

**EL PERRO DOMÉSTICO (*Canis familiaris*) COMO HOSPEDERO RESERVORIO
DE *Leishmania* (*Viannia*) spp. EN UN FOCO DE *Leishmania panamensis*.**

BETSI RUEDA CARVAJAL

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE BIOLOGÍA
BUCARAMANGA
2007**

**EL PERRO DOMÉSTICO (*Canis familiaris*) COMO HOSPEDERO RESERVORIO
DE *Leishmania* (*Viannia*) *spp.* EN UN FOCO DE *Leishmania panamensis*.**

BETSI RUEDA CARVAJAL

**TESIS DE GRADO PARA OPTAR POR EL TÍTULO DE
BIÓLOGA**

Director

**Dr. LUIS CARLOS OROZCO VARGAS, MD, MsC
ESCUELA DE ENFERMERÍA
UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE BIOLOGÍA
BUCARAMANGA**

2007

FINANCIACIÓN

Este trabajo fue financiado por COLCIENCIAS-Colombia (código 11020412926) y cofinanciado por la Universidad Industrial de Santander.

AGRADECIMIENTOS

Al doctor Luis Carlos Orozco por su valiosa orientación durante el desarrollo del proyecto, a la doctora Rocío Meneses por su tiempo y ayuda en el laboratorio. A los Doctores Laura A. Vásquez y Cristian A. Ramírez médicos veterinarios, a la red de Trabajadores en Salud Comunitarios (TSC) por su labor desinteresada, así como a todos los voluntarios de las veredas de estudio.

A todas las personas que durante el transcurso de mi carrera me ayudaron de una u otra manera.

A Gerardo, Lukas Francisco y Daniel Mateo por su tiempo, su paciencia y su amor.

TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN	1
1. MARCO TEÓRICO	4
1.1 Leishmaniasis	4
1.2 Agente Etiológico	6
1.3 Vector	8
1.4 Hospedero Reservorio	10
1.5 Leishmaniasis Canina	11
2. OBJETIVOS	14
2.1 General	14
2.2 Específicos	14
3. MATERIALES Y MÉTODOS	15
3.1 Área de Estudio	15
3.2 Población de Estudio	16
3.3 Toma de Muestras	16
3.4 Procesamiento de las muestras	16
3.4.1 ELISA	17
3.4.2 PCR	17
3.4.3 Aspirado de Ganglio	19
3.4.4 Cultivo	19
3.4.5 Visualización Microscópica	20
3.4.6 Xenodiagnóstico	20
3.5 Análisis de Datos	21
4. RESULTADOS	22
4.1 Examen Clínico	22
4.2 Pruebas Diagnósticas	24

4.3 Asociación de Signos y Pruebas diagnósticas	26
4.4 Xenodiagnósticos	28
5. DISCUSIÓN	31
6. CONCLUSIONES	35
7. RECOMENDACIONES	37
BIBLIOGRAFÍA	38
ANEXOS	45

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Especies de <i>Leishmania spp</i> que causan enfermedad en el nuevo mundo y los vectores probados o sospechosos.	7
Tabla 2. Distribución de perros por veredas en el foco Opón	22
Tabla 3. Distribución de perros por género de acuerdo a la edad	23
Tabla 4. Signos Clínicos de 106 perros habitantes de las seis veredas de estudio en el foco endémico de LTA en el Opón, Santander.	25
Tabla 5. Resultados de ELISA y PCR en 106 perros de las veredas de estudio del foco Opón.	26
Tabla 6. Asociación de signos clínicos y los métodos diagnósticos ELISA y PCR: Análisis bivariado.	27
Tabla 7. Modelo mínimo adecuado para perros E+ en el análisis multivariado	28
Tabla 8. Correlación de variables continuas con respecto a métodos diagnósticos ELISA y PCR	29
Tabla 9. Prevalencias por rango de edad para E+, P+	29
Tabla 10. Distribución de xenodiagnósticos por número de <i>Lutzomyia spp.</i> empleadas	30

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Distribución geográfica de leishmaniasis cutánea en Colombia (incidencia por municipios), 1994.	5
Figura 2. <i>Lutzomyia spp.</i>	9
Figura 3. Lesiones tegumentarias caninas causadas por <i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i>	13
Figura 4. Alopecia, onicogriphosis y lesiones ulcerativas en pierna de perros con leishmaniasis visceral causada por <i>Leishmania (Leishmania) infantum</i>	13
Figura 5. Localización de los principales focos de Leishmaniasis cutánea (LC) en Santander.	15
Figura 6. Jaulas empleadas para realizar Xenodiagnósticos	21
Figura 7. Apariencia de los perros típicos de la zona.	23-24
Figura 8. Distribución de Odds de E+ y P+ por edad para los perros habitantes de las seis veredas de estudio del foco Opón.	30

LISTA DE ANEXOS

	Pág.
Anexo A. Historia Clínica utilizada en campo para cada uno de los perros incluidos en el estudio.	45
Anexo B. Técnica de ELISA para anticuerpos anti-leishmania.	46
Anexo C. Técnica de PCR para identificación de <i>Leishmania</i> (<i>Viannia</i>) <i>spp.</i>	51

Título: EL PERRO DOMÉSTICO (*Canis familiaris*) COMO HOSPEDERO RESERVORIO DE *Leishmania* (*Viannia*) spp. EN UN FOCO DE *Leishmania panamensis*

Autor: BETSI RUEDA CARVAJAL

Palabras claves: *Leishmania panamensis*, perros, ELISA, PCR, hospedero reservorio, xenodiagnóstico, signos clínicos.

RESUMEN

Los factores clásicos de riesgo para la transmisión de *Leishmania panamensis*, como son un hospedero silvestre y la existencia de zonas selváticas han cambiado debido a la tala indiscriminada de los bosques y a la extinción del principal hospedero. No obstante la transmisión de *Leishmania panamensis* es continua presentando en humanos una incidencia muy alta si se compara con las tasas de infección natural de *Lutzomyia trapidoi* de tan solo 0.1%. Esto puede deberse a que este ciclo tradicional fue cambiado por uno doméstico donde aparece el perro como el principal sospechoso de ser hospedero reservorio. Mediante este trabajo realizado en el municipio de Landázuri Santander, endémico de *Leishmania panamensis*, se cuantificó la infección y la infecciosidad de los perros domésticos expuestos naturalmente a *Leishmania* (*Viannia*) spp., utilizando pruebas serológicas, moleculares y xenodiagnósticos y se logró correlacionar los signos clínicos con las pruebas diagnósticas. Los resultados mostraron que los perros positivos por ELISA se correlacionaron mejor que la PCR con los signos clínicos, tanto en el análisis bivariado como en el multivariado. La PCR arrojó mayor número de resultados positivos pero no resultó asociado con ninguna variable clínica. Los odds de los perros positivos por ELISA aumentan con la edad para posteriormente disminuir en perros viejos, contrariamente a lo que sucede con la PCR que se incrementa con la edad similar al comportamiento de la prueba de Montenegro en los humanos. Es muy probable que los animales viejos positivos por PCR pero negativos por ELISA, representen una subpoblación de caninos actuando como hospederos de punta muerta y que los perros positivos por ELISA independientemente del resultado de la PCR representen los verdaderos hospederos reservorios de *Leishmania panamensis*.

***PROYECTO DE GRADO**

***FACULTAD DE CIENCIAS ESCUELA DE BIOLOGÍA DIRECTOR: LUIS CARLOS OROZCO V.**

Title: THE DOMESTIC DOG (*Canis familiaris*) AS A RESERVOIR HOST OF *Leishmania* (*Viannia*) spp. IN A *Leishmania panamensis* FOCUS.

Author: BETSI RUEDA CARVAJAL

Key words: *Leishmania panamensis*, dogs, ELISA, PCR, reservoir host, xenodiagnosis, clinical features.

ABSTRACT

The classic risk factors for *Leishmania panamensis* transmission like a selvatic reservoir host and the existence of forestal areas had been changing due to forest destruction and extinction of the principal reservoir host. Hence the transmission of *Leishmania panamensis* is continuous with a high incidence rate in humans compared with natural infection in *Lutzomyia trapidoi*, only 0.1%. This can be due to changes in the traditional cycle to a domestic one where the dog is the principal suspected reservoir host. Throughout this work, carried out in Landázuri municipality, focus of *Leishmania panamensis*, we quantify the domestic dog infection and infectiveness naturally exposed to *Leishmania* (*Viannia*) spp., using parasitological, serological and molecular test, and xenodiagnosis and correlated the clinical signs with the diagnostic test. The results show a better relationship between ELISA positive test with some clinical signs in the bivariate and multivariate analysis. The PCR shows a higher number of positive results but was not associated to any clinical variable. The odds ratio for positive ELISA increases with age and then decreases in older dogs. In contrast, PCR increases steadily in the dog population, similarly to the Montenegro Skin Test in humans. Is very likely that an old animal with PCR positive and ELISA negative represents a subpopulation of dead end host and dogs with ELISA positive independently of PCR result, act as a reservoir host of *Leishmania panamensis*.

***PROYECTO DE GRADO**

***FACULTAD DE CIENCIAS ESCUELA DE BIOLOGÍA DIRECTOR: LUIS CARLOS OROZCO V.**

INTRODUCCION

La Leishmaniasis cutánea y mucocutánea, son causadas por parásitos protozoarios del género *Leishmania* (*L.*). En el nuevo mundo existen dos subgéneros: *Leishmania* y *Viannia*. *Leishmania* (*Viannia*) *panamensis* causa esta enfermedad en 8 países en Centro y Suramérica (Desjeux, 1992; Davies et al., 2000), causando lesiones incapacitantes y cicatrices deformantes, la mayoría de las veces en la cara y en personas jóvenes. La distribución geográfica de *L. panamensis* coincide con la de los perezosos (*Choloepus hoffmani*), considerados reservorios “tradicionales” y las especies de *Lutzomyia trapidoi* y *Lutzomyia ylephiletor*, que se piensa son los principales vectores (WHO, 1990). Adicionalmente, los factores clásicos de riesgo para infección en humanos involucran exposición ocupacional cuando los humanos entran a la selva (Christensen et al., 1983; Weigle et al., 1993), en busca de nuevos terrenos para la siembra de sus cultivos y el pastoreo de sus animales.

En focos hiperendémicos de la patología como el localizado en el municipio de Landázuri, Santander, Colombia, estos reservorios “tradicionales” están al borde de la extinción (Muñoz, 1998), debido a la caza indiscriminada. Además, las áreas endémicas continúan siendo deforestadas en busca de nuevos sitios para construcción de viviendas, implementación de cultivos, cría y levante de animales o la explotación económica de especies nativas. A pesar de esto la tasa de incidencia de *L. (V.) panamensis* continúa aumentando. Como es esto posible? La respuesta puede estar dada por patrones cambiantes de la transmisión de *L. (V.) panamensis*, ya que el ciclo de transmisión se pudo haber adaptado a áreas y reservorios domésticos, donde el parásito ha encontrado otro tipo de hospedero.

Basados en estudios previos realizados por Muñoz entre 2000 y 2003 (sin publicar) en 441 perros de la zona del Opón donde se practicaron pruebas diagnósticas de ELISA y PCR, se demostró como el 15% de los animales se encontraba sero-positivo y/o positivo por PCR y se logró cultivar *L. (V.) panamensis* de algunos animales. Esto nos lleva a formular la hipótesis de la importancia del perro doméstico en la transmisión del parásito como reservorio infeccioso, sirviendo como fuente de infección al humano. Evidencia de transmisión doméstica de Leishmaniasis Tegumentaria Americana (LTA) se ha comprobado para *L. braziliensis* en Argentina (Salomón et al., 1992), Bolivia (Le Pont et al., 1989), Brasil (Rangel et al., 1984; De Queiroz et al., 1994), Venezuela (Scorza et al., 1984; Feliciangeli et al., 1994) y Colombia (Alexander et al., 1995). Igualmente para *L. peruviana* en Perú (Villaseca et al., 1993; Davies et al., 1997) y para *L. panamensis* en Ecuador (Mouchet et al., 1994), Panamá (Christensen et al., 1983), Costa Rica (Zeledon et al., 1985; Herrero et al., 1992) y Colombia (Morales et al., 1981; Muñoz & Davies, 2006).

