Tipo B: los restantes perros asintomáticos y serológicamente positivos después de la infección, pero se curan por si mismos y siguen serológicamente negativos. Se debe tener en cuenta que en perros

asintomáticos infectados la reacción de anticuerpos puede ser muy baja o no pueden ser detectados por los métodos serológicos clásicos (Arit. *et al.*, 1989; Pinelli *et al.*, 1994).

Al realizar las correlaciones entre los signos clínicos mas frecuentes y la positividad en las pruebas de diagnóstico se observó que no hubo ninguna correlación o fue muy baja ya que perfectamente se encontraron perros aparentemente sanos, que no presentaban ningún signo y eran positivos por dos o tres pruebas. Otros perros a pesar de presentar todos los signos de leishmaniosis visceral eran negativos a la infección por *L. Chagasi*.

Hommel *et al.* (1995), determinó que los anticuerpos anti-*Leishmania* tienen títulos a menudo muy altos en perros infectados antes de aparecer los primeros signos, esto puede explicar porqué 15 de 46 perros aparentemente sanos fueron positivos por IFI.

6.1 ESTANDARIZACIÓN Y COMPARACIÓN DE LAS TÉCNICAS

Se han descrito protocolos de PCR para identificar el género *Leishmania spp.* (Mathis & Deplazes, 1995; Rodgers *et al.*, 1990) o complejos individuales incluyendo *L.braziliensis* (de Brujin & Barker, 1992; Guevara *et al.*, 1992; López *et al.*, 1993) *L. mexicana* (Eresh *et al.*, 1994; Meredith *et al.*, 1993) y *L.donovani* (Hassan *et al.*, 1993; Piarroux *et al.*, 1993; Meredith *et al.*, 1993; Smyth *et al.*, 1992). Sin embargo, ninguno de estos ensayos detectan simultáneamente los tres complejos. Katakura *et al.* (1998) desarrolló una PCR multiplex que diferencia los tres complejos (*L. donovani*, *L. braziliensis*, *L. mexicana*) sin que se requiera de tres reacciones separadas.

Los iniciadores que amplifican en esta reacción fueron escogidos entre varias regiones repetitivas del genoma de *Leishmania spp.* Potenciales blancos

incluyen el kADN del mini-círculo; la pequeña subunidad (SSU); el ADN ribosomal y gen repetido SL ARN (mini.exon). Los mini-círculos del kADN están presentes en un alto número de copias (~10000 por células) y contienen ambas regiones, la conservada y la específica, la cual varía entre especies. Sin embargo debido a la localización de las regiones conservadas y variables no fue posible identificar sitios para iniciadores complejo-específicos que generaran productos de tamaño apropiado para cada complejo (Simpson, 1987). En la región altamente conservada SSU y rADN se distinguen los complejos de *Leishmania* sólo por mutaciones puntuales, así que no se encontraron grandes regiones divergentes suficientes para designar iniciadores complejo-específicos altamente variables que dieran productos de diferente tamaño para cada complejo (Van Eys *et al.*, 1992). La región repetida del gen SL ARN está presente en el genoma nuclear como una formación en *tandem* de aproximadamente 200 copias, donde cada copia contiene una región conservada transcrita y una región variable no transcrita que difiere entre los complejos de *Leishmania* en secuencias y en tamaño (Fernandes *et al.*, 1994; Hassan *et al.*, 1993; Campbell., 2000)

El papel que cumplen los reactivos en la PCR se ha discutido por Ausubel *et al.*, (1994); Innis *et al.*, (1990); Saiki *et al.*, (1989) y se han descrito muchos protocolos para la PCR multiplex, pero pocos presentan una discusión extensa sobre la concentración de iniciadores, ciclos y temperaturas que influyen en los resultados de la PCR. Las concentraciones recomendadas de cloruro de magnesio en una PCR estándar son de 1.5-3.0 mM y las concentraciones de dNTPs alrededor de 0,2 mM; para probar la influencia del MgCl₂ se hizo una mezcla de reacción manteniendo la concentración de 0.2 mM de dNTPs y se incrementó gradualmente el cloruro de magnesio. A una concentración de 1.5mM desaparecieron bandas inespecíficas, obteniéndose una banda bien definida. Adyuvantes como el DMS y el glicerol son utilizados para aumentar la eficiencia de la reacción; éstos aumentan la cantidad de

producto y ayudan a la especificidad. Ramos *et al.* (1996) encontró que para la amplificación de varias especies de *Leishmania* se requiere la adición de 10% de DMS en la mezcla de reacción, sin embargo, esta concentración afecta varias especies de *Trypanosoma*.

El tiempo de alineamiento (de 30-60 seg.) y el tiempo de polimerización (de 30 a 150 seg.) no tuvo una visible influencia en los resultados, pero la especificidad y el rendimiento del producto se incrementó o se redujo de acuerdo a los cambios en la temperatura de alineamiento; algunos productos se incrementan al bajar la temperatura de extensión.

Se realizaron ensayos para corroborar la especificidad y la correcta detección del género *Leishmania* con cepas de diferentes complejos, además de las cepas de *T. cruzi* y *T. rangeli* (Figura 10). La PCR multiplex diferenció *Leishmania spp* de *Trypanosoma spp*. la cual no generó producto. Esto es muy importante ya que se pueden presentar infecciones mixtas (Chiaramonte *et al.*, 1996) y las pruebas serológicas están sujetas a las reacciones cruzadas (de Brujin & Barker, 1992). Así mismo la especificidad de la técnica fue calculada con la muestra de 20 perros de áreas no endémicas y coincidiendo con Arias *et al.* (1998) los resultados arrojaron que la técnica fue 100% específica.

La sensibilidad de la prueba se realizó con diluciones seriadas de ADN del parásito y sangre de perro infectada artificialmente. La técnica detectó 1 pg (~ 10 parásitos) del ADN total. Esta PCR además de amplificar el ADN de los parásitos en cultivo, también amplificó el ADN de sangre periférica tomada de los perros.

La detección de parásitos en sangre tuvo una sensibilidad baja según Hassan (1993) que usó una PCR específica para *L. donovani* y detectó ADN

de *Leishmania spp.* en muestras de sangre en 5 de 11 casos probados (sensibilidad 45%). Pero a pesar de esta moderada sensibilidad, este ensayo con técnicas no invasivas puede ser usada como una prueba inicial, reduciendo la necesidad de biopsia de médula ósea y especialmente seguir la parasitemia durante el tratamiento; sin embargo se necesitan más experiencias clínicas para este enfoque, ya que la muestra de sangre colectada tiene que ser preservada con una solución de Guanidina-EDTA la cual mantiene el parásito por mucho tiempo pero puede influir en la amplificación (HA Avila et al., 1991).

