
USO DE ANTÍGENOS RECOMBINANTES PARA LA EVALUACIÓN SEROLÓGICA DE LEISHMANIASIS VISCERAL Y TRIPANOSOMIASIS CANINA

Marlyn Hellen Romero Peñuela¹
Jorge Alberto Sánchez Valencia¹

RESUMEN

Un estudio transversal fue desarrollado para evaluar la seroprevalencia de la leishmaniasis visceral zoonótica y la tripanosomiasis americana en 211 caninos mestizos de una zona endémica para los dos protozoarios en el sur del departamento del Tolima. Los anticuerpos séricos anti-*Leishmania infantum* y anti-*Trypanosoma cruzi* fueron determinados por medio de las técnicas ELISA y Western Blot, usando los antígenos recombinantes rK39 y TESA, respectivamente. Se realizó xenodiagnóstico a los animales seropositivos a *T. cruzi*. De acuerdo con los resultados, el 40,28% (85/211) y el 1,42% (3/211) de los caninos presentaron anticuerpos contra *L. infantum* y *T. cruzi*, respectivamente. El xenodiagnóstico fue negativo. Los resultados sugieren que los caninos pueden jugar un papel importante como reservorios de *L. infantum* y fuentes de infección para la población infantil del área de estudio. Sin embargo, los perros podrían tener un papel limitado en la transmisión de *T. cruzi*. Se hace necesario contar con un algoritmo de pruebas diagnósticas para confirmar el estado real de la infección de los animales y para establecer la presencia de reacciones cruzadas o coinfecciones.

Palabras clave: antígeno rK39, antígenos TESA, ELISA, leishmaniasis visceral zoonótica, Western Blot.

USE OF RECOMBINANT ANTIGENS FOR SEROLOGICAL EVALUATION OF CANINE VISCERAL LEISHMANIASIS AND TRIPANOSOMIASIS

ABSTRACT

A cross-sectional study was conducted in order to evaluate the seroprevalence of zoonotic visceral Leishmaniasis and American Trypanosomiasis in 211 mongrel dogs from an endemic area for the two protozoans in southern Tolima. Serum anti-*Leishmania infantum* and anti-*Trypanosoma cruzi* antibodies were determined by ELISA and Western Blot techniques, using rK39 and TESA recombinant antigens respectively. The Xenodiagnosis was performed on the seropositive to *T. cruzi*. According to the results, 40.28% (85/211) and 1.42% (3/211) of the dogs tested positive for antibodies against *L. infantum* and *T. cruzi* respectively. The Xenodiagnosis was negative. The results suggest that dogs may play an important role as reservoirs of *L. infantum* and

¹ Profesores Departamento Salud Animal, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad de Caldas. Correspondencia: Calle 65 No. 26-10, Manizales. Tele-fax: 8781516. E-mail: marlyn.romero@ucaldas.edu.co, jorge.sanchez@ucaldas.edu.co

infection sources for children in the study area. However, dogs may play a limited role in the transmission of *T. cruzi*. It is necessary to have an algorithm for diagnostic tests to confirm the actual status of the animals' infection and to establish the presence of cross-reactions or co-infections.

INTRODUCCIÓN

Los tripanosomátidos que pueden afectar al hombre en América pertenecen al género *Leishmania* y *Trypanosoma* (1, 2). El primero incluye diferentes especies de *Leishmania*, entre las cuales se encuentra *Leishmania infantum* (=chagasi), como el agente responsable de la leishmaniasis visceral zoonótica (LVZ); en el segundo caso se ha encontrado *Trypanosoma cruzi* como el responsable de la Tripanosomiasis Americana (1, 3). En el perro pueden coexistir potencialmente las dos parasitosis de importancia médica para la salud humana (4).