En el foco de Landázuri más de 90% de la población humana está infectada con *L. panamensis* antes de llegar a los 15 años de edad como consecuencia de una fuerza de infección alta (Muñoz & Davies, 2006, Davies et al., 1995), estimándose λ en 0.19 casos por año (19 infecciones por cada 100 susceptibles), cifra muy elevada si se compara con los hallazgos de infección natural de *Lu. trapidoi* en la misma zona geográfica, que fue de tan solo 0.1% (Muñoz, 1998).

Esta clara evidencia de transmisión doméstica deja la posibilidad de la existencia de un reservorio doméstico en dicho ambiente. El candidato más probable es el perro doméstico debido a que: i) la tenencia de perros es frecuente en esta área y la exposición a los vectores alta, ii) la infección natural de *L. (V.) panamensis* en los perros domésticos ha sido previamente identificada en Costa Rica (Desjeux, 1991), Panamá (Christensen et al., 1983), Colombia (Corredor et al., 1990) y Ecuador (Dereure et al., 1994), iii) los perros ya han sido incriminados como

reservorios de *L. (L.) infantum* y son hospederos reservorios sospechosos de *L. (V.) peruviana*, *L. (V.) braziliensis* y *L. (L.) tropica* (WHO, 1990) y iv) Se ha demostrado previamente la infección de *Lu. whitmani* (Vexenat et al., 1986) y *Lu. youngi* (Hernández et al., 2006) a partir de perros infectados con *L. (V.) braziliensis* mediante xenodiagnóstico.

El canino como fuente de infección representa un problema epidemiológico ya que los animales asintomáticos (aquellos que no presentan signos ni síntomas de la enfermedad) actúan como hospederos reservorios anónimos. Otro factor importante a tener en cuenta es el tiempo de aparición de la sintomatología que puede ser de varios meses después de haber sido infectados, aumentando la posibilidad de diseminación de la enfermedad.

Para LTA se ha presentado una dificultad en la incriminación del perro como hospedero reservorio dado que: i) los resultados de los métodos diagnósticos empleados han resultado disímiles tanto en estudios foráneos (Reithinger et al, 2002, Ashford et al, 1995) como en los realizados previamente en el foco del Opón (Muñoz 2000-2003, sin publicar) y ii) no se ha demostrado el papel del perro doméstico en el curso de la infección y su capacidad de infectar a los vectores por Xenodiagnóstico. La dificultad en la identificación de perros infectivos e infecciosos hace que se subestime la magnitud del problema haciendo difícil la implementación de estrategias de control. Por lo tanto, el presente estudio pretende determinar el papel del perro doméstico en el ciclo de transmisión de *L. panamensis* ya sea como hospedero reservorio-infeccioso, o como un hospedero “punta muerta”, midiendo la capacidad de transmisión perro-vector. También es importante determinar un método diagnóstico costo eficiente que permita identificar el estatus del perro como reservorio de *L. panamensis*. Esto se traducirá en un impacto sanitario ya que diagnosticando al hospedero reservorio y tomando medidas de control frente a este, disminuirá la transmisión al humano.

1. MARCO TEÓRICO

1.1 Leishmaniasis

La Leishmaniasis es una enfermedad causada por el parásito protozoario del género *Leishmania*, que puede afectar la piel, las mucosas, los tejidos y órganos hematopoyéticos como la médula ósea, el hígado y el bazo (Herrer & Christensen, 1976). Tiene varias presentaciones clínicas dependiendo de la especie del parásito que la produce y del tejido u órgano que afecta, estas formas clínicas son: Leishmaniasis cutánea, mucosa y visceral (Pearson & De Queiroz, 1996).

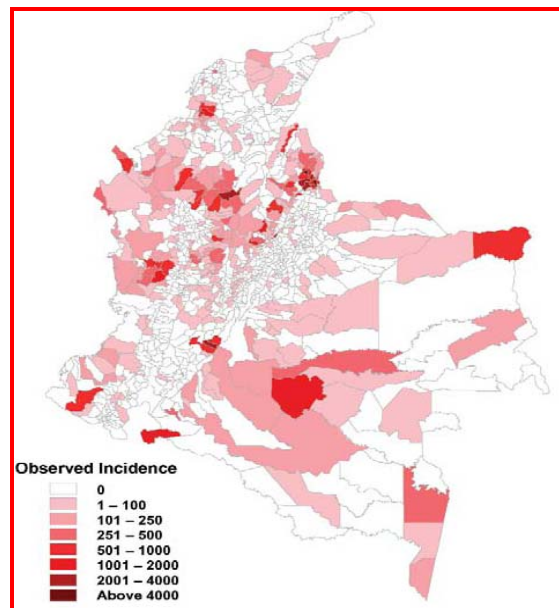
La Leishmaniasis Cutánea (LC) es causada por especies de los subgéneros *Leishmania Viannia* y *Leishmania Leishmania* y se distribuye desde el sur de los Estados Unidos, hasta el norte de Argentina (Pearson & De Queiroz, 1996; Grimaldi et al, 1987). Se puede presentar como leishmaniasis cutánea localizada o como leishmaniasis cutánea difusa. Presenta un periodo de incubación que puede ir desde dos semanas hasta dos meses iniciando con un nódulo pequeño que aumenta de tamaño, se ulcera formando una lesión simétrica, redondeada u ovalada y con bordes levantados (Hernández, 2006; Pearson & De Queiroz, 1996). Se presenta necrosis en el centro como parte de la respuesta inmune del hospedero, sobreinfectándose algunas veces; concomitantemente puede haber eritema y descamación. Los parásitos invaden los cordones linfáticos produciendo linfadenopatías regionales en el sitio de drenaje de la lesión (Hernández, 2006) comúnmente en forma de rosario. Algunas veces las lesiones pueden llegar a resolverse de manera espontánea dependiendo de la especie del parásito involucrado. En el foco endémico de *L. (V.) panamensis* localizado en el municipio de Landázuri, Santander, la especie implicada corresponde a *Leishmania panamensis* (Muñoz & Davies, 2006). Además existen muchos focos de

leishmaniasis distribuidos en toda Colombia, principalmente en áreas rurales (Figura 1.), muchos de ellos alejados de los centros de atención en salud.

La Leishmaniasis Mucosa (LM) es causada por *L. (V.) braziliensis* o *L. (V.) panamensis* y se presenta en mucosa de nariz o paladar con posterioridad a la presentación de la infección cutánea. La invasión del parásito a la mucosa se observa inicialmente como hiperemia y congestión nasal llevando a la formación de nódulos que confluyen y ulceran el tabique nasal (Herrer & Christensen, 1976).

El agente causal de la Leishmaniasis Visceral (LV) es *L. (L.) donovani* en Africa, India y Asia (Pearson & De Queiroz, 1996) *L. (L.) infantum* en el Mediterraneo y *L. (L.) chagasi* en Latinoamérica, las cuales afectan principalmente a niños menores de 5 años. La LV se ha convertido en una enfermedad oportunista para pacientes con VIH, presentando muy mal pronóstico.

Figura 1. Distribución geográfica de leishmaniasis cutánea en Colombia (incidencia por municipios) 1994.



1.2 Agente etiológico

Los parásitos del género *Leishmania* son protozoarios pertenecientes al orden Kinetoplástida, suborden Trypanosomatina, familia Trypanosomatidae (Grimaldi & Tesh, 1993). Existen cerca de 30 especies que se agrupan en complejos y estos se agrupan de acuerdo con las características bioquímicas, moleculares, epidemiológicas y clínicas en dos subgéneros: el subgénero *Leishmania* (*L.*) cuyas especies se encuentran tanto en el viejo como en el nuevo mundo y *Viannia* (*V*) especies restringidas al continente americano (Shaw, 1994; Grimaldi et al., 1989; Grimaldi et al., 1991). En el nuevo mundo se reconocen un total de 20 especies de las cuales 17 pueden infectar al hombre (Shaw, 1994) (Tabla 1.).

Poseen un ciclo de vida dimórfico, con una fase en humanos u otros mamíferos susceptibles y otro en vectores invertebrados. La fase en humanos se presenta en la forma de amastigotes intracelulares en macrófagos, con forma ovalada o redonda de 2 a 3 micras de diámetro. El núcleo excéntrico se encuentra cerca del kinetoplasto que contiene gran cantidad de DNA extranuclear arreglado en forma de minirculos y maxirculos. Los amastigotes están adaptados a la temperatura corporal y al medio ácido de los fagolisosomas de los macrófagos. La multiplicación ocurre por fisión binaria (Pearson & De Queiroz, 1996).

Los amastigotes ingeridos con la sangre pasan a la forma de promastigotes en el intestino de los flebótomos, los cuales tienen morfología alargada y miden 20 micras. En el intestino se replican y se diferencian a promastigotes metacíclicos en un periodo de aproximadamente una semana y de allí pasan al humano cuando estos son regurgitados con la saliva al momento de la picadura completándose el ciclo vital (Pearson & De Queiroz, 1996). Los promastigotes poseen un núcleo central y un kinetoplasto terminal o subterminal, en la parte anterior de donde se origina un flagelo, casi de igual tamaño que el cuerpo.

Tabla 1. Especies de *Leishmania spp.* que causan enfermedad en el nuevo mundo y los vectores probados o sospechosos.

Parásito	Vector	Distribución geográfica
<i>L. braziliensis</i>	<i>Lu. wellcomei</i> , <i>Lu. yucumensis</i> , <i>Lu. llanos martinsi</i> , <i>Lu. spinicrassa</i> , <i>Lu. whitmani</i> , <i>Lu. Carrerai</i> , <i>Lu. intermedia</i> ?, <i>Lu. squamiventris</i> ?, <i>Lu. ovallesi</i> ?, <i>Lu. lichyi</i> ?	Argentina, Belize, Bolivia, Brasil, Colombia, Costa Rica, Ecuador, Guatemala, Honduras, Nicaragua, Panamá, Paraguay, Perú, Venezuela
<i>L. peruviana</i>	<i>Lu. peruensis</i> ?, <i>Lu. verrucarum</i> ?	Perú
<i>L. guyanensis</i>	<i>Lu. umbratiis</i> , <i>Lu. anduzei</i> , <i>Lu. whitmani</i> , <i>Lu. ovallesi</i> ?	Brasil, Colombia, Ecuador, Guiana Francesa, Guyana, Perú, Surinam, Venezuela
<i>L. panamensis</i>	<i>Lu. trapidoi</i> , <i>Lu. gomezi</i> , <i>Lu. ylephiletor</i> , <i>Lu. panamensis</i>	Colombia, Costa Rica, Ecuador, Honduras, Nicaragua, Panamá, Venezuela
<i>L. lainsoni</i>	<i>Lu. ubiquitous?</i>	Brasil, Perú
<i>L. naiffi</i>	<i>Lu. isquamiventris</i> , <i>Lu. paraensis</i> ?, <i>Lu. ayrozai</i> ?	Brasil
<i>L. colombiensis</i>	<i>Lu. hartmanni</i> ? <i>Lu. Gomeza</i> ? <i>Lu. panamensis</i> ?	Colombia, Panamá, Venezuela
<i>L. shawi</i>	<i>Lu. whitmani</i>	Brasil
<i>L. mexicana</i>	<i>Lu. olmeca olmeca</i> , <i>Lu. diabolica</i> ? <i>Lu. christophei</i> ? <i>Lu. ayacuchensis</i> ?	Belice, Colombia, Costa Rica, República Dominicana, Ecuador, Guatemala, Honduras, México, Panamá, Estados Unidos, Venezuela
<i>L. amazonensis</i>	<i>Lu. flaviscutellata</i> , <i>Lu. olmeca nociva</i> ?, <i>Lu. reducta</i> ?, <i>Lu. youngi</i> ?	Bolivia, Brasil, Colombia, costa Rica, Ecuador, Guiana Francesa, Panamá, Perú, Venezuela
<i>L. venezuelensis</i>	<i>Lu. olmeca bicolor</i> ? <i>Lu. trinidadensis</i>	Venezuela

(?) Vector sospechoso. Tomado de Grimaldi & Tesh, 1993

Morfológicamente todas las especies del género *Leishmania* son similares, con diferencias en el comportamiento biológico, inmunológico, tipo de enfermedad que producen y distribución geográfica. Su clasificación se fundamenta en la movilidad electroforética de enzimas de las diferentes especies, anticuerpos monoclonales especie-específicos o pruebas de DNA (Grimaldi & Tesh, 1993).