La Guanidina es un fuerte desnaturizante de proteínas comúnmente usada para la extracción de ácidos nucleicos de extractos celulares (Bowell, 1997; Sambrook *et al.*, 1989). La habilidad de este reactivo es romper células e inhibir las nucleasas, esto lo hace ideal para la preservación de ácidos nucleicos en fluidos biológicos (Avila *et al.*, 1994) y permite a la muestra ser amplificada por PCR, pero toda la guanidina debe ser removida primero, lo cual se lleva a cabo con una extracción con fenol; no obstante Wincker *et al.* (1994) comprobó que después de una extracción con fenol, no todas las muestras que contengan parásitos, puedan ser amplificadas; además de esto Nuzum *et al.* (1995) encontró que muchos parásitos estuvieron presentes en órganos infectados pero no estuvieron en 8 ml de la sangre periférica (en circulación), el 10% de las muestras confirmadas parasitológicamente fueron negativas por PCR en sangre.

Contrario a lo que se muestra respecto a la amplificación en sangre, la PCR multiplex resultó ser muy sensible y prácticamente no se presentaron inhibidores en la reacción, además el potencial que ofrecen las muestras de sangre para detectar los parásitos es soportada porque se ha observado *Leishmania spp.* en leucocitos de sangre periférica en pacientes con Leishmaniosis visceral (Fillola *et al.*, 1992; Martínez *et al.*, 1993; Piñero *et al.*,

1999) y además la amplificación del kADN de *Leishmania spp* extraído de sangre periférica en pacientes ha tenido prominentes resultados, además se debe recordar que un millón de células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC) es equivalente a 1 ml de sangre (Smyth *et al.*, 1992), inclusive para el diagnóstico de LV, el uso de sangre periférica es ventajoso por que el proceso de colección es menos invasivo y menos doloroso que la biopsia de hígado o médula ósea.

La PCR multiplex puede identificar mezclas de complejos de *Leishmania spp.* y generar un producto apropiado para cada complejo (Figura 9), así una potencial aplicación de esta prueba es la detección de infecciones mixtas causadas por parásitos de diferentes complejos dada la superposición geográfica de algunos de éstos y las infecciones atípicas. En el nuevo mundo las especies de *Leishmania* de diferentes complejos se encuentran en algunos tipos de muestras, por ejemplo: *L.mexicana* y *L.chagasi*, se han encontrado en nódulos cutáneos (Neva *et al.*, 1997); *L.braziliensis* y *L.amazoniensis* en lesiones de Leishmaniosis tegumentaria (Grimaldi & Tesh, 1993); *L.braziliensis* y *L.chagasi* (Guevara *et al.*, 1994) fueron encontrados en células mononucleares de sangre periférica humana. Sólo usando esta PCR se han diferenciado los dos complejos directamente de las muestras clínicas y no se tiene que esperar el aislamiento en cultivos para caracterizarlos.

En este trabajo se estandarizó una PCR nested para la amplificación de las repeticiones del gen del mini-exon de *Leishmania spp.* Los iniciadores usados para la PCR primaria fueron descritos previamente por Fernandes *et al.* (1994) y por Ramos *et al.* (1996) arrojando muy buenos resultados. Los iniciadores internos se designaron de la región conservada *Spliced Leader* y secuencias intron del gen del mini-exon para la subsiguiente PCR nested (Katakura *et al.*, 1998).

La sensibilidad de esta PCR no fue tan alta como lo reporta Katakura *et al.* (1998) en la cual se detecta el ADN de una cantidad equivalente a un simple parásito. Cuando se hicieron diluciones sucesivas de ADN, se comprobó que sólo se produjo amplificación cuando existían más de 100 parásitos (Figura 12) y contrario a lo que se pensaba, la PCR nested no incrementó la sensibilidad en ninguno de los ensayos. Se podría pensar que este protocolo sería una buena herramienta para la caracterización de parásitos en cultivo y especímenes clínicos con un elevado número de parásitos como aspirados de médula ósea, hígado y bazo.

El diagnóstico de leishmaniosis visceral usando sangre periférica es ventajoso ya que el proceso de colección es menos invasiva y menos dolorosa que la biopsia, pero el número de parásitos encontrados es mucho más bajo en la sangre periférica según lo descrito por Hassan *et al.* (1993) y Smyth *et al.* (1992)

El producto de esta PCR fue de 450 pares de bases aproximadamente, acompañadas de otras dos bandas de 900 y 1350 pb correspondientes a las múltiples repeticiones del gen del mini-exon. Estas bandas estuvieron claramente relacionadas con el número de *Leishmania spp.*, ya que aumentaron su intensidad cuando se aumentó la cantidad de parásitos. Las bandas no se observaron con diluciones menores a 100 parásitos.

Para detectar *L.chagasi* muchos autores han empleado la inmunofluorescencia indirecta, por su alta sensibilidad, a pesar de su baja especificidad que puede dar reacciones cruzadas con la enfermedad de chagas, leishmaniosis cutánea y otras patologías caninas, pero constituye un método sencillo, práctico y económico, recomendado por el Ministerio de Salud de muchos países como prueba diagnóstica para la leishmaniosis

visceral canina (Abranches *et. a l.*, 1991; Edrissan *et al.*, 1996; Canese *et al.*, 2002; Silva *et al.*, 2001; Osenzoy *et al.*, 1998).

Para la estandarización de la técnica se contó con el antígeno aislado del área de estudio, este debe ser de pureza y calidad óptimas ya que de otra manera se obtendrían resultados inespecíficos. Los procesos de lavado en la técnica se realizaron con PBS pH 7.2, este constituye un reactivo crítico ya que la concentración de hidrogeniones afecta la eficiencia cuántica y para obtener una buena fluorescencia, este pH debe ser estable (Fernandez-Perez *et al.*, 1999).

Respecto al colorante, se usó azul de evans 1% en una dilución 1:5000. Se recomienda diluir apropiadamente el colorante para obtener una buena fluorescencia. La dilución del conjugado 1:100, presentó mejor diferencia entre los controles negativos y el control positivo, el cual presentaba una reacción positiva hasta la dilución 1:512.

Es importante resaltar el papel que juegan en la estandarización de esta técnica el líquido de montaje, este se utilizó para dar un ambiente viscoso y reducir al máximo el índice de refracción. La temperatura es importante tanto en los períodos de incubación (37°C) como en el momento de la lectura ya que las bajas temperaturas aumentan la eficiencia cuántica al disminuir las pérdidas de calor de los medios en que se trabaje (Fernandez-Perez *et al.*, 1999).

