

DIAGNÓSTICO DE LA LEISHMANIASIS VISCERAL CANINA MEDIANTE LAS TÉCNICAS WESTERN BLOT E INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA

Marlyn Romero Peñuela*
Jorge Sánchez Valencia**
Linda Carolina Hayek Peñuela***

Recibido en enero 18 de 2010, aceptado en marzo 3 de 2010

Resumen

Objetivo: un estudio epidemiológico transversal fue desarrollado para establecer la seroprevalencia de la Leishmaniasis Visceral (LV) en caninos localizados en la zona endémica del departamento del Tolima por medio de las pruebas de Inmunofluorescencia Indirecta (IFI) y Western Blot (WB). **Materiales y métodos:** se incluyeron en el estudio 211 caninos mestizos procedentes de seis municipios de la zona endémica de leishmaniasis visceral del departamento del Tolima. Se utilizó como antígeno la cepa colombiana de *Leishmania infantum* MHOM/COL/CL044B para IFI y WB. **Resultados:** se estableció una seroprevalencia de la Leishmaniasis Visceral Canina en el grupo de animales evaluados del 41,7 y 22,2% por medio de IFI y WB, respectivamente. La concordancia entre las dos técnicas fue negativa ($k = -0,102$; $p = 0,084$). Se detectaron 12 fracciones antigénicas en la prueba WB entre los 13 y 91 kDa, de las cuales la de 14 kDa se considera valiosa en el diagnóstico precoz de la infección, para evaluar la resolución de la enfermedad y la evolución del tratamiento. Se sugiere desarrollar un constructo de pruebas diagnósticas directas e indirectas que permitan confirmar el estado real de la infección de los caninos, para orientar eficientemente los programas de control de la enfermedad en zonas endémicas de leishmaniasis visceral.

Palabras clave

Leishmaniasis Visceral (LV), western blot, infección natural, control.

* Médica Veterinaria y Zootecnista, Magíster en Ciencias Biológicas. Universidad de Caldas, Facultad de Ciencias Agropecuarias. Grupo de Investigación CIENVET. Manizales, Colombia. E-mail: marlyn.romero@ucaldas.edu.co

** Médico Veterinario y Zootecnista. Magíster en Salud y Producción Animal. Universidad de Caldas, Facultad de Ciencias Agropecuarias. Grupo de Investigación CIENVET. Manizales, Colombia. E-mail: jorge.sanchez@ucaldas.edu.co

*** Médica Veterinaria y Zootecnista. Esp. Laboratorio ANIMED, Bogotá, Colombia. E-mail: linda.hayek@carval.co

CANINE VISCERAL LEISHMANIASIS DIAGNOSIS BY MEANS OF WESTERN BLOT AND INDIRECT IMMUNOFLUORESCENCE TEST

Abstract

Objective: a cross-sectional epidemiological study was carried out in order to establish the prevalence of canine visceral leishmaniasis in the endemic area of Tolima department by means of Indirect Immunofluorescence (IFAT) and Western Blotting (WB) tests. **Materials and Methods:** the study included 211 mongrel dogs from six municipalities of the endemic area of visceral leishmaniasis (VL) of the Tolima department. The Colombian *Leishmania infantum* MHOM/CO/CL044B strain was used as antigen for IFI and WB. **Results:** The seroprevalence in the group tested was 41.7% and 22.2% by IFAT and WB, respectively. The agreement between the two techniques was negative ($k = -0.102$; $p = 0.084$). 12 antigenic fractions were detected between 13 and 91 kDa, of which 14 kDa is considered valuable in early diagnosis of the infection, in order to evaluate the resolution of the disease and treatment progress. The article suggests developing a construct of direct and indirect diagnostic tests for confirming the real state of the animals' infection to guide disease control programs in endemic areas of visceral leishmaniasis.

Key words

Visceral leishmaniasis (VL), western blot, natural infection, control.