Con referencia a la virulencia del parásito se reconoce que: i) La infectividad varia entre aislados de una misma especie, ii) los amastigotes son generalmente más

infectivos que los promastigotes, iii) los promastigotes móviles activos de la fase estacionaria del crecimiento son más infectivos que la forma delgada y grande de la fase de crecimiento logarítmica, iv) los promastigotes frecuentemente pierden la infectividad después de largos períodos de cultivo in vitro, v) los cambios en la virulencia que son observados en las diferentes fases de crecimiento o después de cultivos prolongados, se desarrollan paralelamente con cambios bioquímicos y antigénicos en el parásito y vi) durante el proceso de diferenciación del promastigote (metacíclico) a amastigote hay un incremento en la expresión de ciertos genes necesarios para la sobrevivencia en el medio hostil de los fagolisosomas del macrófago (Grimaldi & Tesh, 1993) .

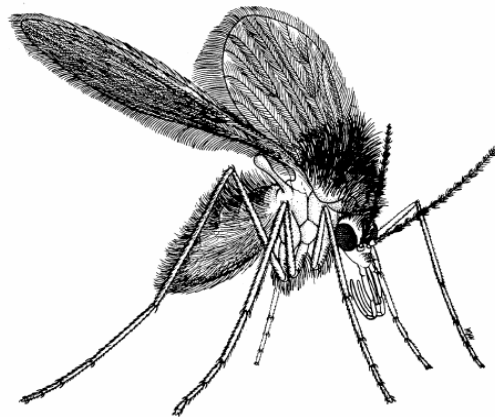
1.3 Vector

Los vectores de leishmaniasis se clasifican como orden Díptera, familia Psychodidae, subfamilia Plebotominae, géneros *Lutzomyia* y *Plebotomus* dependiendo de su distribución geográfica, la cual puede ser muy amplia, la mayoría de las especies se encuentran en regiones tropicales o subtropicales. En el nuevo mundo el género *Lutzomyia* es el principal vector y en Europa, Asia y África corresponde al género *Plebotomus* (Pearson & De Queiroz, 1996).

Las *Lutzomyia* son moscas pequeñas de 1,5 – 2 mm de tamaño, con su cuerpo cubierto de pelos y alas erectas en forma de “V” (Figura 2.). Poseen una forma de volar muy característica dando saltos y mantienen un vuelo bajo y silencioso. Pueden volar hasta 200 metros de donde se cría pero el viento los puede arrastrar a distancias mayores. Generalmente su actividad de picadura se da en horas crepusculares, entre las 18:00 y 22:00 y las 04:00 y las 05:30 (Ward, 1989). La picadura del vector es muy dolorosa, dejando una mancha roja y circular. Es conocido con nombres tan diversos como pringador, jején, quemador o aliblanco; en Landázuri se conoce como Zolamilla.

La identificación de los flebotomíneos se basa en características morfológicas, tanto del macho como de la hembra, principalmente de las armaduras genitales (genitalia), la longitud y disposición de las venas de las alas y las partes bucales (faringe y cibarium) (Young, 1979).

Figura 2. *Lutzomyia spp*



Su hábitat se encuentra de preferencia en lugares húmedos, oscuros y donde hay bastante vegetación. De esta manera cuando el ser humano vive en zonas donde existe el vector, o ingresa a estas áreas por causa de trabajo, corre el riesgo de ser infectado. Cerca de 400 especies de mosquitos son conocidas en el nuevo mundo, pero sólo el 10% son vectores probados o sospechosos de Leishmaniasis (Killick-Kendrick, 1990).

La *Lutzomyia spp.* hembra ingiere macrófagos infectados con amastigotes cuando se alimenta con sangre de un reservorio mamífero infectado. En el viejo mundo cada vector tiende a transmitir solo una especie de *Leishmania spp.*, en contraste con los vectores de la leishmaniasis del nuevo mundo que soportan infecciones de varias especies. Las *Lutzomyia spp* entran a las casas continuamente en busca de

alimento y en los periodos de lluvia su presencia se incrementa en las viviendas, sugiriendo una conducta altamente antropofílica y endofílica, lo cual permite periodos prolongados de contacto hombre-vector (Perez & Ogozuku, 1994). Las mismas especies que atacan al hombre (especies antropofílicas) presentan gran afinidad por el perro, lo cual podría representar una transmisión intradomiciliaria teniendo como hospedero reservorio al perro o al mismo humano.

En el municipio de Landázuri zona de transmisión de LTA las especies más importantes por su abundancia y su presencia tanto en intradomicilio como en el peridomicilio son *Lu. gomezi*, *Lu. trapidoi*, *Lu. panamensis*, *Lu. ovallesi*, y *Lu. yuilli* (Muñoz, 1998). Las principales especies implicadas como vectores en las Américas se encuentran resumidas en la tabla 1.

1.4 Hospedero reservorio

La distribución geográfica de *L. (V.) panamensis* coincide con la superposición de la distribución de los perezosos de dos dedos (*Choloepus hoffmani*) (Ashford 1996), que se considera el principal reservorio, y las especies de *Lutzomyia trapidoi* y *Lutzomyia ylephiletor*, que se piensa son los principales vectores (WHO, 1990). El foco de *L. (V.) panamensis* ubicada en la zona del Opón es un área húmeda tropical, ubicada en el departamento de Santander, el cual presenta una alta incidencia de Leishmaniasis a pesar de factores tales como una alta y continua deforestación de los bosques para construcción de viviendas y el desplazamiento de los reservorios tradicionales, cambiando los ciclos de transmisión de la enfermedad, obligando al parásito a encontrar nuevos hospederos.

El perro doméstico es el principal sospechoso de estar actuando como hospedero reservorio en este nuevo ciclo de transmisión ya que se encuentran en gran

número en las viviendas, y además han sido incriminados como reservorios de *L. (V.) braziliensis* en Argentina (Salomón et al., 1992), Bolivia (Le Pont et al., 1989), Brasil (Rangel et al., 1984; De Queiroz et al., 1994), Venezuela (Scorza et al., 1984; Feliciangeli et al., 1994), Colombia (Alexander et al., 1995). *L. (V.) peruviana* en Perú (Villaseca et al., 1993; Davies et al., 1997) y *L. (V.) panamensis* en Ecuador (Mouchet et al., 1994), Panamá (Christensen et al., 1983), Costa Rica (Zeledón et al., 1985; Herrero et al., 1992) y Colombia (Morales et al., 1981; Muñoz & Davies, 2006).

1.5 Leishmaniasis canina

La leishmaniasis visceral en perros actuando como reservorios se encuentra asociada a *L. (L.) infantum* en el viejo mundo y *L. (L.) chagasi* (= *L. infantum*) en el neotrópico (Palatnik-de-Sousa et al., 2001).

La Leishmaniasis canina producida por *L. (L.) infantum* es una enfermedad sistémica severa cuyas manifestaciones clínicas incluyen lesiones ulcerativas de la piel, nódulos (Reithinger et al., 2003), linfadenopatía, pérdida de peso (Poot et al., 2005), onicogriposis, alopecia, dermatitis, anemia, coagulopatías y diarrea (Travi et al., 2001; Solano-Gallego et al., 2001). La afección puede iniciar con una lesión cutánea, localizada o múltiple con diseminación del parásito evidente por la descamación epidérmica y alopecia difusa especialmente a nivel de la cabeza. También se puede presentar en una pequeña minoría diseminación desde la lesión cutánea primaria a vísceras y mucosas por vía linfática (Reithinger et al., 2002) similar a la causada en humanos.

Son clásicas la despigmentación y depilación peri-orbital que puede afectar también a otras regiones del cuerpo (cadera, cola y punto de apoyo a nivel de las extremidades). Otros signos cutáneos como la hiperqueratosis y la presencia de

caspa son frecuentes. Pueden aparecer lesiones ulcerativas a nivel del cráneo borde externo de las orejas (Figura 3.), punto de apoyo a nivel de las extremidades, de los cojinetes plantares, morro, espacios interdigitales y zonas mucocutáneas (Figura 3.), lesiones nodulares o dermatitis pústular (Madeira et al., 2003). Otro de los signos frecuentes es la onicogriposis (Strauss-Ayali & Baneth, 2000) (Figura 4.).

Ocasionalmente se han descrito lesiones cutáneas de despigmentación nasal, hiperqueratosis nasal y plantar (Strauss-Ayali & Baneth, 2000) y placas eritematosas, las formas nodulares son menos frecuentes. Uno de los síntomas característicos es la caquexia seca, consecuencia de la pérdida de apetito, aunque en ocasiones el adelgazamiento no es debido a la pérdida del apetito sino a un síndrome de mala absorción a nivel intestinal. Como consecuencia del adelgazamiento se produce un cuadro de astenia y debilidad que puede presentarse también asociado a depresión. La amiotrofia es particularmente marcada en la cabeza (cara) dando al animal un aspecto enfermo, triste y viejo. Otros signos clínicos asociados a la patología son poliartritis acompañada de dolor y atrofia muscular. A nivel digestivo vómito, colitis crónica diarrea hemorrágica y pancreatitis.

Los signos clínicos que se presentan con más frecuencia en perros con LTA causada por *L. (V.) braziliensis* son presencia de úlceras en piel de escroto, hocico y prepucio (Hernández et al., 2006; Madeira et al., 2005), con probable diseminación del parásito por vía sanguínea (Figura 3.).

Figura 3. Lesiones tegumentarias caninas causadas por *Leishmania (Viannia) braziliensis*



Tomado de Madeira et al., 2003

Figura 4. Alopecia, onicogrifosis y lesiones ulcerativas en pierna de perros con leishmaniasis visceral causada por *Leishmania (Leishmania) infantum*



Tomado de Strauss-Ayali & Baneth, 2000

2. OBJETIVOS

2.1 General

Determinar el papel del perro doméstico en el ciclo de transmisión de *Leishmania spp.* en un foco de *Leishmania (Viannia) panamensis* mediante pruebas serológicas, parasitológicas y Xenodiagnóstico en Landázuri, Santander, Colombia.