Estandarizada la técnica es difícil comparar la prevalencia de LVC en el foco y en los diferentes focos porque las técnicas utilizadas no son las mismas. Cuando comparamos estudios usando la misma técnica, las conclusiones pueden ser contradictorias por la falta de homogeneidad en la interpretación. Entre quienes usan IFI como técnica base para sus prevalencias

epidemiológicas, Pozio *et al.* (1981) y Gradoni *et al.* (1988) utilizaron 1:40 como el título límite, mientras Manjour *et al.* (1978) considera 1:200 el título significativo para perros; Delgado *et al.* (1997) consideraron 1:64; en este estudio al pasar los controles negativos y establecer el punto de corte con más o menos dos desviaciones estándar se tomó 1:8 como corte, según esto el criterio de positividad de las muestras que se adoptó fue que por lo menos la mitad de los parásitos presenten una fluorescencia verde brillante evidente de toda la superficie o de todo el contorno (Canese *et al* 2002).

La tabla 9 muestra que el 53.8% de los perros tienen títulos bajos (1:8, 1:16); el 30.8% tiene títulos moderadamente altos (1:32, 1:64) y sólo el 15.4% presentó el título más alto (1:128) a diferencia de Abranches *et al.* (1991) quien encontró que el mayor porcentaje de perros positivos tenían títulos altos (63.2%) seguidos por los títulos bajos y finalmente encontró menos perros con títulos moderadamente altos (16.7%).

Independiente del título de anticuerpos, la PCR detectó ADN en el 69.2% (27/39) de los perros, no coincidiendo con las conclusiones y resultados de Rioux *et al.* (1972) y Gradoni *et al.* (1987) en el trabajo sobre infecciones experimentales de Flebótomos en las cuales sólo los animales en estado avanzado de la enfermedad fueron fuentes para infectar el insecto vector. No obstante Lanotte en 1975 determinó que no hubo correlación entre los títulos de anticuerpos y la seriedad de la enfermedad, de este modo no podemos asegurar que los perros con títulos altos son más infectivos y menos infectivos los de títulos bajos.

La prevalencia de la infección determinada por la PCR multiplex fue del 47%. Se encontraron 39 perros positivos por IFI. Estos resultados coinciden con los trabajos realizados por Ashford (1998) en Jacobina Brasil, cuya prevalencia fue del 36%; Manciatì (1988) quien reportó un 42% en la región

mediterránea; Canese *et al.* (2002) observó un 32% en Villa Elisa Paraguay; Osenzoy reportó en Turquía un 40%; Abranches *et al.* (1991) quien reportó un 48.2% y Hassan (1993) un 50% de perros positivos confirmados parasitológicamente. No obstante en Venezuela Delgado *et al.* (1998) encontró una prevalencia de 5.6% igual a la encontrada por Sandler *et al.* (2001) en Israel.

Analizando la distribución de la infección por sexos no se observaron diferencias significativas igual que los trabajos de A.branches (1991) y Like Pozio *et al.* (1981), sin embargo Lanotte en 1975 encontró una alta prevalencia en machos.

La infección no se mantuvo asociada a la edad, ya que no se presentaron diferencias significantes a pesar de ser muy heterogéneas. Según IFI, la prevalencia más alta se presentó entre los 18-24 meses con un 63.6% y la más baja entre los 24 y 36 meses coincidiendo con los estudios de Abranches en 1991 donde los jóvenes adultos presentaron la segunda mayor tasa de infección.

En este estudio no se comparte la idea generalizada del incremento de la prevalencia de infección con la edad, debido al tiempo de exposición a la actividad de los flebótomos (Lanotte, 1995; Ranque *et al.*, 1977), ya que encontramos perros de 0-6 meses infectados, detectados por la prueba serológica en un 36.4% y por la molecular en un 51.5% (Tabla 12). Además se debe tener en cuenta que al tratarse de un asentamiento donde permanentemente están llegando nuevos habitantes es difícil establecer que la infección esté relacionada al tiempo de permanencia, por ejemplo, se encontraron perros de 24 meses de edad pero sólo llevaban un mes viviendo en la vereda.

Al establecer la prevalencia según la raza, se observó que debido a la situación socio-económica el 74% de los perros eran mestizos, de éstos el 43.2% fueron positivos por IFI y el 47.3% por PCR multiplex. Los perros restantes (26%) pertenecían a otras razas incluyendo la raza Doberman, que los tres perros reportados fueron positivos por IFI y la raza Pastor Alemán que fueron positivos dos de los tres perros encontrados. Estos resultados a pesar del bajo número de perros coinciden con Abranches (1991) y Canese *et al.* (2000) quienes reportaron que estas razas son aparentemente más susceptibles con relación a otras razas consideradas.

Comparando PCR con serología, ésta subestima la prevalencia de la infección, la eliminación de la mayoría de perros seropositivos puede afectar la incidencia acumulada de seroconversión en perros, temporalmente y disminuir la incidencia en humanos, sin embargo, esto puede generar que otros reservorios podrían estar involucrados en mantener la infección canina. Futuros trabajos serán necesarios para determinar la influencia de otros posibles reservorios y entender el curso de la infección y la seroconversión en perros, en resumen, evaluar costo-efectividad (Asford *et al.*, 1998)

Gradoni *et al.* (1980) mostraron un decrecimiento en la incidencia y prevalencia de LVC siguiendo un programa de control que involucra: Tratamiento de sintomáticos y asintomáticos con antimoniales pentavalentes; uso de insecticidas y sacrificando a los perros infectados, eliminando la enfermedad (Gavani *et al.*, 2002), esto combinado a controles del vector, tratamiento en humanos y eliminación de otros reservorios.

CONCLUSIONES

- Los signos clínicos encontrados entre los perros de la vereda, incluyen alopecia, ulceraciones costrosas, descamación, queratitis, crecimiento de uñas, enflaquecimiento, diarrea, apatía general, anemia, hipo pigmentación, entre otros.
- La PCR múltiplex fue el método mas eficiente para la detección de *L. chagasi* en la población canina. La técnica detectó 1 pg (~ 10 parásitos) del ADN total; esta PCR además de amplificar el ADN de los parásitos en cultivo, también amplificó el ADN de sangre periférica tomada de los perros.
- La PCR nested fue menos sensible y no es una buena herramienta para el diagnóstico cuando hay bajas parasitemias.
- No se encontró correlación entre el cuadro clínico y la positividad de las pruebas, tampoco existen diferencias significativas de infección según edad, sexo o raza.
- Se demostró la utilidad de las pruebas empleadas para la detección de la infección, independiente del estado clínico del perro
- Se observó una alta prevalencia de infección por *L. chagasi* (47%) en la población canina de este foco, lo cual amerita que se implementen programas de control y vigilancia.