El papel relevante de los caninos como reservorios domésticos de la LVZ ha sido evaluado por muchos investigadores, siendo considerado como responsable de la presentación endémica/epidémica natural de la enfermedad, sugiriéndose que el hombre sería una fuente de infección secundaria para los vectores flebotomíneos de los géneros *Lutzomyia* sp. o *Phlebotomus* sp., y la transmisión dependería básicamente de la presencia de caninos infectados (5-7). Se ha demostrado además que los caninos son los principales reservorios domésticos de la enfermedad de Chagas, pudiendo contribuir a la transmisión de *T. cruzi* cuando el hombre cohabita con los insectos vectores de la familia Reduviidae (2, 8). Se ha resaltado también su papel como centinela de la enfermedad en los humanos, jugando un papel importante en la vigilancia epidemiológica activa de la enfermedad y en la evaluación de la efectividad de las desinsectaciones, cuando se implementan como medida de control en zonas endémicas (4, 8, 9).

Key words: rk39 antigen, TESA antigens, ELISA, zoonotic visceral leishmaniasis, Western Blot.

Convencionalmente para el diagnóstico serológico de las dos parasitosis, se han utilizado fracciones antigénicas de las formas no infectivas de los parásitos; los promastigotes para la leishmaniasis visceral y de epimastigotes, para la tripanosomiasis americana, los cuales están constituidos por un complejo de moléculas que favorecen la aparición de reacciones falsas positivas y la reacción cruzada con sueros de pacientes con otras enfermedades, los cuales presentan una limitada especificidad (3, 7). Estos antígenos, además, no diferencian el diagnóstico de las fases crónicas y agudas, entre las manifestaciones clínicas de la enfermedad de Chagas (10-13).

Las pruebas de Inmunoensayo Ligado a Enzimas (ELISA) e Inmunofluorescencia Indirecta (IFI), han sido descritas como valiosas para el diagnóstico de *L. infantum* y *T. cruzi*, las cuales poseen una alta sensibilidad, pero su especificidad puede ser baja, debido a la reacción cruzada entre las dos especies de parásitos, aspecto que es importante tener en cuenta, en especial cuando se desea conocer la prevalencia en zonas endémicas para estas dos enfermedades (2, 3, 14). Sin embargo, se ha propuesto el uso de antígenos recombinantes para el serodiagnóstico de las infecciones por los dos parásitos, que permiten incrementar la sensibilidad y especificidad de las pruebas (4, 7, 9, 15). El uso de antígenos definidos que contengan epitopes específicos de *T. cruzi* y *L. infantum*, pueden superar esta dificultad, aspecto que la Organización Mundial de la Salud ha enfatizado en su necesidad para mejorar las pruebas diagnósticas (11, 16-18). El objetivo del presente estudio fue establecer la seroprevalencia

de la leishmaniasis y tripanosomiasis canina por medio de las técnicas de ELISA con antígeno recombinante rK39 y Western Blot (WB) con antígenos TESA, respectivamente.

MATERIALES Y MÉTODOS

Área geográfica

El área de estudio se localiza en el sur del departamento del Tolima y está conformada por los municipios de Coyaima, Natagaima, Purificación, Ataco, Coello y Ortega, zona endémica a la enfermedad de Chagas. Se caracterizan por ser zonas climáticas variadas, donde hay bosque seco tropical, bosque húmedo premontano y bosque muy húmedo montano bajo. Los municipios se encuentran a una altitud que fluctúa entre 323 y 1445 msnm (19).

Sueros. El estudio incluyó 211 caninos mestizos, los cuales fueron muestreados mediante venopunción de la vena cefálica, previo consentimiento informado escrito dado por los propietarios, siguiendo las normas éticas para el manejo de animales establecidas en la Ley 84 de 1989 y el Decreto 2257 de 1986 en su Artículo 49. Las muestras se centrifugaron y se almacenaron en alícuotas en condiciones de congelación hasta su procesamiento.

Examen clínico. De acuerdo a su condición clínica los animales fueron clasificados como asintomáticos, cuando no presentaron ningún signo clínico compatible con la infección; oligosintomáticos (uno o dos síntomas) y polisintomáticos (>2 síntomas), como ha sido descrito por Travi (20).