DIAGNÓSTICO DE LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA ATRAVÉS DA TÉCNICA DE WESTERN BLOT E IMUNOFLUORESCENCIA

Resumo

Objetivo: uma pesquisa epidemiológica transversal foi desenvolvida para estabelecer a soroprevalência da Leishmaniose Visceral (LV) canina localizados na zona endêmica do Estado do Tolima por meio das provas de Imunofluorescência indireta (IFI) e Western Blot (WB). **Materiais e Métodos** se incluíram na pesquisa 211 canina mestiça procedente de seis prefeituras da zona endêmica de Leishmaniose visceral do Estado de Tolima. Utilizou-se como antígeno a cepa Colombiana de *Leishmania infantum* MHOM/COL/CL044B para IFI e WB. **Resultados:** Se estabeleceu uma Soroprevalência da Leishmaniose Visceral canina no grupo de animais avaliados do 41,7 e 22, 2% por meio de IFI e WB, respectivamente. A concordância entre as duas técnicas foi negativa ($k = -0,102$; $p = 0,084$). Destacaram-se 12 frações antigênicas na prova WB entre os 13 e 91 kDa, das quais a de 14 kDa considera-se valiosa no diagnóstico precoce da infecção, para avaliar a resolução da enfermidade e a evolução do tratamento. Sugira-se desenvolver um constructo de provas diagnósticas diretas que permitam confirmar o estado real da infecção dos caninos, para orientar eficientemente os programas de controle da enfermidade em zonas de Leishmaniose visceral.

Palavras chave

Leishmaniose Visceral (LV), western blot, infecção natural, controle.

INTRODUCCIÓN

La leishmaniasis visceral (LV) en América es una enfermedad sistémica causada por protozoarios intracelulares del género *Leishmania infantum* (= *L. chagasi*) y transmitida por la picadura de insectos flebotómicos del género *Lutzomyia* (*Lu.*) *longipalpis* y esporádicamente *Lu. evansi* en América (1-3). La LVZ es endémica en Colombia, pero el mayor número de casos se presentan en los departamentos de Córdoba, Sucre, Bolívar, Tolima y Huila (4). Los reservorios de mayor importancia son *Didelphis marsupialis* (chucha, fara, runcho) y *Canis familiares* (4-6). La enfermedad en los caninos presenta repercusiones en la Salud Pública, por su carácter zoonótico, por la dificultad de realizar un diagnóstico precoz en esta especie, por el riesgo que representan en la transmisión de la enfermedad los caninos asintomáticos y la relativa falta de eficiencia del tratamiento, que hacen de la enfermedad un problema importante en las zonas en donde los caninos infectados se convierten en la principal fuente de infección (7, 8).

Tradicionalmente los métodos de control de la LV se han basado en el tratamiento de las personas afectadas, en la disminución de la densidad del vector e identificación y eliminación de caninos infectados (1). En los programas de Salud Pública en el mundo se han utilizado las pruebas serológicas para la identificación de animales infectados; teniendo en cuenta que el diagnóstico clínico de la leishmaniasis visceral canina (LVC) es difícil porque la sintomatología es variable e inespecífica (1, 7, 9); así mismo, el diagnóstico definitivo depende del aislamiento parasitológico en cultivos o por detección del DNA del parásito por PCR (8). Las técnicas anteriores son costosas, invasivas, requieren de tiempo, personal calificado y equipos costosos (1, 9).

La prueba Western Blot (WB) ha sido propuesta para el estudio de LVZ en trabajos experimentales y de campo, porque se sugiere que las fracciones antigénicas obtenidas con esta técnica, permiten

detectar animales infectados y discriminan las fases iniciales de la infección (10-12). A pesar de que con esta técnica se han desarrollado numerosos estudios con animales experimentalmente infectados, son escasos los realizados en zonas endémicas de América. El presente estudio se realizó con el propósito de establecer la seroprevalencia de la infección por LV en un grupo de caninos mestizos procedentes de la zona endémica del sur del departamento del Tolima y comparar la concordancia de los resultados de esta técnica con los obtenidos mediante la prueba de Inmunofluorescencia Indirecta (IFI).

MATERIALES Y MÉTODOS

Sueros. El estudio se desarrolló usando 211 sueros caninos que fueron recolectados en los municipios del departamento del Tolima: Coyaima, Natagaima, Purificación, Coello, Ataco y Ortega, zona localizada dentro del foco de transmisión de LV en Colombia. La toma de muestras de sangre se efectuó por venopunción de la vena cefálica.

Inmunofluorescencia –IFI–. La técnica fue desarrollada siguiendo la metodología descrita por Corredor et al. (4) empleando promastigotes en fase metacíclica de *L. infantum* cepa MHOM/COL/CL-044B cultivados en medio bifásico NNN y replicados para la obtención de cultivos en masa en medio Schneider's (Sigma) suplementado con 15% de suero fetal bovino. Se consideraron como títulos seropositivos aquellos $\geq 1:32$ (4).