RECOMENDACIONES

Es conveniente implementar la PCR multiplex en centros de referencia o laboratorios de salud pública en zonas endémicas para *Leishmania spp.* en Colombia.

Las técnicas serológicas y moleculares constituyen una herramienta eficaz en los programas de control y vigilancia epidemiológica.

Se recomienda el tratamiento de perros sintomáticos y asintomáticos con antimoniales pentavalentes o el sacrificio de los perros infectados; implementar el uso de insecticidas y toldillos impregnados, esto combinado a controles del vector, tratamiento en humanos y eliminación de otros reservorios

BIBLIOGRAFÍA

- ABRANCHES P. SILVA – PEREIRA M.C.D. CONCEICAO – SILVA F.M. SANTOS – GÓMEZ G.M. JANZ J.G. Canine Leishmaniasis: pathological and ecological factors influencing transmission of infection. 1991. J. parasitol 77: 557 – 561.
- -----, LOPEZ F.J., SILVA F.M.C., RIBEIRO M.M.S., PIRES C.A.,. Le kala-azar au Portugal III. Resultats d'une enquete sur la leishmaniose canine réalisée dans les environs de Lisbonne. Comparaison des zones urbaines et rurales. 1983. Ann Parasitol. Hum Comp. 58 : 307 – 315.
- -----, SANTOS-GOMEZ G., RACHAMM N., CAMPINO L., SCHNUR L.F., & JAFFE C.L., An experimental model for canine visceral leishmaniasis 1991. Parasite immunology: 13 : 537 – 530.
- ADLER, S., AND O. THEODOR. Investigations of Mediterranean kala-azar. VI- canine visceral leishmaniasis. 1932. Proceedings of the Royal Society, series B, Biological Sciences (London) 110: 402 – 412.
- ----- AND ----- Investigations of Mediterranean kala-azar. VII- Further Observations on canine visceral leishmaniasis. 1935. Proceedings of the Royal Society, series B, Biological Sciences (London) 116: 494 – 504
- ----- AND ----- Investigations of Mediterranean kala-azar. IX- Feeding Experiments with *Phlebotomus perniciosus* and other species on animals infected with *leishmania infantum*. 1935. Proceedings of the Royal Society, 116: 516 – 542.
- AISA M.J., CASTILLEJO S., GALLEGO M., FISA R., RIERA M.C., DE COLMENARES M., TORRAS S., ROURA X., SENTIS J., PORTUS M. Diagnostic potential of western blot analysis of sera from dogs with leishmaniasis in endemic areas and significance of the pattern. 1998. Am J. Trop Med. Hyg 58 (2): 154 – 159.
- ALVAR J., AMELA C., MOLINA R., El perro como reservorio de la leishmaniosis. 1994.
- ALENCAR J.E., Calazar canino. Contribuicao para o estudo da Epidemiologia no Brasil, Imprensa Oficial, 1959. Fortaleza, 342.pp
- ALMEIDA, R.P., M. BARRATAL – NETO, A. DE JESÚS, L. DE FREIAS, E. CARAVHALO, A. BARRAL. Biological behavior of *Leishmania*

- amazonensis in bald/c mice. 1996. Am J. Trop. Med. Hyg. 54 (2): 178 - 184.
- ANGULO V. M. TARAZONA Z. VEGA A. VELEZ ID. BATANCUR J. Leishmaniosis, chagas y malaria. 1998. Guías de práctica clínica basadas en la evidencia. IS. ASCOFAME.
 - ARIAS J., BELTRAN F., DESJEUX Y., WALTON B., Epidemiología y control de la leishmaniosis en las Américas, por país o territorio, organización panamericana de la salud. 1996. Cuaderno Técnico No. 44.
 - ASHFORD, D.A. DAVID J.R., MIRALBAF, DAVID R. SHERLOCK. I., DA CONCEICAO M. PEDRAL O. BADARO R. Studies on control of visceral Leishmaniosis: impact of dog control on canine and human visceral. Leishmaniosis in jacobina, bahia Brasil. 1998. Am. J. Trop. Med. Hyg., 59 (1): 53 – 57.
 - -----, BADARO R, EULALIO C, FREIRE M, MIRANDA C, ZALIS M.G., DAVID J.R., Studies on control of visceral Leishmaniosis: validation of the falcon assay screening test-enzyme-linked immunosorbent assay. (FAST-ELISA) for field diagnosis of canine visceral Leishmaniosis. 1993. Am. J. Trop. Med. Hyg., 48:1– 8.
 - -----, M. BOZZA M. FREIRE, J.C. MIRANDA, I. SHERLOCK, C. EULALIO, U. LOPES, O. FERNANDEZ W. DEGROVE, R. H. BARKER, R. BALARO, JR. DAVID. Comparizion of the polymerase chaing reaction and serology for the detection of canine visceral Leishmaniosis. 1995. Am. J. Trop. Med. Hyg 225.
 - -----, BOZZA M., J.C. MIRANDA, C. EULALIO, FREIRE M., MIRANDA C. ZALIS MG, JR. DAVID. Comparizion of the polymerase chaing reaction and serology for the detection of canine visceral Leishmaniosis1995. Am. J. Trop. Med. Hyg 53: 251 – 255.
 - AVILA H.A., SIGMAN D.S., COHEN L.M., MILLIKAN R.C., SIMPSON L. Polymerase chain reaction amplification of Trypanosoma cruzi kinetoplast minicircle DNA isolated from whole blood lysates: diagnosis of chronic Chagas disease. 1991. Molecular and Biochemical Parasitology 48: 211 – 222.
 - BARKER D.C., Molecular approaches to DNA diagnosis 1989. Parasitology 99: 129 – 146.