ELISA con antígeno recombinante. Se utilizó el Kit KalazarDetect™L-MRA ELISA system for canine, kit elaborado por InBios Internacional (Seattle, WA). El procedimiento se realizó de acuerdo a las indicaciones del fabricante, con diluciones de los sueros de 1:50. Las absorbancias se leyeron a una longitud de onda de 405 nm en

un colorímetro UNISKAN I. Se consideraron como positivos los sueros que presentaron densidades ópticas iguales o mayores que 0,323, de acuerdo a los lineamientos del fabricante.

TESA-BLOT. La prueba se llevó usando los antígenos recombinantes TESA de *Trypanosoma cruzi*, por medio de un trabajo colaborativo con la Dra. Eufrosina S. Umezawa, investigadora del Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo, Universidad de Sao Paulo, Brasil.

Xenodiagnóstico. A los animales seropositivos a la técnica Tesa-Blot se les efectuó el xenodiagnóstico, colocando sobre el abdomen diez ninfas de quinto estadio de *Rhodnius prolixus* previamente ayunadas, verificando la ingestión de la sangre de todos los insectos. Posteriormente, las ninfas se mantuvieron con sangre de gallina y se examinaron tres veces durante 90 días. La infección parasitaria se determinó mediante la observación de la hemolinfa en microscopio de luz (400 X).

Análisis Estadístico. Se elaboró una base de datos y el análisis descriptivo usando el paquete estadístico EPIINFO Versión 6.04.

RESULTADOS

La población estudiada estuvo conformada por perros mestizos (n=211), con una edad promedio entre 1 y 2 años. El 55,5% (117/211) machos y el 44,5% (94/211) hembras. La frecuencia de seropositividad anti-*Leishmania* establecida por ELISA con antígeno recombinante fue del 40,28% (85/211) y para *T. cruzi* fue del 1,42% (3/211) mediante la técnica WB usando los antígenos recombinantes TESA. Los tres caninos seropositivos para la infección con *T. cruzi*, presentaron también serorreactividad en la prueba de ELISA para *L. infantum*. El xenodiagnóstico fue negativo y por lo tanto no se pudieron aislar cepas de *T. cruzi*. El 37,6% de los caninos seropositivos para *L. infantum* fueron asintomáticos y el 62,4% restantes oligosintomáticos.

DISCUSIÓN

El análisis seroepidemiológico efectuado en la población canina incluida en el estudio proporciona evidencia de exposición previa a los tripanosomátidos *L. infantum* y *T. cruzi*. La seroprevalencia de *L. infantum* fue más alta que las encontradas en estudios similares realizadas en Colombia por Inmunofluorescencia Indirecta en Neiva (Huila) con un 17,2%; Córdoba, 16%; Cerro Vidales y Ovejas (Sucre), 3,8%; Rovira (Tolima), 12,5%; San Andrés de Sotavento (Córdoba) y Ovejas (Sucre), 9,6% (14).

El antígeno recombinante usado en la técnica de ELISA fue la proteína rK39, que es un miembro de la familia de las kinesinas con repeticiones de una secuencia de 39 aminoácidos conservados en el extremo 3 terminal, de 117 pb, derivada de un gen clonado de *Leishmania chagasi* y expresado en *E. coli* (21-23). Esta proteína es conservada entre las especies de *Leishmania* más comúnmente asociadas con LV y es expresada predominantemente por los amastigotes (22, 24). El antígeno rK39 ha sido utilizado para el diagnóstico de LVZ aguda en varias partes del mundo, reportándose sensibilidades del 100% y especificidades entre el 93 y el 100% (24), describiendo su utilidad en estudios epidemiológicos porque no presenta reacciones cruzadas con otros patógenos (7, 22, 24). De acuerdo con estos reportes se podría sugerir que los resultados obtenidos en el presente trabajo son útiles para establecer un diagnóstico precoz de casos de vigilancia epidemiológica e instaurar medidas preventivas (21, 24).