2.2 Específicos

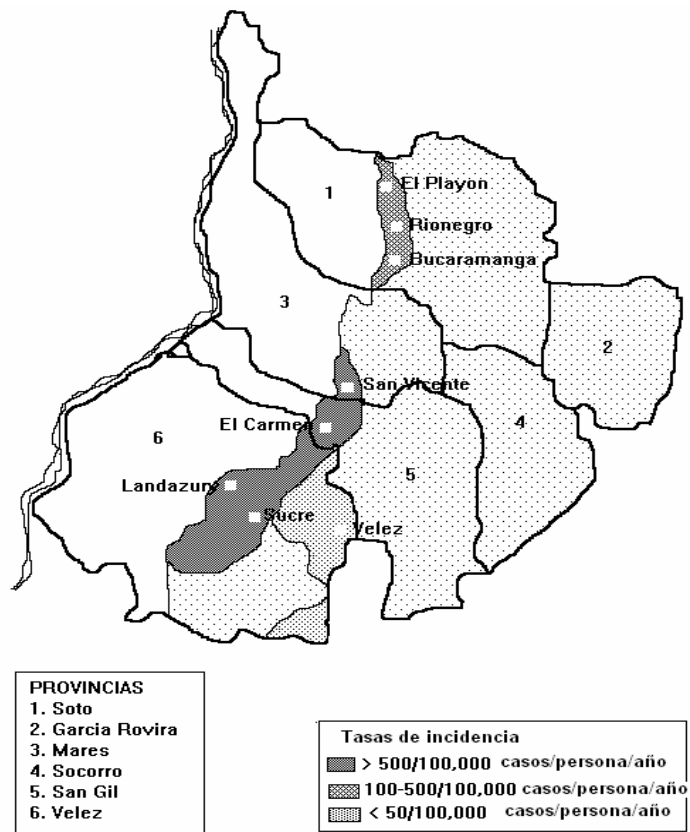
- Determinar el estado clínico de perros habitantes en 6 veredas del municipio de Landázuri
- Evaluar el grado de infección de perros mediante técnicas moleculares y serológicas en sangre circulante
- Medir la infecciosidad de los perros diagnosticados como positivos a los *Lutzomyia spp.* mediante Xenodiagnóstico
- Correlacionar los resultados de la metodología diagnóstica con los datos obtenidos del estudio clínico.
- Determinar el tipo de muestra y el método más sensible en el diagnóstico de la leishmaniasis canina que se puedan utilizar en programas de salud Pública

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Área de estudio

El presente estudio fue llevado a cabo en el municipio de Landázuri, departamento de Santander, Colombia (6°, 20' N; 73°, 43' W) (Figura 5.). Comprendió 6 veredas: Las Delicias, La Dorada, Plan de Armas, Buenos Aires, Popayán y Cucuchonal. Esta área se caracteriza por ser una región montañosa donde los cultivos tradicionales como cacao y pasto han ido reemplazando al bosque primario, el cual se encuentra alejado de los lugares de vivienda (Muñoz, 1998).

Figura 5. Localización de los principales focos de Leishmaniasis cutánea (LC) en Santander



3.2 Población de Estudio

La población estuvo conformada por perros tomados consecutivamente mediante muestreo casa a casa y marcados detrás de la oreja con un número. Se les realizó examen clínico e historia por parte de dos médicos veterinarios, la cual indagó sobre presencia o ausencia de signos clínicos compatibles con leishmaniasis y datos del estado general del perro. Algunos datos fueron suministrados por el propietario (Anexo A).

3.3 Toma de muestras

Una vez obtenido el consentimiento de los propietarios los perros fueron inmovilizados utilizando una cuerda y bozal para la toma de sangre, mediante venopunción previa limpieza con solución antiséptica. Se tomaron dos muestras de 5 ml., una con EDTA para PCR y otra para serología (ELISA). La muestra con anticoagulante fue sometida a centrifugación a 3000 r.p.m. por 5' para obtener buffy coat (BC). Las muestras se conservaron refrigeradas hasta su procesamiento. De la sangre total de todos los animales se sembraron unas gotas en el medio bifásico NNN con fase líquida de MEM y se practicó un extendido para coloración de Giemsa.

Aquellos perros con inflamación de ganglio poplíteo fueron sometidos a aspirado usando jeringas de 3 ml., conteniendo solución salina y antibióticos (1000 U/ml penicilina, 1000 µg/ml estreptomicina). El contenido se utilizó para PCR, cultivo y extendido en placa. Se seleccionaron para xenodiagnóstico los animales positivos por ELISA y/o PCR.

3.4 Procesamiento de las muestras

3.4.1 ELISA

Los anticuerpos IgG contra *Leishmania* utilizando antígeno de *Leishmania panamensis* se midieron por ELISA (Quinnel et al, 1997) a partir de suero.

Para sensibilizar las placas se realizó cultivo en masa de *Leishmania panamensis* cepa LS94 en medio mínimo esencial suplementado con 10% de suero bovino fetal, se lavó por 3 veces en PBS para posterior sonicación. Luego de sensibilizada la placa se procesaron los sueros desconocidos (cada suero por duplicado), junto con suero control positivo, suero control negativo, blancos de prueba (todos los reactivos excepto muestra de suero) y blanco de antígeno; se adicionó conjugado (anti-dog IgG-alkaline phosphatase) y se reveló la reacción al agregar paranitrofenil fosfato. La lectura se realizó a 610 nm en el lector Dynatech (Anexo B).

El punto de corte se estableció mediante curva ROC tomando como controles negativos sueros de perros provenientes de clínicas veterinarias de la ciudad de Bucaramanga localizadas en barrios de estrato socio económico alto. Los controles positivos correspondieron a sueros de animales que en una cohorte previa se les logró aislar el parásito. El punto de corte correspondió a una densidad óptica de 0.5 en una prueba que contenía antígeno (LS94) a una concentración de 30 µg/dl, suero diluido 1: 100 y conjugado 1:1500.

3.4.2 PCR:

3.4.2.1 Lisis y extracción de ADN (Salting – out)

Se Centrifugó a 1600 r.p.m. por 10 min., se removieron 2/3 partes de plasma y se lavó por 3 veces con buffer TE 1X pH 7.5. El sedimento se resuspendió en buffer RCLB (10 mM Tris-Cl [pH 7.5], 5mM MgCl₂ , 10 mM NaCl). Cuando el precipitado estuvo libre de glóbulos rojos se adicionó buffer WCBL (10 mM Tris-Cl pH 7.5, 10

mM EDTA pH 8.0, 50 mM NaCl), proteinasa K y duodecil sulfato de sodio (SDS) al 10%, por último se realizó incubación a 60°C en baño seco por 30 min, y se finalizó el proceso con la extracción de ADN por salting out utilizando el Kit de Promega.

3.4.2.2 Amplificación de DNA

El DNA blanco es la secuencia conservada del minicírculo kDNA presente en todas las especies de *Leishmania (Viannia) spp.* (De Bruijn & Barker 1992). Se usaron los primers B1 (5'- GGG GTT GGT GTA ATA TAG TGG - 3') y B2 (5'- CTA ATT GTG CAC GGG GAG - 3') que amplifican un fragmento de 750 pb. El buffer de reacción contiene 16mM KCl, 40mM Tris-HCl (pH 8.0), 3.5 mM MgCl₂, ASB 3.75 mg/ml, 200 µM de dNTPs, 1.6 pM de cada oligonucleótido, 0.6 unidades de titanium Taq polimerasa (BD biosciences) y 1 µL de DNA a volumen final 20 µL, después de la denaturación inicial (95°C por 5 min) se programaron 35 ciclos así: denaturación 95°C por 30 seg, y anillamiento a 60°C por 1 min; seguidos de una denaturación a 95°C por 1 min, anillamiento a 60°C por 3 min y extensión a 72°C por 3 min (Anexo C).

Cada ciclo incluyó varios controles positivos y negativos de las mismas fuentes que los utilizados en el ELISA. Los amplificados se analizaron por electroforesis en gel de agarosa 1.8% (90 volt por 1 hora) y se visualizó bajo UV (Weigle et al., 2002; Aransay et al., 2000). Los amplificados de algunas muestras fueron procesados en la Escuela de Higiene y Medicina Tropical de Londres para demostrar que la hibridización correspondió a las secuencias de los minicírculos. En resumen, fueron transferidos (Southern blot) a membranas de nylon para hibridización con el oligo primer B3 (5'- TTG AAC GGG GTT TCT GTA TG - 3') marcado con ³²P-ATP por 8 horas previas a la autoradiografía.

Con el fin de evaluar la degradación del DNA o la inhibición de la PCR, se amplificaron muestras de DNA para el gen de fosfoproteína ribosomal canina, usando los primers PO3 (5'- GGA GAA GGG GGA GAT GTT 3') y PO5 (5'- TCA TTG TGG GAG CAG ACA - 5') (Ashford et al., 1995). El buffer de reacción contenía 16mM KCl, 40mM Tris-HCl (pH 8.0), 3.5 mM MgCl₂, ASB 3.75 mg/ml, 200 µM de dNTPs, 10.25 pM de PO3, 10.75 pM de PO5, 0.45 unidades de titanium Taq polimerasa (BD biosciences) y 1 µL de DNA a volumen final 20 µL. La reacción se realizó bajo las siguientes condiciones: denaturación inicial 96°C por 5 min y se programaron 33 ciclos que incluyeron denaturación a 95°C por 30 seg, anillamiento a 60°C por 30 seg y extensión a 72°C por 30 seg, seguido por extensión final a 72°C por 10 min.

Todas las muestras fueron amplificadas dos veces. Si los resultados eran contradictorios, una tercera y definitiva prueba se llevó a cabo.

3.4.3 Aspirado de ganglio poplíteo

El aspirado se tomó con jeringas de 3 ml. conteniendo solución salina y antibióticos (1000 U/ml penicilina, 1000 µg/ml estreptomicina). Parte de este se congeló para PCR y el resto se cultivó en medio NNN/MEM para aislamiento del parásito. Una gota de la jeringa se utilizó para coloración con GIEMSA.

3.4.4 Cultivo:

Inmediatamente luego de tomadas las muestras de sangre total y de ganglio poplíteo se inocularon en medio bifásico NNN/MEM conservando condiciones estrictas de esterilidad. El material se incubó a temperatura ambiente y los chequeos se realizaron cada dos días con ayuda de microscopio de luz. Luego del aislamiento primario se realizó subcultivo en medio líquido MEM y posteriormente se realizó identificación de los parásitos.

3.4.5 Visualización microscópica:

Del material fresco que quedó en la aguja luego de tomadas las muestras de sangre total y los aspirados, se realizaron dos extendidos en placa y se colorearon con GIEMSA, posteriormente se observaron al microscopio de luz.

3.4.6 Xenodiagnóstico

Se utilizaron *Lutzomyia spp.* capturadas en el sitio de trabajo cuya tasa de infección natural fue de 0.1% (Muñoz, 1998). Para lograr el xenodiagnóstico los perros se dejaron una noche en una caja metálica (2 x 2 x 2 metros) con piso cómodo, la cual a su vez estaba metida en una tienda cuyo techo y paredes están contruidos en muselina y estaba bajo techo. Se introdujo en la tienda una cantidad considerable de *Lutzomyia spp.* (aprox. 100) capturadas mediante trampas CDC o cebo humano la noche anterior, además de las que entraron a la tienda durante el tiempo que esta se dejó abierta. Posteriormente se cerró la tienda permitiendo que los insectos se alimentaran toda la noche. Aquellos que tomaron sangre fueron aspirados del interior de la jaula en la mañana y mantenidos por 5 días en recipientes con apropiadas condiciones de humedad y solución de agua azucarada. Las *Lutzomyia spp.* sobrevivientes de cada perro fueron criopreservadas en nitrógeno líquido y transportadas al laboratorio. Se identificaron las sobrevivientes utilizando la clave de Young (Young, 1979), (Figura 6.)