- BELLI A, RODRIGUEZ B, HERNANA A, HARRISE. Simplified polymerase Caín reaction detection of new world leishmania un clinical specimens of cutaneous leishmaniasis. 1998. Am J. Trop Med Hyg 58 (1): 102 – 109.
- BERMAN J.D. Human Leshmaniasis: Clinical, Diagnostic, and Chemotherapeutic Developments in the last 10 years Clinical Infectious 1957 Diseases 24: 684 -703
- BERRAHAL F., MARY C., ROZE M., BERENGER A., ESCOFFIER K., LAMOUREUX D., DUNAN S. Canine Leishmaniasis: identification of asymptomatic carriers by polymerase chain reaction and immunoblotting. 1996.Am. J. Trop. Med Hyg 55 (8) 273 – 277.
- BORST, P. AND FAIRLAMB,AH DNA of parasites, with special reference to kinetoplast DNA. In Biochemistry of parasites and Host Parasite Relationships (ed. H. Van den Bossche), Amsterdam: North Holland Publishing 1976. Co. 99. 169 – 92
- BOWTELL, D.D.L. Rapid Isolation of eukaryotic DNA. 1987.Anal Biochem 162: 463 – 465.
- BRANDONISIO O CARRELLI. G. Ceci. L. Consenti B. Fasanella. A. Puccini V. Canine leishmaniasis in the Gargano promontory (Apulia South Italy) 1992.Eur. J. Epidemiol 8: 273 - 276.
- CABRAL M., McNERNEY R., GOMEZ S., O'GRADY J., FRAME L., SOUSA J.C., MILES M.A., & ALEXANDER J. Demonstration of natural Leishmania infection in asymptomatic dogs in the absence of specific humoral immunity. 1993. Archives de l'institut Pasteur de Tunis. 70: 473 – 479.
- CANESE A., GAROSO O., RAMIREZ J., MAIDANA M., MONTI M., SANTACRUZ R., LOUTEIRO J., TERRAZAS E., GENES L., MALDONADO G., CESPEDES M., MEZA J., CANESE J. Focos de leishmaniasis visceral canina en las ciudades de Lambaré y Villa Elisa,Paraguay. www.una.py/medicina/microbiologia/005/005c.html.
- CASAS, M.V.M. ANGULO, E. FAJARDO. Kala azar en Colombia. 1983. Acta medica colombiana. Vol 8 (6): 301 – 309
- CIDEIM. 1996 Manual de Entomología médica Centro de Investigaciones de entrenamiento de investigaciones médicas.

- COSTA C.H.N., GOMEZ R.B.B., SILVA M.R., GARCEZ L.M., RAMOS P.K., SANTOS R.S., SHAW J., DAVID J.R., MAGUIRE J.H. Competence of the human host as a Reservoir for *Leishmania chagasi*. 2000. JID 182: 997 – 1000.
- DE BRUJIN, M.H.L., AND BARKER, D.C. Diagnosis of new world leishmaniasis: specific detection of species of the *Leishmania braziliensis*, complex by amplification of kinetoplast DNA 1992. Trop. 52, 45 – 58.
- D'OLIVEIRA J'UNIOR, A. S. R. M. COSTA, A. BISPO, M. ORGE, E. CARVALHO. Asymptomatic *leishmania chagasi* infection in relatives and neighbors of patients with visceral Leishmaniasis. 1997 Mem. Inst Oswaldo Cruz 92 (1). 15 – 20
- DEDET, J. P. 1993. *Leishmania* et leishmanioses du continent américain. Annales de L'institut Pasteur 4(1): 3 - 25.
- DELGADO O., FELICIANGELI M.D., GOMEZ B., ALVARADO J. GARCÍA L. & BELLO C. The re – emergence of american visceral leishmaniasis in an old focus in Venezuela: present situation of human and canine infections. 1998. Parasite. 5: 317 – 323.
- DEPLAZES P., GRIMM F., PAPAPRODROMOU M., CAVALIERO T., GRAMICCIA M., CHRISTOFI G., CHRISTOFI N., ECONOMIDES P., ECKERT J. Canine leishmaniosis in Cyprus due to *Leishmania infantum* MON 1. 1998. Acta Tropica 71: 169 – 178.
- DORN P.L., SELGEAN S., GUILLOT M., Simplified Method for preservation and polymerase chain reaction – amplification of *Trypanosoma cruzi* DNA in human blood. 1997. Mem Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro Vol. 92 (2): 253 – 255.
- EL HARITH A., SLAPPENDEL R.J., REITER I., VAN KNAPEN F., DE KORTE HUIGEN P., KOLK A.H.J. Application of a direct agglutination test for detection of specific anti-*leishmania* antibodies in the canine reservoir. 1989. J. Clin Microbiol. 27: 2252 – 2257.
- ERESH S., McCALLUM S.M., BARKER D.C.. Identification and diagnosis of *leishmania mexicana* complex isolates by polymerase chain reaction. MRC Outstation of NIMR, Moltano Laboratories, Department of Pathology, Tennis Court Road, Cambridge CB2 1QP, 1994 UK. pp 423 – 433.

- FERNANDEZ-PEREZ F.J., MENDEZ S., DE LA FUENTE C., GOMEZ-MUÑOZ MT., CUQUERELLA M. AND ALUNDA J.M. Short Report: improved diagnosis and follow-up of canine leishmaniasis using amastigote-based indirect immunofluorescence. 1999. *Am. J. Trop. Med Hyg.*, 61 (4): 652 – 653.
- FILOLA G., CORBERAND J.X., LAHARRAGUE P.F., LEVENES H., MASSIP P., AND RECCO P. Peripheral intramonocytic leishmaniasis in an AIDS patients. 1992. *J. Clin. Microbiol* 30, 29 – 34.
- FUNDACAO NACIONAL DE SAUDE. Control, diagnostico e tratamento da Leishmaniose visceral. Ministerio da Saude. Brasil 1996.
- GRADONI L, GRAMICCIA M, MANCIANTI F, PIERI S, Studies on canine leishmaniasis control. 2. Effectiveness of control measures against canine leishmaniasis in the Isle of Elba, Italy. 1988. *Trans R. Soc Trop Med Hyg* 82: 568 – 571.
- -----, POZIO L., BETTINI E., GRAMICCIA M., Leishmaniasis en Tuscany (Italia) III. Th Prevalence of canine leishmaniasis in two foci of Grosseto Province. 1980. *Trans. R. Soc. Trop. Med Hyg* 74: 421 – 422.
- HASSAN M.Q.A., GHOSH S.S. GUPTA M. BASU D. MALLIK K.K. ADHYA S. Enzymatic amplification of mini-exon-derived RNA gene spacers of *Leishmaniasis donovani* – primers and probes for DNA diagnosis 1993. *parasitology* 107: 509 – 517.
- HASIBEDER G., DYE C., CARPENTER J., Mathematical modeling and theory for estimating the basic reproduction number of canine leishmaniasis. 1992. *Parasitology* 105: 43 – 53.
- HOMMEL M., JAFFE C.L., TRAVI B., AND MILON G. Experimental models for Leishmaniasis and for testing anti-leishmanial vaccines. 1995. *Annals of tropical medicine and parasitology*. Vol. 59. Supplement No. 1, 55 – 73.
- JAFFE, C.L., SIMAN-TOV M., SACERDOTI-SIERRA M., ABU-SHILBAYEH L., EISENBERG C., ADINO, I. Biochemistry and immunology. www.md.huji.ac.il/depts/pasitology/p-3-5.html.