La alta seroprevalencia de *L. infantum* en la población canina evaluada sugiere que esta especie juega un papel importante en la transmisión peridoméstica del parásito (20). Sin embargo, la eliminación de los caninos de las zonas endémicas como medida de control de la LVZ, ha demostrado que tiene un efecto a largo plazo en la disminución de la incidencia de la enfermedad en poblaciones humanas y caninas, porque la infectividad de los caninos hacia los

vectores difiere según su estado nutricional, la capacidad infectante del vector y por las diferencias entre las especies de *Leishmania* (20). Estudios realizados en Colombia que han evaluado caninos con diferentes signos clínicos compatibles con LVC e infección confirmada por aislamiento y cultivo, y su competencia como reservorios de *L. infantum*, han sugerido que los caninos polisintomáticos presentan una mayor capacidad de transmitir el agente a los vectores, cuando se comparan con los animales oligosintomáticos y asintomáticos (20). En el presente trabajo la mayor proporción de caninos seropositivos fueron oligosintomáticos (62,4%), condición que sería importante de estudiar en posteriores estudios, con la finalidad de definir su capacidad infectante y el papel real de los caninos en la transmisión de *L. infantum* en el área endémica evaluada.

Con la finalidad de discriminar reacciones cruzadas con *T. cruzi*, se realizó una prueba de WB denominada TESA blot, que contiene antígenos específicos de trypomastigotes, que muestran una alta sensibilidad no sólo en los casos de enfermedad de Chagas crónica, sino también en la enfermedad aguda y congénita (10). Esta técnica permite detectar los caninos que se encuentran en la fase crónica de la enfermedad, porque las inmunoglobulinas G presentes en los sueros, reaccionan con antígenos de 150-160 kDa, mientras que los pacientes en la fase aguda y en la enfermedad congénita, las inmunoglobulinas IgG y IgM reaccionan con los componentes que presentan un peso entre 130-200 kDa (10, 12, 16). La prueba detectó sólo 3 caninos infectados, que corresponde a una prevalencia en el grupo evaluado del 1,42% (3/211 caninos), más baja que la reportada en Colombia en los municipios de Soatá y Berbeo (Boyacá) del 10,72%; así como la reportada por otros autores en Costa Rica del 27,7% mediante ELISA (4), en Argentina del 41,2% por xenodiagnóstico (25) y del 15,09% por serología y examen parasitológico (26), en México del 17,5% usando cinco pruebas serológicas (27) y en Venezuela del 67,6% por análisis serológicos y

parasitológicos (28). Similares resultados se han establecido en Texas usando diferentes técnicas diagnósticas (9). De acuerdo a lo anteriormente descrito, uno de los caninos evaluados presentó reactividad con bandas localizadas entre los 150 y 160 kDa, que sugiere un estadio crónico de la infección y dos caninos presentaron bandas entre los 130 y 200 kDa, que corresponden a infección aguda. Sin embargo, de acuerdo con los resultados de xenodiagnóstico negativo, no se pudieron evidenciar infecciones agudas de *T. cruzi* en los caninos seropositivos.

De otra parte, dado que para confirmar la infección por *Trypanosoma cruzi* mediante el uso de pruebas serológicas, se recomienda la implementación de dos pruebas diagnósticas (9, 25, 29); en el presente trabajo no se puede concluir un diagnóstico definitivo de tripanosomiasis canina. Sin embargo, dada la alta especificidad de los epitopes usados, podemos sugerir que el parásito está circulando en la población canina evaluada. Aunque la seroprevalencia es baja, es importante considerar que el vector más importante de la enfermedad de Chagas en Colombia, *Rhodnius prolixus*, se encuentra estrictamente domiciliado en el área geográfica (Valle del río Magdalena) incluida en el presente trabajo (30), tiene buena capacidad para infectarse y transmitir el parásito, características que nos permiten sugerir que al existir contacto con reservorios presentes en el domicilio y peridomicilio, como el caso de los caninos, esto

podría favorecer la transmisión de la enfermedad en la población humana susceptible, aspectos que requieren de estudios complementarios (31).

