



El diagnóstico de la leishmaniasis visceral canina (*Leishmania infantum*)

REVISIÓN DE LITERATURA

Marlyn Hellen Romero-Peñuela¹, Jorge Alberto Sánchez-Valencia¹

¹Departamento de Salud Animal, Universidad de Caldas, Manizales, Colombia.

marlyn.romero@ucaldas.edu.com

(Recibido: 7 diciembre, 2006; aprobado: 18 abril, 2007)

RESUMEN: La Leishmaniasis Visceral (LV) es una enfermedad infecciosa de evolución crónica, causada por un protozooario *Leishmania infantum*, que afecta al hombre y a los caninos; es transmitida principalmente por la picadura del vector *Lutzomyia longipalpis*, con incriminación de *Lutzomyia evansi* en partes de Colombia y Venezuela. El perro actúa como el principal reservorio doméstico del parásito en todo el mundo, haciendo parte del ciclo epidemiológico de transmisión humana. Dada la importancia epidemiológica de los caninos en el control de la LV y la necesidad de determinar el impacto real de la infección en las zonas endémicas, es fundamental el empleo de pruebas diagnósticas eficientes, que no subestimen la incidencia, ni la prevalencia de la enfermedad, y que permitan además obtener resultados confiables, que minimicen las reacciones falsas positivas y la reacción cruzada con otros parásitos relacionados. El presente artículo revisa las técnicas diagnósticas para la Leishmaniasis Visceral Canina (LVC) y establece de forma general algunas prioridades de investigación y desarrollo en esta área.

Palabras clave: inmunoensayo, enzimas, inmunofluorescencia indirecta, prueba diagnóstica, western blot

The canine visceral leishmaniasis (*Leishmania infantum*) diagnosis

ABSTRACT: Visceral Leishmaniasis (VL) is an infectious disease of chronic evolution caused by the protozoan *Leishmania infantum*, which affects humans and canines. It is transmitted mainly by the vector *Lutzomyia longipalpis*, with incrimination of *Lutzomyia evansi* in parts of Colombia and Venezuela. Dogs are considered the main domestic reservoir of the parasite in the world, constituting part of the epidemiological cycle of human transmission. Given the epidemiological importance of canines in the control of Visceral Leishmaniasis and the need to determine the real impact of the infection in the endemic areas, the employment of diagnostic efficient tests is fundamental, that don't underestimate the incidence, nor the prevalence of the disease, and that also allows the acquisition of reliable results, which minimize the false-positive reactions and the cross-reactions with other related parasites. The present article checks the diagnostic methods for Canine Visceral Leishmaniasis (CVL) and establishes, in a general manner, some research and development priorities in this topic.

Key words: enzyme, immunosorbent, indirect immunofluorescence, diagnostic tool, western blot

Introducción

En Colombia, los focos más importantes de Leishmaniasis Visceral (LV) se encuentran distribuidos a lo largo de la cuenca del río Magdalena, en los departamentos de Huila, Tolima y Cundinamarca. Se han reportado otras áreas de transmisión en las sabanas de Bolívar, Sucre, Córdoba, La Guajira y Santander. En estas zonas de forma concomitante habitan los vectores *Lutzomyia longipalpis* y *Lutzomyia evansi*, involucrados en la transmisión (Travi, 1998).

La Leishmaniasis Visceral Zoonótica (LVZ) es una enfermedad de curso grave que afecta a niños menores de cinco años principalmente en América y a adultos jóvenes o personas inmunosuprimidas en el Mediterráneo, con una letalidad que puede llegar al 95% en el hombre (Figura 1) (Alves & Bevilacqua, 2004). Así mismo, la enfermedad en los caninos, presenta repercusiones tanto en la Salud pública, por su carácter zoonótico, como en la Medicina Veterinaria, por la dificultad de realizar un diagnóstico precoz 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 (Miles et al., 1999; Savani et al., 2003).



Figura 1. Niño con leishmaniasis visceral en Coyaima, Tolima (Colombia).

Dada la importancia epidemiológica de los caninos en la transmisión de la LVZ en las zonas endémicas, es fundamental seleccionar las pruebas utilizadas para el diagnóstico precoz de la enfermedad; teniendo en cuenta además, que tradicionalmente los métodos de control de la LVZ

se han centrado básicamente en el tratamiento de las personas afectadas, disminución de la densidad del vector y en la identificación y eliminación de caninos infectados (Marzochi & Marzochi, 1994; Miles & Vexenat, 1999; Alves & Bevilacqua, 2004).