- MANCIANTI F, GRADONI L, GRAMICCIA M, PIERI S, MARCONCINI A. Canine leishmaniasis in the Isle of Elba, Italy. , 1986. Trop Med Parasitol 37: 110 – 112.

- -----, MECIANI N, Specific serodiagnosis of canine leishmaniasis by indirect immunofluorescence, indirect hemagglutination, and counterimmunoelectrophoresis. 1988. Am J. Vet Res 49: 1409 – 1411.

- MARTINEZ P., DE LA VEGA E., LAGUNA F., SORIANO V., PUENTE S., MORENO V., SENTCHORDI M.J., GARCÍA-AGUADO C., AND GONZALEZ-LAHOZ J. Diagnosis of visceral leishmaniasis in HIV – infected individuals using peripheral blood smears. 1993. AIDS 7, 227 – 230.

- MARZOCHI MCA, COUTINHO SG., SOUZA W. TOLEDO LM, GRIMALDI Jr G., MOMENT H, PACHECO RS, SABROZA PC, SOUZA MAS, RANGEL JR FB, TRAMONTANO NC. Canine visceral leishmaniasis in Rio de Janeiro, Brazil. Clinical, parasitological, therapeutical and epidemiological findings. 1985. Mem Inst Oswaldo Cruz. 80: 349 – 357.

- MAZLOUMI A.S., HOSJATI M.H., MOHITE H., DAVIES C.R., Effect of insecticide-impregnate dog collars on incidence of zoonotic visceral leishmaniasis in Iranian children: a matched-cluster randomised trial. 2002. Vol. 360. 374 – 379.

- MATHIS, A, P. DEPLAZES PCR and in vitro cultivation for detection of Leishmana spp in diagnostic samples from humans and dogs. 1995. J. Clin Microbiol 33: 1145-1149

- MOLINA R., AMELA C. NIETO J., SAN ANDRES, M. GONZALEZ F. CASTILLO J. A. LUCIENTES J., ALVAR. J. Infectivity of dogs naturally infected with leishmania infantum to colonized Phlebotomus perniciosus 1994. AIDS 8: 277 - 279

- -----, ----- 1994b. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 88: 491 – 493.
- MORRISON, A.C. FERRO, R PARDO, M TORRES, B. DEVLIN, M. L. WILSON, R. TESH Seasonal abundance of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Phlebotomidae) at an endemic focus of visceral leishmaniasis in Colombia. 1995. J. Med Entomol 32 (4): 538-548.
- NEVA F.C. PONCE. E PONCE, R. KREUTZER, F. MODABBER. P. OLLIARO Non - ulcerative cutaneous leishmaniasis in Honduras fails to respond to topical paromomycin. 1997. Trans. Roy Soc Trop. Med and Hyg 91: 473 – 475
- NOYES, H. M. CHANCE, C. PONCE, E. PONCE, R. MAINGON *Leishmania chagasi*: Genotypically similar parasites from Honduras cause both visceral and cutaneous. Leishmaniasis in humans. . 1997 Experimental parasitology 85: 264 – 273
- NUZUM E., WHITE III F., THAKUR C., DIETZE R., WAGES J., GROGL M., BERMAN J. diagnosis of symptomatic visceral Leishmaniasis by use of the polymerase chain reaction on patient blood. 1995. JID 171: 751 – 754.
- ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD 1998 World Health Organization Division of control of tropical diseases - Leishmaniasis control.
- OSMAN, F.O. OSKAM, L., ZIJLSTRA, E. D., KROON, C. M. SCHOONE, G. J. KHALIL, E.G. K., EL- HASSAN. A. KAGER, P. A Evaluation of PCR for diagnosis of visceral leishmaniasis. 1997 J. Clin Microb. 35 (10): 2454 – 2457
- OZENSOY S., OZBEL Y., TURGAY N., ALKAN M.Z., GUL K., GILMAN-SACHS A., CHANG K.P., REED S.G., OZCEL M.A. Serodiagnosis and epidemiology of visceral leishmaniasis in Turkey. 1998. Am J. Trop., Med Hyg., 59 (3): 363 – 369.

- PARANHOS - SILVA, M, L.A. R. FREITAS, W. C. SANTOS, G. GRIMALDI, L.C. PONTES - DE - CARVALHO, A. J. OLIVEIRA - DOS - SANTOS. A. Cross -sectional serodiagnostic survey of canine Leishmaniasis due to *Leishmania chagasi*. 1996. Plan Nacional de control de Leishmaniasis. Ministerio de salud 1994.
- PIARROUX R., AZAIEZ R., LOSSI A.M., REYNIER P., MUSCATELLI F., GAMBARELLI F., FONTES M., DUMON H., QUILICI M., Isolation y characterization of a repetitive DNA sequence from *leishmania infantum* : development of a visceral leishmaniasis polymerase chain reaction. 1993. *Am. J. Trop. Med Hyg* 49: 364 – 369.
- PINELLI E., LILLICK-KENDRICK R., WAGENAAR J., BERNARDINA W., DEL REAL G., RUITENBERG J., Cellular and humoral immune responses in dogs experimentally and naturally infected with *Leishmania infantum*. 1994. *Inf. Immun.* 62: 229 – 235.
- PORTUS, M, FISA R, SERRAT, GALLEGO, M, MORA R, Estudios seroepidemiológicos sobre la Leishmaniasis canina en Cataluña. 1987. *Med. Vet* 4: 569 -575
- POZIO, E., L. GRADONI, S. BETTINI, AND M. GRAMICCIA. Leishmaniasis in Tuscany (Italy). VI. Canine Leishmaniasis in the focus of Monte Argentario (Grosseto). 1981. *Acta Tropica* 38: 383 – 393.
- QUINNELL R.J., COURTENAY O., SHAW M.A., DAY M.J., GARCEZ L.M., DYE C., KAYE P.M., Tissue Cytokine Responses in canine visceral leishmaniasis. 2001. *JID* 183: 1421 – 1424.
- RANQUE, J.M. QUILICI, AND S. DUNAN. Les leishmanioses de la region provencale. Considerations épidémiologiques et ecologiques. *Colloques Internationaux du CNRS, No. 239. Ecologie de leishmanioses.* 1977. Centre National de la Recherche Scientifique, Paris, p. 285 – 295.
- RAVEL S., CUNY G., REYNES J., VEAS F., A highly sensitive and rapid procedure for direct PCR detection of *Leishmania infantum* within human peripheral blood mononuclear cells. 1995. *Acta Tropica.* 59, 187 – 196.