Finalmente, no podemos establecer un criterio concluyente para determinar la existencia de reacciones cruzadas o coinfecciones entre *L. infantum* y *T. cruzi* en los caninos evaluados, aspecto que ha sido descrito por otros autores previamente (5-7, 29). Se ha reportado que el uso de un sólo antígeno, tanto en los estudios de tamizaje, como en la confirmación de la infección de LVZ, puede incrementar la proporción de resultados falsos positivos, particularmente en los casos de baja prevalencia, siendo importante considerar la necesidad de estandarizar antígenos recombinantes específicos para fortalecer los programas de control y establecer un algoritmo de pruebas diagnósticas en el país para confirmar el estado real de la infección por LVZ y tripanosomiasis americana en animales naturalmente infectados y para discriminar reacciones cruzadas o coinfecciones como lo han reportado otros investigadores en Colombia (3, 13).

AGRADECIMIENTOS

Los autores quieren expresar su agradecimiento a la Secretaría Departamental de Salud del Tolima (Colombia), por el financiamiento de esta investigación.

REFERENCIAS

1. 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.
2. Turriago BC, Vallejo GA, Guhl F. Seroprevalencia de *Trypanosoma cruzi* en perros de dos áreas endémicas de Colombia. Revista Med 2008;16(1):11-18.
3. Romero MH, López MC, Echeverry MC, Rivas F. Leishmaniasis visceral canina: pruebas diagnósticas no identifican estados reales de la infección. Rev. Salud pública 2008;10(2):290-298.
4. Montenegro V, Jiménez M, Pinto Dias JC, Zeledón R. Chagas disease in dogs from endemic areas of Costa Rica. Mem Inst Oswaldo Cruz 2002;97(4):491-494.
5. Courtenay O, Rupert J, Quinnell L, Garcez M, Shaw J, Dye D. Infectiousness in a Cohort of Brazilian dogs: Why culling fails to control visceral leishmaniasis in areas of high transmission. J Infect Dis 2002;186:1314-1320.
6. Cabrera M A, Paula A, Camacho LA, Marzochi MC, Xavier SC, Da Silva AV, et al. Canine Visceral Leishmaniasis in Barra de Guaratiba, Rio de Janeiro, Brazil: Assesment of risk factors. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo 2003;45(2):79-83.
7. 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.
8. Cardinal MV, Lauricella MA, Marcet PL, Orozco MM, Kitron U, Gürtler RE. Impacto f community-based vector control on house infestation and *Trypanosoma cruzi* infection in *Triatoma infestans*, dogs and cats in the Argentine Chaco. Acta Trop. 2007;103(3):201-211.
9. Shadomy S, Waring SC, Chappell C. Combined use of Enzyme-linked Immunoabsorbent assay and flow cytometry to detect antibodies to *Trypanosoma cruzi* in domestic canines in Texas. Clin Diagn Lab. Immunol. 2004;3:313-319.
10. Umezawa E, Da Silveira JF. Serological diagnosis of Chagas disease with purified and defined *Trypanosoma cruzi* antigens. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 1999;94(1):285-288.
12. Umezawa E, Luquetti A, Levitus G, Ponce C, Ponce E, Henríquez D, et al. Serodiagnosis of chronic and acute Chagas' disease with *Trypanosoma cruzi* recombinant proteins: results of a collaborative study in six Latin American countries. J. Clin. Microbiol. 2004;42:449-452.
13. Luquetti AL, Ponce C, Ponce E, Esfandiari J, Schijman A, Revollo S, et al. Chagas disease diagnosis: a multicentric evaluation of Chagas stat-pak, a rapid immunochromatographic assay with recombinant proteins of *Trypanosoma cruzi*. Diag. Microbiol. Infect. Dis. 2003;46:267-271.
14. Fernández J, Charry T, Bello F, Escobar J, Lozano C, Ayala M, et al. Prevalencia de Leishmaniosis visceral canina en municipios de Huila, Colombia. Rev. Salud pública 2002;4(3):278-285.
15. Lauricella MA, Castanera MB, Gürtler RE, Segura EL. Immunodiagnosis of *Trypanosoma cruzi* (Chagas Disease) infection in naturally infected dogs. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 1998;93(4):501-507.
16. Nakazawa M, Rosa D, Pereira V, Moura M, Furtado V, Souza W, et al. Excretory-secretory antigens of *Trypanosoma cruzi* are potentially useful for serodiagnosis of Chronic Chagas' disease. Clin. Diagn. Lab. Immunol. 2001;8(5):1024-1027.