3.4.6.1 Extracción de DNA de los intestinos de *Lutzomyia spp.* para realizar PCR

Los intestinos de las *Lutzomyia spp.* se maceraron en conjunto con pipeta Pasteur en tubos de 1.5 ml. Este pool se sometió a extracción por salting out como previamente se describió

Figura 6. Jaulas empleadas para realizar Xenodiagnósticos



3.5 Análisis de datos

Se realizaron análisis univariados, bivariados y multivariados utilizando el software Stata/SE 9.1 (StataCorp 2005). Las medias fueron analizadas después de transformación con logaritmo cuando hubo necesidad para normalizar los datos y en los casos donde después de la transformación no se normalizaron se utilizó Kruskal Wallis. Se utilizó regresión logística binomial para el cálculo de las razones de prevalencia.

4. RESULTADOS

La población de perros estaba conformada por 106 animales presentes en las seis veredas (Tabla 2.) con una distribución por género de 69 machos (65.1%) (Tabla 3.) y un promedio de edad de 2.3 años (rango 0.3 – 14 años). La mortalidad canina es elevada por las condiciones en que son criados, dado que una familia mantiene una cantidad promedio de 3.65 perros en malas condiciones de alimentación. Es difícil encontrar un animal que supere los cuatro años de vida (14/106; 13%). El 92.4% de los perros en las seis veredas de estudio presentaban mas de dos signos clínicos con excepción de 8 que fueron asintomáticos.

Tabla 2. Distribución de perros por veredas en el foco Opón

VEREDA	PERROS POR VEREDA	%
Buenos Aires	12	11.32
Cucuchonal	22	20.75
La Dorada	19	17.92
Las Delicias	15	14.15
Plan de Armas	16	15.09
Popayán	22	20.75
Total general	106	100

4.1 Examen clínico

La apariencia física típica de un perro de la zona de estudio es aquella que presenta adelgazamiento, onicogrifosis, curvatura de uñas marcada y problemas cutáneos tipo alopecia (Figura 7; Tabla 4.), similar a la registrada en perros de

focos endémicos de leishmaniasis visceral. De igual manera se ha encontrado un gran porcentaje de perros con inflamación de los ganglios linfáticos poplíteos. Las úlceras en la piel no presentan la frecuencia esperada para perros de focos endémicos de Leishmaniasis cutánea (Tabla 4.).

Tabla 3. Distribución de perros por género de acuerdo a la edad

Edad (años)	Género		Total
	Machos	Hembras	
0.3 a 0.7	18	6	24
0.8 a 1.5	18	9	27
2 a 2.5	18	10	28
3 a 4	8	5	13
mas de 4	7	7	14
	69	37	106

Figura 7. Apariencia de los perros típicos de la zona. a) Perro con adelgazamiento, alopecia y onicogrifosis



b) Perro con presencia de úlceras en la piel



Predomina el tamaño mediano ($n = 44$; 41.5%) producto de entrecruzamiento de varias razas, conocidos como perros criollos, con un porcentaje alto de animales en riesgo de desnutrición ($n = 51$; 48.1%). La mitad de los perros de la zona muestran un comportamiento apático ante las diferentes actividades a que son sometidos (Tabla 4.).

4.2 Pruebas diagnósticas

Se practicaron exámenes diagnósticos en sangre total a todos los 106 perros, 52 de los cuales (49%) fueron positivos por PCR y/o ELISA, coincidiendo en 25 casos (23.58%). Excluyendo los coincidentes, los resultados positivos del PCR (P+) fueron seis veces más frecuentes que los positivos del ELISA (E+) (Tabla 5). Se obtuvo consentimiento para tomar aspirado de ganglio poplíteo en 47 de los 49 perros con inflamación, de los cuales nueve (9/47, 19%) fueron positivos por PCR. Estos nueve perros positivos resultaron también positivos para ELISA y PCR en BC. Los exámenes directos y los cultivos resultaron negativos en los 106 animales examinados.

Los resultados de la PCR indican la presencia de *Leishmania spp.* del subgénero *Viannia* y no se intentó llegar a la clasificación final de especie. Sin embargo en todos los aislamientos hechos en humanos desde el año 1985 y en uno previo hecho en un perro, los parásitos encontrados siempre han pertenecido a la especie *L. (V.) panamensis* (Muñoz & Davies, 2006). Nunca se ha aislado otra especie del complejo *Viannia*.

Tabla 4. Signos Clínicos de 106 perros habitantes de las seis veredas de estudio en el foco endémico de LTA en el Opón, Santander

	SIGNO	FRECUENCIA	%
PIEL	Alopecia	55	51,9
	Descamación	31	29,5
	Hiperqueratosis	35	33
	Nódulos	6	5,7
	Úlceras en piel	9	8,5
GANGLIOS	Inflamación	49	46,7
OJOS	Conjuntivitis	4	3,8
	Lagrimeo	13	12,3
DIGESTIVO	Diarrea	19	17,9
	Emesis	13	12,3
	Anorexia	10	9,4
GENITAL	Úlceras en escroto	11	15,9
UÑAS	Onicogriposis	56	52,8
	Curvatura de las uñas	54	50,9
OTROS	Apatía	55	51,9
SIGNOS	Adelgazamiento	75	70,7

Tabla 5. Resultados de ELISA y PCR en 106 perros de las veredas de estudio del foco Opón.

ELISA	PCR		Total general
	positivo	negativo	
positivo	25 (23,58%)	4 (3,77%)	29 (27,4%)
negativo	23 (21,7%)	54 (50,94%)	77 (72,6%)
Total	48 (45,3%)	58 (54,71%)	106 (100%)

4.3 Asociación de signos y pruebas diagnósticas

Del total de 106 perros 8 (7.54%) fueron asintomáticos, 7 de ellos negativos tanto para ELISA como para PCR, el octavo perro fue PCR+. Utilizando variables discretas de características clínicas, los perros E+ en el análisis bivariado se correlacionaron con presencia de úlceras en escroto y mal estado nutricional (Tabla 6.). En el análisis multivariado las dos variables antes mencionadas constituyeron el modelo mínimo adecuado junto con la variable alopecia (Tabla 7). Es factor de riesgo para un E+ la presencia de úlceras en genitales y un estado nutricional malo (razones de prevalencia superiores a 1), pero extrañamente la alopecia aparece con un valor inferior a la unidad lo que llevaría a pensar que su presencia es un factor “protector” (Tabla 7). Los resultados P+ no estuvieron asociados a ninguna variable clínica en los dos análisis realizados (Tabla 6.).

Las medias de las variables continuas como son edad, frecuencia cardiaca, temperatura, tamaño en milímetros de las uñas y peso en kilogramos de los perros no presentaron diferencias significativas entre perros positivos y negativos diagnosticados por ambos métodos, excepto en aquella relacionada con el peso y P+ (P=0.0123). Sorpresivamente, los perros más pesados presentaron mayor prevalencia de P+ (Tabla 8.).

Tabla 6. Asociación de signos clínicos y los métodos diagnósticos ELISA y PCR: Análisis bivariado.

SIGNO	ELISA				PCR			
	Pos	Neg	X ²	P	Pos	Neg	X ²	P
Adelgazamiento	23	52	1,41	0,23	34	41	0	0,99
Alopecia	15	40	0	0,98	24	31	0,13	0,72
Anorexia	3	7	0,04	0,84	6	4	0,97	0,33
Apatía	14	41	0,21	0,65	25	30	0	0,97
Conjuntivitis	1	3	0,01	0,91	3	1	1,48	0,22
Curvatura uñas	19	35	3,39	0,07	26	28	0,36	0,55
Descamación	11	20	1,36	0,24	14	17	0,01	0,94
Diarrea	5	14	0,01	0,91	7	12	0,67	0,41
Emesis	2	11	1,07	0,3	6	7	0	0,95
Ganglios aumentad	17	32	3,03	0,08	22	27	0	0,98
Hiperqueratosis	11	24	0,44	0,51	14	21	0,59	0,44
Lagrimo	5	8	0,92	0,34	6	7	0	0,95
Nódulos	1	5	0,37	0,55	3	3	0,06	0,81
Onicogrifosis	17	39	0,54	0,46	25	31	0,02	0,89
Úlcera escroto	7	4	6,07	0,01	7	4	0,53	0,47
Úlcera	4	5	1,44	0,23	5	4	0,42	0,52
Tamaño Grande	8	19	0,1179	0,94	13	14	2,6654	0,26
Mediano	12	32			23	21		
Pequeño	9	26			12	23		
Nutrición Mala	19	32	6,1613	0,04	23	28	0,0674	0,97
Regular	8	42			23	27		
Buena	2	3			2	3		

Con referencia al comportamiento de las pruebas en relación a la edad (agrupada en rangos), únicamente 27 perros estaban por encima de los 3 años. De estos la prevalencia de infección fue mayor cuando se utilizó el PCR como diagnóstico (Tabla 9.). Con base en estos datos se calcularon los odds que se muestran en la

figura 5.2, los cuales aumentan con la edad en perros E+ y P+ hasta alcanzar su punto más alto en el rango de 2 a 2.5 años. En perros viejos (para el Opón) los odds para un E+ disminuyen marcadamente en comparación con los propios para un P+ (Figura 8). En este punto las gráficas se separan de manera importante indicando que los P+ detectan una infección acumulada, parecido a lo mostrado en los humanos por la prueba de Montenegro, mientras que los E+ muestran una infección activa.

Tabla 7. Modelo mínimo adecuado para perros E+ en el análisis multivariado

Dx Elisa		Razón de Prevalencia	P> z	95% IC
Alopecia		0,91	0	0,87 – 0,94
Úlcera en genitales		3,2	0	2,2 – 4,7
Estado Nutricional	Bueno	1	-	-
	Regular	0,41	0,011	0,21-0,81
	Malo	1,0797	0	1,0794-1,08

4.4 Xenodiagnósticos

Se practicaron Xenodiagnósticos en 19 perros donde coincidió la positividad del ELISA y del PCR (19/25; 76%), en algunos animales hubo necesidad de repetirlo. Dentro de este grupo en 15 casos hubo sobrevivencia de insectos, ya que la mayoría de las *Lutzomyia spp.* no se alimentaron (aprox. 70%) y las que lo hicieron la mayoría murió (Tabla 10.), pero permitieron un material suficiente para la identificación y PCR. Dentro del grupo de sobrevivientes se identificaron las especies *Lu. gomezi*, *Lu. yuilli*, *Lu. serrana* y otras del grupo Verrucarum. Se extrajo DNA de cada grupo de muestras (pools) en cada uno de los 15 perros y se practicó PCR resultando cinco positivos para el subgénero *Viannia*.

Tabla 8. Correlación de variables continuas con respecto a métodos diagnósticos ELISA y PCR

	ELISA	Obs	Media	T	P
Edad	Positivo	29	0,5221	0,4197* df=1	0,5171
	Negativo	77	0,3899		
	PCR				
	Positivo	48	0,5820	2,4168* df=1	0,12
Negativo	58	0,2970			
Frecuencia cardiaca	ELISA				
	Positivo	29	3,8713	1,0677	0,2881
	Negativo	77	3,9038		
	PCR				
Positivo	48	3,8735	1,4407	0,1527	
Negativo	58	3,9125			
Temperatura	ELISA				
	Positivo	29	38,8690	1,3786	0,1710
	Negativo	77	38,7052		
	PCR				
Positivo	48	38,7167	0,5683	0,5711	
Negativo	58	38,7776			
Tamaño de las uñas en mm.	ELISA				
	Positivo	29	2,5469	1,2891	0,2003
	Negativo	75	2,3802		
	PCR				
Positivo	48	2,4355	0,1399	0,8890	
Negativo	56	2,4191			
Peso en Kg.	ELISA				
	Positivo	29	2,1816	1,3192	0,19
	Negativo	76	2,0170		
	PCR				
Positivo	48	2,2140	2,5491	0,0123	
Negativo	57	1,9348			

***Kruskal wallis**

Tabla 9. Prevalencias por rango de edad para E+, P+

Rango de edad (años)	Media rango de edad	ELISA		% E+	PCR		% P+
		-	+		-	+	
0,3 a 0,7	0,5	20	4	16,6	15	9	37,5
0,8 a 1,5	1,2	20	7	25,9	17	10	37
2 a 2,5	2,2	15	13	46,4	13	15	53,5
3 a 4	3,5	10	3	23	7	6	46,1
mas de 4	6	12	2	14,2	6	8	57,1
	Total general	77	29		58	48	

Figura 8. Distribución de Odds de E+ y P+ por edad para los perros habitantes de las seis veredas de estudio del foco Opón.