- REITHINGER, R., LAMBSON, B.E., BARKER, D.C. DAVIS, C.R. Use of PCR to detect *Leishmania (viannia) spp.* In dog blood and bone marrow 2000. *J. Clin Microb* 38(2): 748 – 751.

- RIOUX J., LANOTTE G., PRATLONG F., DEREURE J., La Leishmaniose cutanee autochtone dans Sud-est de la France. Resultats d'une enquete eco-epidemiologique dans le pyrenees orientales. 1985. *Med Malad Infect* 11 : 650 – 656.

- RODGERS M.R. , POPPER S.J. WIRTH D.F., Amplification of kinetoplast DNA as a tool in the detection and diagnosis of *Leishmania*. 1990. *Exp. Parasitol.* 71: 267 – 275.

- SAMBROOK J., FRITSCH E.F., AND MANIATIS T., 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring harbor, NY.

- SILBER A.M., BÚA J., PORCEL B.M., SEGURA E.L., RUIZ A.M. *Trypanosoma cruzi*: Specific Detection of parasites by PCR in enfected humans and vectors using a set of primers (BP1/BP2). Targeted to a nuclear DNA sequence. 1997. *Experimental parasitology* 85, 225 – 232.

- SILVA EDUARDO S., GONTIJO CELIA MF., PACHECO RAQUEL S., FIUZA VANESSA OP., BRAZIL REGINALDO P., Visceral Leishmaniasis metropolitan region of Belo Horizonte, State of Minas Gerais, Brazil. 2001.*Mem Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, April, Vol. 96 (3):* 285 – 291

- SMYTH, A.J., GHOSH, A., HASSAN M. D. Q., BASU, D. DE BRUJIN, MHL, AYDA, S., MALLIK, K.K., BARKER, D.C, Rapid and sensitive detection of *Leishmania* kinetoplast DNA from spleen and blood simples of kala-azar patients. 1992. *Parasitology* 105: 183 – 192.

- STRAUSS-AYALI D., BANETH G., Canine visceral Leishmaniasis. [www.ivis.org/advances/infect Dis_camichael/baneth/chapter_frm.asp](http://www.ivis.org/advances/infect_Dis_camichael/baneth/chapter_frm.asp).

- TESH, R.B. 1995 Control of zoonotic visceral Leishmaniasis: is it time to change strategies? *Am. J. Trop. Med. and Hyg* 52 (3): 287 – 292.
- TOMSON N., SYMONDS R.P., MOIR A.A., KENDALL C.H., WISELKA M.J. 2002. New world leishmaniasis from Spain. *78*: 757 – 758.
- VÉLEZ, I.D. & S. AGUDELO. Leishmaniasis visceral "un viento maligno" 1997 Colombia investiga. pp 29 – 34.
- VIDOR E, DEREURE J, PRATLONG F, DUBREUIL N, BISSUEL G, MOREAU Y, RIOUX JA Le chancre d'inoculation dans le leishmaniose canine á *leishmania infantum*. 1991. *Prat Med Chirung de l'Animal de Comp* 26: 133 – 137.
- WHO-WORLD HEALTH ORGANIZATION Control of the Leishmaniasis. Report of a WHO Expert Committee. World Health Organization, Geneva, Switzerland. 1990. Technical Report Series No. 793.
- WILSON, M.E. & J.A. STREIT. Visceral Leishmaniasis 1996. *Gastroenterology clinics of North America*. 25 (3): 535 – 549.
- YOUNG, D.G. & M. A. DUNCAN. Guide to the identification and geographic distribution of *Lutzomyia* sand flies in Mexico, the West Indies, Central and South America (Diptera: Psychodidae). 1994. *Memoirs of the American Entomological Institute*
- -----, ARIAS J., Flebótomos: vectores del leishmaniasis en las Américas. Cuaderno Técnico. Organización Panamericana de la Salud. No. 33.
- www.mimg.ucla.edu/faculty/campbell/fac/campbell.html

NEXO A

Extracción de ADN por el Método Fenol-Cloroformo

1. Adicionar 200 μ l de fenol-cloroformo alcohol isoamílico a 200 μ l de muestra.
2. Agitar por inversión durante 5 minutos.
3. Centrifugar a 14.000 rpm durante 10 minutos.
4. Retirar el sobrenadante y transferir a otro vial.
5. Adicionar al primer tubo 150 mL de agua Tipo I.
6. Repetir los pasos del 2 al 4.
7. Recoger el sobrenadante y añadir al sobrenadante recuperado en el paso anterior.
8. Adicionar 400 μ l de Cloroformo alcohol isoamílico 24:1.
9. Repetir los pasos del 2 al 4
10. Recuperar el sobrenadante (medir bien el volumen).
11. Adicionar acetato de Na pH 5.2 10% del volumen anterior, mezclar y pulso de centrifuga.
12. Adicionar 500 μ l de alcohol absoluto.
13. Dejar en cama de hielo por 15-20 minutos.
14. Centrifugar a 10.000 rpm durante 15 minutos.
15. Eliminar el sobrenadante por inversión.
16. Añadir 500 μ l de alcohol al 70%.
17. Centrifugar 15 minutos a 10.000 rpm.
18. Eliminar sobrenadante y dejar secar los tubos.
19. Resuspender en 30 μ l de TE.
20. Pulso de centrifuga.
21. Dejar a 4°C durante 36 horas.

ANEXO B

Preparación Del Antígeno IFI

1. Recolectar las cepas de medio líquido en tubos de medio grande.
2. Centrifugar 30 minutos a 2500 rpm. Descartar el sobrenadante con pipeta.
3. Agregar solución salina estéril al pellet y el volumen que se le agrega depende del volumen y la concentración de la cepa que se tenga.
4. Centrifugar 25-30 minutos a 2500 rpm. Descartar el sobrenadante con pipeta.
5. Resuspender el sedimento en formalina 2%. Agregar igual volumen de formalina que el sedimento aproximadamente 0.5 ml. Esperar la muerte de los parásitos. Centrifugar a 3000 rpm. Por 10 minutos.
6. Lavar con formalina nuevamente 10 minutos a 3000 rpm. (igual al paso 5)
7. Lavar el formol con 5 ml de solución salina estéril. Dos lavados de 10 minutos a 2500 rpm.
8. Resuspender con 1ml. De solución salina estéril a una concentración de 30- 40 parásitos por campo
9. Contar los parásitos y diluir hasta obtener una concentración aproximada de 30-40 parásitos por campo.
10. Se repartió el antígeno diluido en las láminas para IFI, agitando la suspensión antigénica constantemente para evitar la sedimentación de los parásitos y para que la distribución sea homogénea en todos los campos.
11. Durante 15 minutos se secaron las placas a temperatura ambiente, luego se colocaron a 37 °C por 30 minutos, se sacaron y 10 minutos después se envuelven en papel seda o en papel de aluminio en paquetes de cuatro (4) láminas; se guardaron en cajas selladas a -20 °C hasta el momento de su uso.