Western Blot –WB–. La prueba de Western blot se adaptó a partir de la metodología descrita por Laemmli (13) y Towbin, Staehelin y Gordon (14) empleando como antígeno un lisado de promastigotes de *L. infantum* cepa MHOM/COL/CL-044B en fase estacionaria, mantenidos en medio líquido Schneider's (Sigma, Saint Louis, Missouri, EUA) a una concentración de 10^6 parásitos por ml. La separación por electroforesis se llevó a cabo en geles de poliacrilamida al 12% con SDS

0,1%. La dilución de los sueros fue de 1:200 y del conjugado de 1:20000. Se consideró WB como positivo cuando en ensayos por triplicado el suero de los caninos evaluados reaccionaba a la altura de pesos moleculares entre 14 kDa y 116 kDa, según lo descrito por Vargas-Duarte et al. (12).

Aspectos éticos. Se aplicó la Ley 84 de 1989 (15) y la Resolución No. 8430 de 1993 del Ministerio de Salud (16). La toma de las muestras de los animales se realizó contando con el consentimiento informado de los propietarios.

Análisis de resultados. Mediante el programa Win Episcopo 2.0 se calculó la concordancia entre las técnicas utilizadas.

RESULTADOS

La serorreactividad ante antígenos totales de *L. infantum* en el grupo de caninos evaluados fue del 41,7% (88/221) por IFI y del 22,2% (47/211) por WB. La distribución de los resultados obtenidos con las dos técnicas diagnósticas se presenta en la Tabla 1, en donde se puede evidenciar que las dos técnicas no son concordantes en detectar los mismos animales como positivos ($n = 15$), teniendo en cuenta que IFI identificó como positivos 88 animales y WB 47. Con relación a la prueba de WB, los sueros de los caninos reconocieron 12 fracciones antigénicas entre los 13 y 91 kDa. Las bandas de 29, 60, 13 y 73 kDa, fueron las más frecuentes (23,1%, 23,1%, 12,8 y 10,3% respectivamente). La concordancia de los resultados establecidos por IFI y WB fue negativa ($k = -0,102$; $p = 0,084$).

DISCUSIÓN

La seroprevalencia de la LVC en el grupo de animales evaluados en el presente estudio por medio de las pruebas diagnósticas IFI y WB

(41,7 y 22,2% respectivamente) fue mayor a la establecida recientemente por otros investigadores en poblaciones caninas colombianas usando el mismo antígeno y la técnica IFI en Neiva (17,2%) y en cuatro municipios del Huila por Inmunoensayo ligado a enzimas (ELISA) (28% en Villavieja, 14,9% en Villanueva, 10% en Palermo y 5,1% en Algeciras) (8, 17). Las diferencias en la seropositividad podrían deberse a variaciones en la densidad de los vectores, factores ambientales y distribución de los reservorios caninos en las dos zonas endémicas (3,17).

Tabla 1. Comparación de los resultados obtenidos con los 211 sueros evaluados por medio de las técnicas IFI y WB.

		WB		Total	
		Positivo	Negativo		
IFI				No.	%
Positivo		15	73	88	41,7
Negativo		32	91	123	58,3
Total	No.	47	164	211	
	%	22,2	77,8		

Sin embargo, existe una marcada discordancia entre los resultados obtenidos con las dos técnicas diagnósticas usadas, porque identificaron un número diferente de animales seropositivos (Tabla 1) y por lo tanto no se estableció correlación entre ellas, al presentar un índice de Kappa negativo ($k = -0,102$), aspecto que difiere con lo reportado en Colombia por Vargas-Duarte et al. (12), quienes encontraron alta concordancia entre las dos técnicas, proponiendo que en condiciones de campo se empleen concomitantemente. En el presente estudio aunque se empleó el mismo antígeno colombiano, los métodos de obtención fueron diferentes, porque se utilizaron antígenos de superficie y solubles respectivamente, siendo posible que se esté identificando un grupo distinto de epítopes (2,18), porque los promastigotes cultivados *in vitro* consisten en una amplia variedad de antígenos somáticos y componentes

de superficie (2), siendo posible identificar un tipo distinto de epítopes (18); o se puede deber a sus diferentes valores de sensibilidad y especificidad. Este último aspecto ha sido demostrado en el estudio reciente realizado en Colombia en animales experimentalmente infectados con *L. infantum*, en donde la técnica IFI demostró una sensibilidad del 69,7% y una especificidad del 67,5%; a su vez WB presentó valores del 57,6 y 100% de sensibilidad y especificidad, respectivamente (12); sin embargo, la prueba WB no incrementó significativamente los niveles de detección obtenidos por las pruebas IFI y ELISA en los animales infectados, pero sí logró disminuir la detección de animales falsos positivos (12). Así mismo, la baja especificidad de la prueba IFI se podría deber a la presencia de reacciones cruzadas con enfermedades causadas por otros tripanosomátidos como la enfermedad de Chagas y la Leishmaniasis tegumentaria (1).