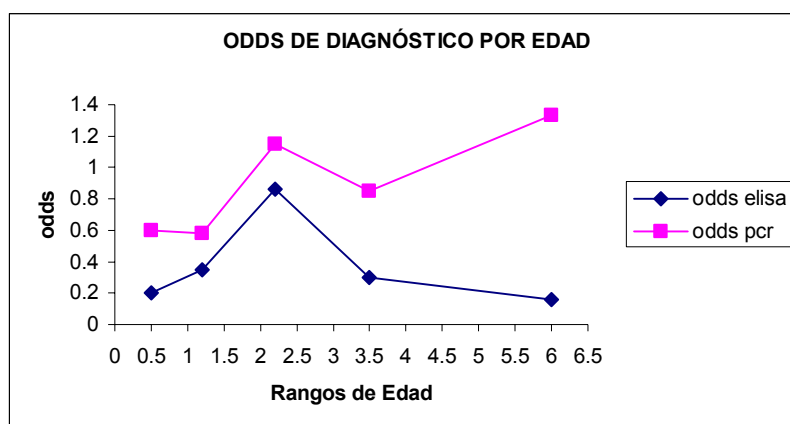


Tabla 10. Distribución de xenodiagnósticos por número de *Lutzomyia spp.* empleadas

Perro	# <i>Lutzomyia spp.</i>	# alimentadas	# Sobrevivientes
1	150	49	9
2	130	42	12
3	113	48	-
4	54	18	-
5	56	15	-
6	111	60	3
7	100	50	5
8	95	64	8
9	197	80	10
10	129	76	3
11	187	70	4
12	200	18	-
13	160	45	6
14	140	41	5
15	150	19	2
16	145	21	5
17	210	69	8
18	123	39	4
19	205	60	4

5. DISCUSIÓN

Se encontró una distribución uniforme de la población canina en las seis veredas de estudio. La presencia de machos fue el doble que las hembras, excepto en mayores de cuatro años en donde se observa la misma cantidad de ambos, esto debido probablemente a la muerte de las hembras como consecuencia del mal estado nutricional al momento de parir sus crías, también es posible que haya una preferencia por los machos, aunque a la población le gusta mantener muchos perros y las hembras les garantizan esto.

La situación de los caninos en las veredas de estudio, es muy mala ya que estos animales viven en condiciones que no favorecen su adecuado estado de salud. No tienen acceso a controles médico-veterinarios como vacunación, desparasitación, baños periódicos. Su estado nutricional es muy deficiente causado por la baja calidad y cantidad en el alimento que consumen para las actividades a que están obligados tales como cacería, desplazamientos a grandes distancias, etc.

El 92.4% de los perros en las seis veredas de estudio presentaban más de dos signos clínicos con excepción de 8 que fueron asintomáticos y con presencia de un buen estado nutricional contrario a lo reportado por Solano-Gallego et al., 2001.

La apariencia física de los perros domésticos del foco del Opón es la misma que se encuentra en los focos de leishmaniasis visceral. Los animales son famélicos con apariencia de ancianos, apáticos con áreas alopécicas, uñas largas y curvas. Las familias mantienen más perros de los que pueden y los animales tienen que salir todos los días de cacería para poder subsistir. Por lo tanto son comunes sus ausencias, así como lesiones en el hocico por heridas ocasionadas por los

mamíferos silvestres cuando están cazando. Mueren muy jóvenes y son reemplazados por camadas originadas en hembras desnutridas que completan el círculo vicioso. Las personas que sobreviven en esta zona de conflicto armado garantizan que aumentando la cantidad de perros, cuenten con una primera línea de defensa para su seguridad. La amalgama de *Lu. gomezi* cerca de las casas por la cercanía de las plantaciones de cacao y la oferta de animales domésticos desnutridos y apáticos en el peridomicilio, permiten una transmisión continua de *L. panamensis* en este foco cuya incidencia es la mayor del departamento de Santander (Observatorio de Salud Pública de Santander, 2005).

La apariencia física de los perros en general y la de los infectados en particular difiere de los animales diagnosticados en focos endémicos de *L. braziliensis*. Usualmente los reportes de dichos focos describen animales con úlceras y lesiones mucosas parecidas a las de un hospedero accidental como el humano (Almeida et al., 2005). En la zona del Opón los animales con ulceraciones de este tipo son la minoría y corresponden a los animales con menos problemas en su estatus nutricional (Tabla 4, Figura 7.b). Sin embargo en el foco del Opón este cuadro no es el característico y aparentemente las condiciones de tenencia de los animales permite la visceralización de la *L. (V.) spp.* detectada, que causa la infección.

Los modelos multivariados mostraron que las ulceraciones en los genitales, el estado nutricional y la alopecia se asociaban a E+, siendo congruentes con lo encontrado en focos donde la serología, se ha asociado a signos de la enfermedad causada por *L. (L.) infantum* (Solano-Gallego et al., 2001). La PCR pese a ser la prueba que ofreció mayor número de resultados positivos no se relacionó con ningún signo en especial. La plausibilidad biológica del ELISA frente a los signos de la enfermedad rescataría su utilización en programas de salud pública. La PCR indudablemente detecta un mayor número de animales infectados y su distribución por grupos etéreos se comporta similar al resultado del

Montenegro en los humanos (Muñoz & Davies, 2006). Detecta entonces la infección acumulada en directa proporción con la edad, mientras que el ELISA muestra la curva de infección y posiblemente la de la infecciosidad (Reithinger et al., 2003). El ELISA se ha subestimado como herramienta diagnóstica frente al PCR por su aparente baja sensibilidad (Ashford et al., 1995; Ashford et al., 1998; Oliva et al, 2006) o por su inconsistencia en los resultados según sea la etapa de la infección (Reithinger et al., 2002). Sin embargo, no existen trabajos previos donde se haya medido con exactitud la sensibilidad y la especificidad de las pruebas, sin recurrir a la tautología de poner en el gold standard los animales detectados por las mismas pruebas.

La correlación entre variables continuas y pruebas diagnósticas nos muestra una relación positiva entre perros con buen peso y P+, lo cual resulta contradictorio de lo observado en perros que sufren esta patología (Solano-Gallego et al., 2001)

El presente estudio incorporó xenodiagnósticos en animales positivos y se logró demostrar la transmisión del parásito, ya que los perros infectaron a las *Lutzomyia spp.* pero solo se logró determinar el subgénero al cual pertenecía el parásito mas no la especie directamente implicada. Es muy probable que los animales viejos positivos por PCR pero negativos por ELISA, representen una subpoblación de canidos actuando como hospederos de punta muerta. Las especies de *Lutzomyia* capturadas coinciden con las reportadas en trabajos previos (Muñoz, 1998; Sandoval et al, 2006) con la excepción de *Lu. trapidoi* que no logró ser capturada con las trampas ni con cebo humano.

En el foco del Opón el valor de los perros como guardianes y alarmas es inestimable aunque ese valor no se vea reflejado en el cuidado del animal. La leishmaniasis es conocida en la región como picadura de pito y en el modelo local no encaja el perro como reservorio. Intentar establecer un programa de eliminación de perros positivos requiere de estrategias de comunicación muy

efectivas que no involucren al parásito y recojan elementos de la cotidianidad. Se estableció durante el presente trabajo un acuerdo apoyado por la red de Trabajadores en Salud Comunitarios (Rodriguez et al., 2006), sobre el no reemplazo de animales muertos y esterilización de hembras. Los criterios que prevalecieron fueron los de mantener un animal por familia con buen estado nutricional y protegidos por collares impregnados con insecticidas. Pese al acuerdo y su aceptación generalizada, al momento de particularizar los casos para esterilización ningún dueño lo permitió. En la actualidad se trabaja en una propuesta de cambio de los animales en mal estado nutricional por unos que no provengan de áreas endémicas, que estén y continúen bien nutridos y que se hayan acostumbrado al uso del collar.

6. CONCLUSIONES

- En el foco del Opón los perros no llegan a una edad avanzada debido a las condiciones en que son mantenidos, encontrándose muy poco perros por encima de los cuatro años. La apariencia física de los perros de las seis veredas de estudio coincide más con la fisonomía de perros de zonas endémicas de leishmaniasis visceral que leishmaniasis cutánea
- Las pruebas de ELISA y PCR continúan arrojando resultados disímiles entre ellas, pero existe una mejor correlación entre signos clínicos y ELISA lo que indica que probablemente este mostrando infección activa, mientras que la PCR muestra la infección acumulada. Los resultados obtenidos con PCR podrían indicarnos al perro como un hospedero de punta muerta, mientras que el ELISA lo estaría haciendo con los perros infectivos e infecciosos.
- Los programas de reemplazo de animales o esterilización en la zona del Opón están muy lejos de hacerse realidad debido a la falta de conciencia de la gente frente al problema ya que ellos no ven el papel del perro en el ciclo de transmisión de la enfermedad,
- Los xenodiagnósticos funcionaron como una muy buena herramienta para determinar la infecciosidad del perro a la *Lutzomyia spp.*
- Las especies de *Lutzomyia spp.* encontradas están de acuerdo con los resultados mostrados por Muñoz (1998) con excepción de *Lu trapidoi* que no se logró capturar.

7. RECOMENDACIONES

En futuros trabajos hay que comprobar si los ELISA positivos son los verdaderos hospederos reservorios que hay que entrar a controlar en los programas de salud pública. Desconocemos la causa de la elevada mortalidad de los insectos una vez se alimentan de sangre de perro, pero en futuros trabajos se debe tratar de incorporar *Lutzomyia spp* provenientes de una colonia.

También es recomendable realizar trabajo con la comunidad donde se involucre el perro como parte del ciclo de transmisión del parásito para lograr de esta manera crear conciencia sobre su importancia como hospedero reservorio.