ANEXO C

Protocolo Estandarizado Para IFI

1. Descongelar las placas con antígeno, dejarlas durante 5 minutos en agua destilada. Dejar secar en la cámara extractora o a temperatura ambiente.
2. Descongelar los sueros y mezclar suavemente en el *vortex*.
3. Hacer diluciones en serie de los sueros de 1:2 hasta 1:4096. Para hacer la dilución se sirve 50 μ l de PBS pH 7.2 y 50 μ l del suero, hacer diluciones seriadas.
4. Poner en contacto la dilución de los sueros con el antígeno. Sirviendo 15 μ l en cada pozo.
5. Incubar durante 45 minutos a 37°C en cámara húmeda.
6. Lavar las placas suavemente con PBS pH 7.2, dejar caer el chorro pero sin tocar directamente los pozos. Dejar 5 minutos en agua destilada y luego 5 minutos en PBS con un poco de agitación.
7. Dejar secar las placas en la cámara extractora o a temperatura ambiente.
8. agregar a cada pozo 15 μ l del conjugado (previa titulación 1:100) y utilizando 1% de azul de evans 1:5000 como colorante de contraste.
9. Incubar 45 minutos a 37°C en cámara húmeda.

10. lavar como en el 6.
11. Dejar secar las placas en la cámara extractora o a temperatura ambiente protegidas de la luz.
12. Coloque a cada placa una lámina utilizando glicerina tamponada como líquido de montaje. Evitar la formación de burbujas y el contacto con la luz.
13. Hacer la lectura de la reacción de la placa en el microscopio de fluorescencia utilizando el objetivo de 40 x y registre la dilución hasta la cual la fluorescencia persiste.

NEXO D

Cuantificación Del ADN

Se prepararon patrones de peso molecular conocido para la cuantificación del ADN a partir de bazo de ratón. Se sacrificaron ratones a los cuales se les extrajo el bazo, éste se maceró en un mortero hasta la completa homogeneización del órgano. Posteriormente el macerado se colocó en tubos de microcentrífuga con solución de lisis a 55°C durante toda la noche con agitación. Se realizaron dos extracciones con fenol cloroformo y precipitación con etanol de acuerdo al protocolo de Sambrook et al. (1989) descrito, se resuspendió el ADN en 200 μ l de TE y se hizo el tratamiento mencionado con ribonucleasa y una nueva extracción con fenol – cloroformo para la purificación.

Se confirmó la extracción del ADN mediante electroforesis en gel de poliacrilamida al 6%. El procedimiento para la cuantificación (dot spot) fue el siguiente:

1. En una caja de Petri se construye una cuadrícula para luego depositar las muestras.
2. Preparar de 12 – 15 ml de agarosa al 1% y agregar 1 μ l de bromuro de etidio (1 mg/ml).
3. Agregar la agarosa en la caja de petri y cubrir con papel aluminio hasta que endurezca.
4. Preparar diluciones de un marcador de peso molecular 100 bp DNA ladder (Promega) y 1kb plus DNA ladder (Gibco) y del ADN de bazo sembrar en la agarosa (Figura 1).

	A	B	C	D	E
1	mPM	dil1	dil2	dil3	dl4
2	ADNb	dil1	dil2	dil3	dl4
3					
4					

Figura 1. Esquema de la cuantificación de ADN. mPM: Marcador de peso molecular puro; dil 1 -4: diluciones; ADNb: ADN de bazo

Las muestras se incubaron durante una hora y se visualizaron con luz ultravioleta en un transiluminador Macro Vue Uvis – 20 (Hoefer). Las muestras se observaron como círculos concéntricos, los cuales se comparan para determinar la concentración del ADN de bazo a partir de la concentración conocida del marcador de peso molecular.

Una vez determinada la concentración del ADN de bazo, se realizaron diluciones que se utilizaron como patrones para determinar las concentraciones de las muestras de ADN de las cepas. Se realizaron diluciones entre 100 Y 2.0 ng.

ANEXO E



**CENTRO DE INVESTIGACIONES EN ENFERMEDADES
TROPICALES
UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER**

HISTORIA CLINICA LEISHMANIOSIS VISCERAL CANINA

Fecha: D ___ M ___ A ___

PERRO No.: _____

NOMBRE: _____	RAZA: _____
COLOR: _____	EDAD: _____
SEXO: _____	
PROPIETARIO: _____	
SECTOR: _____	CASA _____
No. DE PERROS EN LA CASA: _____	
ENFERMOS _____	MUERTOS (últimos años) _____
CAUSA _____	

EXAMEN FISICO:

ESTADO GENERAL: Bueno ___ Regular ___ Malo ___

SIGNOS:

ENFLAQUECIMIENTO: Severo ___ Moderado ___ Leve ___

LESIONES EN PIEL: SI ___ NO ___

ZONAS DEPILADAS: SI ___ NO ___

UÑAS LARGAS: SI ___ NO ___ Cms _____

EXAMENES DE LABORATORIO:

FROTIS SANGUINEO: SI ___ NO ___ Resultado: _____

PCR: SI ___ NO ___ Resultado: _____

ELISA: SI ___ NO ___ Resultado: _____

IFI: SI ___ NO ___ Resultado: _____

TRATAMIENTO

Muerto SI ___ NO ___

Otro _____

Observaciones:

Encuestador _____

ANEXO F

FICHA DE CONSENTIMIENTO

HOSPEDEROS

Autorizo al personal perteneciente al Centro de Investigaciones en Enfermedades Tropicales, **CINTROP**, de la UIS poder realizar en el perro _____ a mi cargo la toma de muestra sanguínea (sangre total) que tiene como objetivo realizar pruebas que diagnostiquen si el perro se encuentra infectado con el agente causal de la Leishmaniasis visceral.

Nombre _____

Firma _____

C.C. _____ de _____