El presente artículo tiene como objetivo presentar una revisión bibliográfica sobre las principales metodologías utilizadas para el diagnóstico de la Leishmaniasis Visceral Canina (LVC) y realizar una discusión crítica al respecto, a fin de orientar la selección de las técnicas diagnósticas, conocer sus limitaciones y los retos que tenemos los profesionales de la salud en la investigación en este tópico.

El diagnóstico de la LVC

Debido a la variedad de signos clínicos presentes en la Leishmaniasis Visceral Canina el diagnóstico es muy difícil, motivo por el cual se han desarrollado variados procedimientos para facilitar esta tarea. Sin embargo, es esencial el conocimiento de las bases de cada prueba, sus limitaciones y su interpretación clínica. Así mismo, se recomienda el uso de más de una prueba diagnóstica (Fernández-Pérez et al., 1999; Palatnik-De-Sousa et al., 2001). El diagnóstico definitivo algunas veces depende del aislamiento del parásito en medios de cultivo o por la detección del DNA parasitario por la técnica PCR a partir de biopsias de médula ósea o nódulos linfáticos. Sin embargo estas técnicas son invasivas, costosas y requieren mucho tiempo para su desarrollo (Lachaud et al., 2001; Mettler et al., 2005). A continuación se describen las técnicas más viables para ser usadas en nuestro medio.

Diagnóstico clínico

La Leishmaniasis Visceral Canina presenta un extraordinario pleomorfismo de signos clínicos, que se caracteriza por formas latentes asintomáticas hasta formas patentes agudas, subagudas o crónicas regresivas, cuyas manifestaciones dependen de la fase de infección, del estado inmunológico del hospedero y de si se



Figura 2. Los animales mestizos con cambios dermatológicos, onicogriphosis y pérdida de peso, son característicos del área endémica colombiana.

instauró o no un tratamiento específico previo (Pinelli et al., 1994; Moreira et al., 2007). Las formas latentes son las más comunes y se asocian con una adecuada respuesta inmunológica de tipo celular por parte del canino infectado, lo contrario sucede en las formas agudas o crónicas donde se ha deteriorado la respuesta celular frente al parásito a pesar de existir una marcada respuesta inmune de tipo humoral (Binhazim et al., 1993; Pinelli et al., 1994; Ciaramella et al., 1997).

El periodo de incubación es variable, oscila entre 30 días hasta varios años, aún en los casos experimentales. Después del periodo de incubación, la infección se disemina e involucra progresivamente los tejidos subcutáneo, linfático, médula ósea y finalmente órganos internos como el hígado y el bazo (Binhazim et al., 1993; Ciaramella et al., 1997). En los casos agudos se presenta únicamente fiebre (temperaturas mayores a 40°C) y linfadenomegalia (Ciaramella et al., 1997). Los signos clínicos encontrados más frecuentes son linfadenomegalia, pérdida de peso, cambios dermatológicos y onicogriphosis (Ciaramella et al., 1997; Moreira et al., 2007). Sin embargo, es posible encontrar lesiones oculares que involucran principalmente la cámara anterior del ojo (Ciaramella et al., 1997). En estados terminales, los caninos manifiestan deterioro marcado del estado general, emaciación y finalmente caquexia (Marzochi & Marzochi, 1994; Binhazim et al., 1993; Pinelli et al., 1994).

De acuerdo con los signos clínicos los caninos infectados con *L. infantum* se han clasificado como: sintomáticos, aquellos que presentan más de tres signos clínicos; oligosintomáticos, con uno hasta tres signos clínicos; y caninos

asintomáticos, sin sintomatología (Marzochi & Marzochi, 1994; Travi et al., 2001; Moreira et al., 2007).

Debido al cuadro clínico variado e inespecífico, es necesario hacer diagnóstico diferencial con otras enfermedades infecciosas y desórdenes inmunomediados (Figura 2); además, se ha demostrado que no existe asociación entre los signos clínicos y los resultados serológicos, por tanto se recomienda que el examen médico de los animales sospechosos de sufrir LVC, no puede ser tenido en cuenta como criterio único para la definición de caso sospechoso o definitivo, siendo necesario para tal fin, emplear pruebas diagnósticas complementarias.

Métodos parasitológicos

Son los métodos más antiguos usados en la detección de amastigotes en frotis teñidos de aspirados de médula espinal, bazo, hígado o nódulos linfáticos, implementados para el diagnóstico humano y canino a partir de los años 30 (Alves & Bevilacqua, 2004). Las impresiones citológicas se pueden realizar también con lesiones mucosas o dermales. Las técnicas inmunoquímicas para detectar *Leishmania* en tejidos seccionados (normalmente biopsias de piel) también son usadas. La limitación de este método de diagnóstico, es que es invasivo y poco exitoso para detectar parásitos en caninos asintomáticos (Lachaud et al., 2001; Mettler et al., 2005). En estudios realizados en Colombia (Fernández et al., 2002) y en otros países usando el examen parasitológico directo, han demostrado que presenta una alta especificidad, pero una sensibilidad inferior al 26%, siendo necesario

incluirlo como examen complementario al examen físico del animal y a otras técnicas diagnósticas.