Crear conciencia en la población acerca de la adecuada tenencia de los caninos y la disminución de su número con el fin de mantener una población en mejores condiciones tanto nutricionales como de salud

Trabajar en programas de reemplazo de caninos por otros provenientes de zonas no endémicas pero acostumbrados al uso de collares para de esta manera tratar de cortar con el ciclo de transmisión

BIBLIOGRAFÍA

- Alexander B, Usma MC, Cadena H, Quesada BL, Solarte Y, Roa W, et al.** Phlebotomine sandflies associated with a focus of cutaneous leishmaniasis in Valle del Cauca, Colombia. *Med Vet Entomol* 1995; 9:273–278.
- Almeida MAO, Jesus EEV, Sousa-Atta MLB, Alves LC, Berne MEA, Atta AM.** Clinical and serological aspects of visceral leishmaniasis in Northeast Brazilian dogs naturally infected with *Leishmania chagasi*. *Vet parasitol* 2005; 127:227-32.
- Aransay A, Scoulica E, Tselentis Y.** Detection and Identification de *Leishmania* DNA within Naturally Infected Sand Flies by Seminested PCR on Minicircle Kinetoplastic DNA. *Appl Env Microbiol* 2000; 66:1933–1938.
- Ashford DA, Bozza M, Freire M, Miranda JC, Sherlock I, Eulalio C, et al.** Comparison of the polymerase Chain reaction for the detection of canine visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* 1995; 53: 251-255.
- Ashford RW.** Leishmaniasis reservoirs and their significance in control. *Clin Dermatol* 1996; 14(5): 523-532
- Ashford DA, David JR, Freire M, David R, Sherlock I, Da Conceicao-Eulalia M, et al.** Studies on control of visceral leishmaniasis: Impact of dog control on canine and human visceral leishmaniasis in jacobina, bahia, brazil. *Am J Trop Med Hyg* 1998; 59(1): 53-57.
- Christensen HA, Fairchild GB, Herrer A, Johnson CM, Young DG & de Vasquez AM.** The ecology of cutaneous leishmaniasis in the Republic of Panama. *J Med Entomol* 1983; 20:463-484.
- Corredor A, Kreutzer RD, Tesh RB, Boshell J, Palau MT, Caceres E, et al.** Distribution and etiology of leishmaniasis in Colombia. *Am J Trop Med Hyg* 1990; 42: 206–214.

Davies CR, Llanos-Cuentas EA, Pyke SD, Dye C. Cutaneous leishmaniasis in the Peruvian Andes: an epidemiological study of infection and immunity. *Epidemiol Infect* 1995; 114(2):297-318.

Davies CR, Llanos-Cuentas EA, Campos P, Monge J, Villaseca P, Dye C. Cutaneous leishmaniasis in the Peruvian Andes: risk factors identified from a Village cohort study. *Am J Trop Med Hyg* 1997; 56(1): 85-95.

Davies CR, Reithinger R, Campbell-Lendrum D, Feliciangeli D, Borges R, Rodriguez N. The epidemiology and control of leishmaniasis in Andean countries. *Cad Saude Publica* 2000; 16:925-50.

De Bruijn MH, Barker DC. Diagnosis of new world leishmaniasis: specific detection of species of the *Leishmania braziliensis* complex by amplification of kinetoplast DNA. *Acta Trop* 1992; 52: 45-48.

De Queiroz RG, Vasconcelos IAB, Vasconcelos AW, Pessoa AF, Sousa RN, David JR. Cutaneous leishmaniasis in Ceará state in northeastern Brazil: incrimination of *Lutzomyia whitmani*, as a vector of *Leishmania braziliensis* in Baturite municipality. *Am J Trop Med Hyg* 1994; 50:693–698.

Dereure J, Espinel I, Barrera C, Guerrini F, Martini A, Echeverria R, et al. Leishmaniose en Equator 4. Infestation naturelle du chien par *Leishmania panamensis*. *Ann Soc Belge Med Trop* 1994 ; 74: 29-33.

Desjeux P. Information on the epidemiology and control of the leishmaniasis by country and territory. WHO/LEISH/91.30. Geneve: World Health Organization, 35-47. 1991.

Desjeux P. Human leishmaniasis: epidemiology and public health aspects. *World Health Q* 1992; 45: 267-75.

Feliciangeli MD, Rodriguez N, Bravo A, Arias F, Guzman. Vectors of Cutaneous leishmaniasis in north-central Venezuela. *Med Vet Entomol* 1994 ; 8:317-324.

Grimaldi G, David JR, McMahon-Pratt D. Identification and Distribution of new world *Leishmania* species characterized by serodemeanalysis using monoclonal antibodies. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1987; 36(2): 270-287.

- Grimaldi G, Tesh R.B, & McMahon-Pratt D.** A review of the geographic distribution and epidemiology of leishmaniasis in the new world. *Am J Trop Med Hyg* 1989; 41:687-725.
- Grimaldi G, Tesh R.B.** Leishmaniasis of the New World: Current Concepts and Implications for Future Research. *Clin Microbiol Reviews* 1993; 6(3): 230-250.
- Grimaldi G, Momen H, Naiff R.D, McMahon-Pratt D and Barrett T.V.** Characterization and Classification of Leishmanial Parasites from Humans, Wild Mammals, and Sand Flies in the Amazon Region of Brazil. *Am. J. Trop. Med. Hyg* 1991; 44(6):645-661.
- Hernández CA.** Historia Natural de la Leishmaniasis cutánea y mucocutánea. *Biomédica* 2006; 26(supl 1)10-2.
- Hernandez D, Rojas E, Scorza JV, Jorquera A.** Infectividad del perro (*Canis familiaris*) para *Lutzomyia youngi* en Trujillo, Venezuela. *Biomedica* 2006; 26(Supl.1):242-48.
- Herrer A & Christensen HA.** Natural Cutaneous Leishmaniasis among Dogs in Panama. *Am. J. Trop. Med. Hyg* 1976; 25(1): 59-63.
- Herrero MV, Rojas JC, Jimenez AE, Zeledon R, Dobles A, Pereira R, et al.** Phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) associated to human houses in an endemic area for cutaneous leishmaniasis in Costa Rica. En: IDRC proceeding of leishmaniasis control strategies. A critical evaluation of IDRC supported research. Ottawa: IDCR; 1992.
- Killick-Kendrick R.** Phlebotomine vectors of the leishmaniasis: a review. *Med. Vet. Entomol* 1990; 4: 1-24.
- Le Pont F, Mouchet J, Dejeux P.** Leishmaniasis in Bolivia. VI. Observations on *Lutzomyia nuneztovari anglesi* Le Pont & Desjeux, 1984 the presumed vector of tegumentary leishmaniasis in the Yungas focus. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1989; 84:227-278.
- Madeira M, Antunes CM, Antunes C, Macedo RM, Duarte R, Magalhães C y Barrientos CM.** *Leishmania (Viannia) braziliensis* em caes naturalmente

infectados. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 2003; 36(5): 551-55.

Madeira M, Schubach A, Schubach T, Serra C, Pereira S, et al. Is *Leishmania (Viannia) braziliensis* preferentially restricted to the cutaneous lesions of naturally infected dogs?. Parasitol. Res 2005; 97(73-76).

Morales A, Corredor A, Caceres E, Ibagos AL, Rodriguez C. Aislamiento de tres cepas de *Leishmania* a partir de *Lu. trapidoi* en Colombia. Biomédica 1981; 1(4): 198-207.

Mouchet J, Le Pont F, Leon R, Echevarria R, Guderian RH. Leishmaniose en Equator 5. Leishmaniose et anthropisation sur la façade pacifique. Ann Soc Belge Med Trop 1994 ; 74: 35-41.

Muñoz G. The sandfly vectors and the epidemiology of cutaneous leishmaniasis in the Landazuri focus, Colombia. PhD thesis. London University; 1998.

Muñoz G, Davies CR. *Leishmania panamensis* transmission in the domestic environment: the results of a prospective epidemiological survey in Santander, Colombia. Biomédica 2006; 26(supl. 1):131-44.

Observatorio de Salud Pública de Santander. Situación de Salud en Santander. Indicadores Básicos 2005.

Oliva G, Scalone A, Foglia-Manzillo V, Gramiccia M, Pagano A, Di Moccio T, et al. Incidence and Time Course of *Leishmania infantum* Infections examined by Parasitological Serologic and Nested-PCR Techniques in a Cohort of Naive Dogs exposed to Three consecutive Transmission Seasons. J of clinical Microbiology 2006; 44(4):1318-22.

Palatnik-de-sousa C, Dos Santos W, Franca-silva J, Da Costa R, Barbosa reis A, et al. Impact of Canine Control on the Epidemiology of Canine and Human Visceral Leishmaniasis in Brazil. Am. J. Trop. Med. Hyg 2001; 65(5):510-17.

Pearson R, De Queiroz A. Clinical Spectrum of Leishmaniasis. Clin Infect diseases 1996; 22: 1-13.

Perez E & Ogozuku E. Natural Leishmania infection of *Lutzomyia spp.* in Perú. Tran of Royal Soc of Trop Med Hyg 1994.

Poot J, Rogers M, Bates P, Vermeulen A. Detailed analysis of an experimental challenge model for *Leishmania infantum* (JPC strain) in dogs. Vet. Parasitol. 2005; 41-53.

Quinnel RJ, Courtenay O, Garces L, Dye C. The epidemiology of canine leishmaniasis: transmission rates estimated from a cohort study in Amazon Brazil. Parasitology 1997; 115: 143-156.

Rangel EF, Souza NA, Werminger ED, Barbosa AF. Infecção natural de *Lutzomyia intermedia* Lutz & Neiva, 1912 em área endêmica de leishmaniose tegumentar no Estado do Rio de Janeiro. Mem Inst Oswaldo Cruz 1984; 79:395-396.

Reithinger R, Quinnel RJ, Alexander B, Davies CR. Rapid Detection of *Leishmania infantum* infection in Dogs: Comparative Study Using an immunochromatographic Dipstick Test, Enzyme-Linked Immunosorbent Assay and PCR. J Clin Microbiol 2002; 40:2352-56.

Reithinger R, Lambson B, Barker DC, Counihan H, Canales J, Sabino J, Davies C. *Leishmania (Viannia) spp.* dissemination and tissue tropism in naturally infected dogs (*Canis familiaris*). Tran. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 2002; 96: 76-78.

Reithinger R, Canales J, Courtenay O, Davies C. Evaluation of PCR as a Diagnostic Mass-Screening Tool to Detect *Leishmania (Viannia) spp.* In Domestic Dogs (*Canis familiaris*). J. Clin. Microbiol 2003; 41(4): 1486-1493.

Rodriguez-Villamizar L, Orozco-Vargas LC, Muñoz G. Impacto del Plan de Atención Básica en la Prevención de Leishmaniasis Cutánea en Zonas Rurales de Santander, Colombia. Rev Salud Pública 2006; 8(1): 116-28.

Salomon OD, Sosa Estani S, Gomez A, Segura EL. Sandflies associated with a tegumentary leishmaniasis focus in Salta, Argentina. Mem Inst Oswaldo Cruz 1992; 87:S223.

- Sandoval CM, Gutiérrez R, Cárdenas R, Ferro C.** Especies de género *Lutzomyia* (Psychodidae, Phlebotominae) en áreas de transmisión de leishmaniasis tegumentaria y visceral en el departamento de Santander, en la cordillera oriental de los Andes colombianos. *Biomédica* 2006; 26(supl. 1): 218-27.
- Scorza JV, Marquez M, Marquez JC.** Hallazgo de *Lutzomyia townsendi* naturalmente infectada con *Leishmania braziliensis* en el área suburbana de Trujillo, Venezuela. *Bol Dir Malarial Saneamiento Ambiental* 1984; 24: 21–28.
- Shaw JJ.** Taxonomy of the Genus *Leishmania*: Present and Future Trends and their implications. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 1994; 89(3): 471-478.
- Solano-Gallego L, Morell P, Arboix M, Alberola J, Ferrer L.** Prevalence of *Leishmania infantum* Infection in Dogs Living in an Area of Canine Leishmaniasis Endemicity Using PCR on Several Tissues and Serology. *J Clin Microbiol* 2001; 39(2): 560-63.
- Strauss-Ayali D. & Baneth G.** Canine Visceral Leishmaniasis. In: *Recent Advances in Canine Infectious Diseases*, L Carmichael (Ed.). International Veterinary Information Service (www.ivis.org) Ithaca, New York. U.S.A., 2000.
- Travi B, Tabares C, Cadena H, Ferro C, Osorio Y.** Canine Visceral Leishmaniasis in Colombia: Relationship between Clinical and Parasitological Status and Infectivity for Sand Flies. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2001; 64(3,4): 119-124.
- Villaseca P, Llanos-Cuentas A, Perez E, Davies CR.** A comparative field study of the relative importance of *Lutzomyia peruensis* and *Lutzomyia verrucarum* as a vector of cutaneous leishmaniasis in the Peruvian Andes. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1993; 49(2): 260-269.
- Vexenat JA, Barretto AC, Rosa A.** Infecção experimental de *Lutzomyia whitmani* em cães infectados com *Leishmania braziliensis braziliensis*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1986; 81: 125-126.