Con relación a la técnica WB se ha descrito que no hay consenso con relación al patrón de reconocimiento propuesto por los diferentes investigadores para determinar la infección en muestras caninas, porque la prueba es muy sensible y los resultados se pueden afectar por varios factores como: el tipo de antígeno, los grados de reducción dependiendo de la concentración de SDS y β -mercaptoetanol, la concentración de poliacrilamida en los geles y el tipo de marcadores de peso molecular, así como las diferentes particularidades epidemiológicas de cada una de las zonas endémicas (10, 19, 20), aspectos que podrían explicar la diferencia de los resultados presentados en los dos estudios colombianos que han utilizado como prueba diagnóstica WB.

En el presente estudio se visualizaron 12 fracciones antigénicas entre los 13 y 91 kDa, identificadas también por otros investigadores en España y Colombia (10-12, 20). Se detectaron bandas de bajo peso molecular en los animales infectados (13 kDa), aspecto que concuerda con el patrón antigénico descrito por Vargas-Duarte et al. (12) en Colombia. Se ha sugerido que estas

fracciones son muy sensibles en el diagnóstico de los casos asintomáticos de LVC, reportándose que aparecen mucho antes que los títulos de seropositividad establecidos por las pruebas de IFI y ELISA, siendo definidas como potencialmente diagnósticas en fases tempranas de la enfermedad, cuando los animales son negativos o presentan bajos niveles de anticuerpos por medio de otras técnicas (11, 12, 19, 20). Esta proteína de 14 kDa ha sido identificada como una proteína nuclear denominada p 14 que persiste por muchos años, siendo posible usarla para evaluar la resolución de la enfermedad y la evolución del tratamiento, porque desaparece cuando el tratamiento es efectivo o cuando se presenta mejora del estado clínico del canino (20, 21).

La técnica de WB ha sido catalogada como una técnica con alta especificidad con valores cercanos al 100%, cuando se consideran bandas específicas, siendo muy útil en muestras con bajas concentraciones de anticuerpos (11, 18, 21). Sin embargo, al desarrollar la técnica en el presente estudio se pudo evidenciar como desventaja de WB, la dificultad de identificar las bandas, teniendo en cuenta que muchas fracciones antigénicas tienen similares pesos moleculares y la complejidad de discriminarlas cuando son detectadas bandas superpuestas o muy seguidas, debido a la subjetividad de su lectura (11).

CONCLUSIONES

Teniendo en cuenta la utilidad de las pruebas serológicas en el diagnóstico precoz de la LVC como una medida preventiva para la leishmaniasis visceral humana, se requiere el uso de pruebas precisas y confiables. Las dos técnicas evaluadas en el presente estudio: WB e IFI usando el antígeno colombiano de *L. infantum* cepa MHOM/ COL/CL-044B, demostraron baja concordancia en los resultados obtenidos, identificando como positivos a un grupo diferente de animales, lo cual puede conllevar a la eliminación de animales