17. Salotra P, Sreenivas G, Pogue G, Lee N, Nakhasi H, Armes V, Negi NS. Evaluation of enzyme-linked immunoabsorbent assay for diagnosis of Post-kalazar termal leishmaniasis with crude or recombinant k39 antigen. *J. Clin. Microbiol.* 2001;39(3):849-854.
18. Carvalho GS, Lemos EM, Corey R, Dítese R. Performance of recombinant K39 antigen in the diagnosis of Brazilian Visceral Leishmaniasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2003;68(3):321-324.
19. Instituto Colombiano Agustín Codazzi. Diccionario Geográfico de Colombia. Bogotá, D.C.; 1996.
20. Travi B, Tabares CJ, Cadena H, Ferro C, Osorio Y. Canine visceral leishmaniasis in Colombia. Relationship between clinical and parasitologic status and infectivity for sand flies. *J. Trop. Med. Hyg.* 2001;64(3,4):119-124.
21. Téran-Angel G, Schallig H, Zerpa O, Rodríguez V, Ulrich M, Cabrera M. The direct agglutination test as an alternative method for the diagnosis of canine and human visceral Leishmaniasis. *Biomédica* 2007;27:447-53.
22. Braz R, Nascimento E, Martins D, Wilson M, Pearson RD, Reed S, Jeronimo S. The sensitivity and specificity of *Leishmania chagasi* recombinant k39 antigen in the diagnosis of American Visceral Leishmaniasis and in differentiating active from subclinical infection. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2002;67(4):344-348.
23. Kumar P, Pai K, Tripathi K, Pandey H, Sundar S. Immunoblot Analysis of the humoral immune response to *Leishmania donovani* polypeptides in cases of human visceral Leishmaniasis: its usefulness in prognosis. *Clin. Diag. Lab. Immunol.* 2002;9:1119-1123.
24. Reithinger R, Quinnell R, Alexander B, Davies C. Rapid detection of *Leishmania infantum* in dogs: comparative study using immunochromatographic Dipstick Test, Enzyme-linked immunosorbent Assay, and PCR. *J. Clin. Microbiol.* 2002;40(7):2352-2356.
25. Gurtler R, Cohen J, Cecere M, Lauricella M, Chuit R, Segura E. Influence of humans and domestic animals on the household prevalence of *Trypanosoma cruzi* in *Triatoma infestans* populations in northwest Argentina. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1998;58(6):748-758.
26. Diosque P, Padilla A, Cimino R, Cardozo R, Sánchez O, Marco J, Zacca R, et al. Chagas disease in rural areas of Chaco province Argentina: epidemiologic survey in humans, reservoirs, and vectors. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2004;71(5):590-593.
27. Estrada-Franco JG, Bhatia V, Díaz-Albiter H, Ochoa-Gracia L, Barbosa A, Vázquez-Chagoyan JC, et al. Human *Trypanosoma cruzi* infection and seropositivity in dogs, Mexico. *Emerging Infection Disease* 2006;12(4):624-630.
28. Crisante G, Rojas A, Teixeira MM, Añez N. Infected dogs as a risk factor in the transmission of human *Trypanosoma cruzi* infection in western Venezuela. *Acta Trop.* 2006;98(3):247-252.
29. Rojas ME, Várquez P, Villarreal MF, Velandia C, Vergara L, Morán-Borges YH, et al. Estudio seroepidemiológico y entomológico sobre la enfermedad de Chagas en un área infestada por *Triatoma maculata* (Erchson 1848) en el centro-occidente de Venezuela. *Cad. Saúde Pública* 2008;24(10):2323-2333.
30. Vallejo GA, Guhl F. Ciclos ecoepidemiológicos de *Trypanosoma cruzi* en Colombia. *Biomédica* 2009;29(Supl):97-103.
31. López DC, Jaramillo C, Guhl F. Estructura poblacional y variabilidad genética de *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae) procedente de diferentes áreas geográficas de Colombia. *Biomédica* 2007;27(Supl 1):28-39.