Ward R. Some aspects of the biology of Phlebotominae sandfly vectors. Advance in disease vector research 1989; volumen 6, 91 – 125. Springer - verlag editorial.

Weigle KA, Santrich C, Martinez F, Valderrama L, Saravia NG. Epidemiology of cutaneous leishmaniasis in Colombia: environment and behavioral risk for infection, clinical manifestations and pathogenicity. J Infect Dis 1993; 168: 709-714.

Weigle KA, Labrada LA, Lozano C, Santrich C, Barker DC. PCR-Based Diagnosis of Acute and Chronic Cutaneous Leishmaniasis caused by *Leishmania (Viannia)*. J Clin Microbiol 2002; 40(2): 601-06.

World Health Organization. Control of leishmaniasis: Report of a WHO expert committee. No. 793. Geneve: WHO Technical Report Series; 1990.

Young DG. A review of the Bloodsucking Psychodid Flies of Colombia (Diptera: Phlebotominae and Sycoracinae). Bulletin 806, Institute of Food and Agricultural Science. University of Florida, 1979.

Zeledon R, Murillo J, Gutierrez H. Flebotomos antropofilos y leishmaniasis cutánea en Costa Rica. Bol Of Sanit Panam 1985; 99(2):163-171.

ANEXOS

Anexo A. Historia Clínica utilizada en campo para cada uno de los perros incluidos en el estudio

PROPIETARIO						
HISTORIA #				Lagrimo	1	0
Código paciente				Diarrea	1	0
Nombre del paciente				Emésis	1	0
Código de la vereda				Anorexia	1	0
Código de la casa				Hepatitis	1	0
Sexo	Macho	Hembra		Esplenitis	1	0
Edad	Años	Meses		Úlcera/alopecia en escroto	1	0
Tamaño	P	G	M	Fiebre	1	0
Color pelaje				Tos	1	0
Hace cuanto tiene al perro	Años	Meses		Ataxia	1	0
Cuántas veces al día come	1	2	3	Atrofia muscular	1	0

Cuántos perros hay en casa				Claudicación	1	0
Temperatura				Artritis	1	0
Frec cardiaca				Poliartritis	1	0
Estado nutricional	1	2	3	Onicogrifosis	1	0
Ganglios	Normal	Aumentados		Medida en mm.		
Apatia	1	0		Curvatura de uñas	1	0
Dolor	1	0		Conjuntivitis	1	0
Perdida de piezas dentarias	1	0		Hiperqueratosis	1	0
Depresión	1	0		Descamación	1	0
Adelgazamiento	1	0		Pústulas	1	0
Alopecia	1	0		Ictericia	1	0
Úlceras	1	0		Blefaritis	1	0
				Nódulos	1	0

Anexo B. TÉCNICA DE ELISA PARA ANTICUERPOS anti-Leishmania

Bajo la denominación ELISA se conoce un procedimiento de laboratorio basado en antígenos enzimáticos. La técnica valora anticuerpos específicos según el antígeno que se emplee utilizando la reacción antígeno-anticuerpo. Al final de esta reacción se obtiene una solución de color que se mide con espectrofotómetro, la intensidad del color está en relación directa con la cantidad de anticuerpos presentes.

La técnica de ELISA se estandarizó utilizando un antígeno soluble crudo, a partir de cultivos de *Leishmania panamensis* cepa de referencia LS94. Se determinó la concentración de proteínas antigénicas por el método de Lowry y se estandarizaron las diluciones de suero, antígeno y conjugado utilizando un pool de sueros positivos y negativos.

Soluciones de trabajo

a. Buffer de Carbonatos pH 9.6 (solución para dilución del antígeno)

Na₂CO₃ 0.156 gr. 15mM

NaHCO₃ 0.293 gr.

Agua destilada 100 ml

Ajuste pH a 9.6 rotule y guarde a 40 °C

b. Buffer Carbonatos/Leche descremada 2% (BC/LD) (Solución de bloqueo)

Buffer de carbonatos 100 ml

Leche descremada 2 gr.

Prepare al momento de utilizar

c. Buffer Fosfato Salino (PBS) pH 7.4

NaCl 8 gr

KH ₂ PO ₄	0.2 gr
NaH ₂ PO ₄ .12 H ₂ O	2.88 gr
KCl	0.2 gr
Agua destilada	1000 ml

Ajuste pH a 7.4 con NaOH 1M o HCl 1M rotule y guarde a 40°C

d. PBS/Tween 20 0.05% (PBS/T) (Solución de lavado)

Solucion de PBS	999 ml
Tween 20	750 µl

Añada el Tween 20 y ajuste pH a 7.4 con NaOH 1M o HCl 1M rotule y guarde a 40°C

e. PBS/Tween 20 0.05%/Leche descremada 2% (PBS/T/LD) (solución para dilución de sueros y conjugado). Prepare en el momento de utilizar

Solución de PBS/T	100 ml
Leche descremada	2 gr.

f. Buffer de dietanolamina (solución para dilución del sustrato)

Dietanolamina	9.7 ml
Agua destilada	80 ml

Ajuste pH a 9.6 con HCl 1N y lleve a volumen final de 100 ml. Rotule y guarde a 4°C

PROCEDIMIENTO

1. Sensibilización de las placas de ELISA: Se usan placas de microtitulación de poliestireno Dynatech Immunolon 2. La dilución del antígeno utilizada es determinada mediante un experimento de chequeo utilizando diferentes diluciones del antígeno contra sueros control estándar positivos y negativo y varias diluciones del conjugado.

En el caso del ELISA anti-Leishmania panamensis estandarizado la concentración de antígeno definida para sensibilizar las placas es 6 µg/dl (concentración del antígeno LS94: 382.3 µg/dl). El antígeno se diluye en buffer carbonatos pH 9.6 teniendo en cuenta el volumen requerido, es decir, la cantidad de pozos que se van a sensibilizar.

Los pozos se sensibilizan agregando a cada uno 100 µl de antígeno diluido en buffer de carbonatos, excepto los blancos de antígeno a los cuales se les agrega solo buffer de carbonatos.

La placa sensibilizada se deja a 4°C durante toda la noche en cámara húmeda. Es importante tener en cuenta que se puede sensibilizar más de una placa a la vez y que siempre y cuando se mantenga la humedad en la cámara es posible dejar las placas hasta 3 días antes de proceder a realizar la técnica.

Cuando se diluye el antígeno es importante verificar el volumen en el cual se va a realizar la dilución ya que deben descontarse los blancos de reactivos y de antígeno para optimizar de esta manera la utilización del antígeno.

2. Descarte el líquido de los pozos y lave tres veces con 150 µl de PBS/T. Estos lavados se hacen colocando la solución y dejándola tres minutos, al final de los tres lavados se elimina el exceso de solución sacudiendo fuertemente la placa sobre una toalla de papel.
3. Bloquee los pozos con 100 µl de BC/LD por 30 minutos a 37 °C en cámara húmeda.
4. Descarte el líquido de los pozos y lave tres veces con 150 µl de PBS/T (3 minutos cada lavado), luego elimine todo el líquido sobrante sobre una toalla de papel.

5. Diluya los sueros en PBS/T/LD. La dilución del suero establecida para esta estandarización es 1:400.

6. Añada 100 µl de la dilución del suero a cada pozo (cada suero por duplicado). Tenga en cuenta hacer suficiente vortex durante la mezcla y al momento de servir cada pozo, para minimizar las variaciones entre réplicas. Los blancos llevan 100 µl de PBS/T/LD.

7. Incube una hora a 37 °C en cámara húmeda.

8. Descarte el líquido de los pozos y lave tres veces con 150 µl de PBS/T (3 minutos cada lavado), luego elimine todo el líquido sobrante sobre una toalla de papel.

9. Llene cada pozo con 100 µl de conjugado (Anti-Dog IgG-alkaline phosphatase) diluido en PBS/T/LD. La dilución establecida para el conjugado es 1:1500, prepare aproximadamente 10 ml de conjugado por placa, mézclelo muy bien y sívalo rápidamente.

10. Incube el conjugado durante dos horas a 37°C en cámara húmeda.

11. Descarte el líquido de los pozos y lave tres veces con 150 µl de PBS/T (3 minutos cada lavado), luego elimine todo el líquido sobrante sobre una toalla de papel.

12. Añada 100 µl de sustrato (fosfatasa alcalina) diluido en buffer de dietanolamina. Cada pastilla de sustrato se diluye en 5 ml de buffer dietanolamina, se preparan 10 ml por placa (2 pastillas de sustrato). El buffer de dietanolamina debe dejarse atemperar y al momento de añadir el sustrato cubrirse de la luz (papel aluminio) para que la reacción no se acelere por efecto de esta.

13. Deje la placa a temperatura ambiente en oscuridad y lea con filtro de 410 nm hasta llegar al valor definido para el control positivo.
14. Detenga la reacción con 50 μ l de NaOH 3M, teniendo cuidado en que esta solución no caiga sobre el equipo.
15. Observe durante el procedimiento todas las medidas de seguridad necesarias.

Anexo C. TÉCNICA DE PCR para identificación de *Leishmania (Viannia) spp.*

La PCR para determinación de *Leishmania (Viannia)* se basa en la amplificación del DNA circular del kinetoplasto. Este DNA puede encontrarse en forma de maxicírculos, que son bastante homogéneos, y minicírculos que comprenden el 90 a 95% del DNA presente. Los minicírculos son heterogéneos, tienen un tamaño entre 600 y 900 pares de bases dependiendo de la especie, se encuentran miles al interior del kinetoplasto, y son estos el blanco de amplificación en esta PCR. A pesar de su heterogeneidad, los minicírculos, contienen una región universal llamada 13 mer que es la secuencia que da origen a la replicación, la cual es conservada en todas las especies (B1); siguiente a esta, se encuentra la región que contiene secuencias específicas que pueden diferenciar especies o complejos (B2).

Primers:

B1 5' GGG GTT GGT GTA ATA TAG TGG 3' Tm: 59.5 °C.

B2 5' CTA ATT GTG CAC GGG GAG G 3' Tm: 65.3°C.

Tamaño del fragmento amplificado: 750 pb.

Programa:

95°C -----	5 min	
95°C -----	0.5 min	} 35 ciclos
60°C -----	1 min	
95°C -----	1 min	
60°C -----	3 min.	
72°C -----	3 min.	

Condiciones de la Master Mix

	Concentración final	Vol. a tomar	Concentración de trabajo
Buffer Taq 10X	1 X	1.5 μ L	10 X
dNTP`s	200 μ Mol	3 μ L	1mM
B1	1.6 pMol	2 μ L	12.35 pMol
B2	1.6 pMol	2 μ L	12.28 pMol
Taq	0.6 Unid	0.04 μ L	15 U/ μ L
H ₂ O		10.46 μ L	
Volumen final		20 μ L	

Nota: La concentración de Magnesio es de 3.5 mM
y está contenida en el Buffer

Sensibilidad:

Esta PCR puede detectar hasta 1 pico gramo de DNA de Kinetoplasto de Leishmania por microlitro de muestra y hasta 1 parásito por cada 10 mililitros de sangre total.