no infectados y al mantenimiento de reservorios domésticos infectados en las zonas endémicas. De acuerdo a los resultados encontrados en el presente estudio, se sugiere desarrollar un algoritmo de pruebas diagnósticas para confirmar el estado real de la infección en animales susceptibles en las zonas endémicas de la enfermedad, aspecto fundamental para orientar las políticas y recursos de Salud Pública tendientes al control de esta importante zoonosis.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Alves WA, Bevilacqua PD. Quality of diagnosis of canine visceral Leishmaniasis in epidemiological surveys: an epidemic in Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, 1993-1997. *Cad. Saude Pública* 2004;20(1):259-265.
2. Ferroglio, F, Centaro E, Mignone W, Triscioglio A. Evaluation of an ELISA rapid device for the serological diagnosis of *Leishmania infantum* infection in dogs as compared with immunofluorescence assay and Western blot. *Vet. Parasitol.* 2007;144:162-166.
3. Aoun O, Mary Ch, Roquedplo C, Marié JL, Terrier O, Leveuge A, et al. Canine leishmaniasis in Routh-east of France: Screening of *Leishmania infantum* antibodies (western blotting, ELISA) and parasitaemia levels by PCR quantification. *Vet. Parasitol.* 2009;166:27-31.
4. Corredor A, Álvarez CA, Agudelo CA, Bueno M, López MC, Cáceres E, et al. Prevalence of *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania chagasi* infection and risk factors in a Colombian indigenous population. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* 1999;41(4):229-234.
5. Travi B. Un enfoque integral al estudio de animales reservorios, con énfasis en las Leishmaniasis del Nuevo mundo. *Med UIS* 1998;12:311-315.
6. Ministerio de la Protección Social de Colombia. Guía de Atención de la Leishmaniasis 21; 2006.
7. Travi B, Tabares C, Cadena H, Ferro C, Osorio Y. Canine Visceral Leishmaniasis in Colombia: relationship between clinical and parasitologic status and infectivity for sand flies. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2001;64(3,4):119-124.
8. Fernández J, Charry T, Bello F, Escobar J, Lozano C, Ayala M, et al. Prevalencia de Leishmaniasis Visceral canina en municipios de Huila Colombia. *Rev. Salud Pública* 2002;4(3):278-85.
9. Mettler M, Grimm F, Capelli G, Camp H, Deplazes P. Evaluation of Enzyme-Linked Immunosorbent assays, an Immunofluorescent-antibody test, and two rapid tests (Immunochromatographic-Dipstick and gel tests) for serological diagnosis of symptomatic and asymptomatic *Leishmania* infections in dogs. *J Clin Microbiol* 2005;43(11):5515-157.
10. De Paula A, Da Silva A, Fernandes O, Jansen A. The use of immunoblot analysis in the diagnosis of canine visceral leishmaniasis in an endemic area of Rio de Janeiro. *J Parasitol* 2009;89:832-836.
11. Riera C, Valladares JE, Gallego M, Aisa M, Castillejo S, Fisa R, et al. Serological and parasitological follow-up in dogs experimentally infected with *Leishmania infantum* and treated with meglumine antimoniate. *Vet. Parasitol.* 1999;84:33-47.
12. Vargas-Duarte JJ, López-Páez MC, Escovar-Castro JE, Fernández-Manrique J. Evaluación por western blot, inmunofluorescencia indirecta y ELISA de perros infectados con *Leishmania (Leishmania) infantum*. *Rev. Salud Pública* 2009;11(4):641-652.
13. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970;227:680-685.
14. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrilamide gels to nitrocellulose sheets: procedures and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979;76:4350-4354.
15. Congreso de la República de Colombia. Ley 084 de 1989. Estatuto Nacional de Protección de los animales. *Diario Oficial*, Año CXXVI. N.3912027; 1989. p. 1-14.
16. Ministerio de Salud, República de Colombia. Resolución No. 008430 de 1993. Investigación en Salud; 1993. p. 1-20.

17. Fernández J, Bello F, López MC, Moncada LI, Vargas JJ, Ayala MS, et al. Seroprevalencia de leishmaniosis visceral canina en la comuna 8 de Neiva y en cuatro municipios de Huila, Colombia. *Biomédica* 2006;26(Supl.1):121-30.
18. Iniesta L, Fernández-Barredo S, Bulle B, Gómez M, Piarrous R, Gallego M, et al. Diagnostic techniques to detect cryptic leishmaniasis in dogs. *Clin Diagn Lab Immunol* 2002;9:1137-1141.
19. Lasri S, Sahibi H, Natami A, Rhalem A. Western blot analysis of *Leishmania infantum* antigens using sera from pentamidine-treated dogs. *Vet Immunol Immunopathol* 2003;91:13-18.
20. Aisa M, Castillejo S, Gallego M, Fisa R, Riera M, Colmenares M, et al. Diagnostic potential of western blot analysis of sera from dogs with leishmaniasis in endemic areas and significance of the pattern. *Am J Trop Med Hyg* 1998;58:154-159.
21. Mary C, Lamouroux D, Dunan S, Quilleci M. Western blot analysis of antibodies to *Leishmania infantum* antigens: potential of the 14-Kd and 16-Kd antigens for diagnosis and epidemiological purposes. *Am J Trop Med Hyg* 1992;47:764-771.