Métodos serológicos

Teniendo en cuenta que el espectro clínico y la respuesta celular en LVC son muy variables y que las pruebas parasitológicas directas son muy poco sensibles, las pruebas serológicas se constituyen en una herramienta esencial para detectar portadores asintomáticos y monitorear el esquema de control (Fernández-Pérez et al., 1999). Los métodos serológicos sugieren la presencia de parásitos a partir de la detección de los anticuerpos circulantes en el suero de los caninos sospechosos, los cuales pueden persistir durante años en los caninos que no manifiesten la enfermedad clínica y son fundamentales en el diagnóstico de LVC en los casos de infecciones tempranas y en evaluaciones epidemiológicas dirigidas a controlar individuos infectados en áreas endémicas, así como para establecer la seroprevalencia, debido al largo periodo de incubación y a las características de cronicidad de la enfermedad (Aisa et al., 1998; Vercammen et al., 2002; Iniesta et al., 2002). Este grupo incluye la prueba de Inmunofluorescencia indirecta (IFI), Aglutinación directa, Inmunoensayo ligado a enzimas (ELISA), ELISA competitiva, Dot-ELISA, Inmunodifusión y Western Blot (WB). Sin embargo, describiremos las técnicas más usadas en Colombia: IFI, ELISA y WB.

Inmunofluorescencia indirecta (IFI)

La prueba de inmunofluorescencia indirecta (IFI), empezó a ser utilizada en el diagnóstico de la LVC a partir de la década de los 60s y desde entonces, ha sido reconocida universalmente como la “prueba de oro”, así mismo, es la técnica recomendada en el Manual de Pruebas Diagnósticas para Epizootias de la Oficina Internacional de Sanidad Animal OIE (Gradoni, 2002). Presenta buenos valores de sensibilidad (varía entre el 90 y el 100%) y especificidad (80%). (Alves & Bevilacqua, 2004). Sin embargo, en estudios realizados en Colombia, usando antígenos totales de la cepa colombiana de *Leishmania infantum* (*infantum*) MHOM/CO/CL044B en animales experimentalmente

infectados (Vargas, 2005), se establecieron valores de sensibilidad y especificidad más bajos, del 69,7% y 67,5%, respectivamente. La baja especificidad de IFI es debida a la presencia de reacciones cruzadas con enfermedades causadas por otros tripanosomátidos como la enfermedad de Chagas y la Leishmaniasis tegumentaria (Fernández-Pérez et al., 1999; Savani et al., 2003; Alves & Bevilacqua, 2004).

Se ha propuesto el uso de formas amastigotas de *Leishmania donovani*, como antígeno, aumentando significativamente la sensibilidad, sin perder la especificidad de la prueba, aspectos que han permitido sugerirla para el diagnóstico precoz de animales asintomáticos y oligosintomáticos y para realizar el monitoreo de la evaluación clínica de animales tratados (Fernández-Pérez. et al., 1999; Alves & Bevilacqua, 2004).

Se han descrito como ventajas de IFI, su facilidad de ejecución, rapidez en la emisión de los resultados y bajo costo. Sin embargo, los inconvenientes que presenta, están relacionados con su precisión. Los valores predictivos son indicadores utilizados para la interpretación de resultados de las pruebas de diagnóstico, siendo influenciados por los valores de sensibilidad y especificidad de éstas. Teniendo en cuenta los valores de sensibilidad y especificidad de la prueba de IFI, los autores afirman que existe una elevada confianza en un resultado negativo de un animal, porque el valor predictivo negativo de la prueba es alto; a diferencia de lo que se puede afirmar, cuando un canino presenta un resultado positivo para LVC, porque la técnica permite identificar un alto número de animales falsos positivos, debido a su baja especificidad (Alves & Bevilacqua, 2004).

Otro aspecto importante que debe ser tenido en cuenta para evaluar una técnica diagnóstica, es el límite de reactividad o el punto de corte (*cut off*), que se entiende como la región de corte de los resultados de una prueba serológica, es decir el valor a partir del cual se considera un resultado positivo (Guhl & Nicholls, 2001). Se ha sugerido que no hay consenso sobre las diluciones a las cuales un suero puede ser considerado positivo

usando la prueba de IFI. Los reportes presentan títulos que varían entre 1/20 hasta 1/160, sugiriendo la existencia de una zona gris, es decir, cerca al punto de corte; indicando que estos bajos títulos pueden ocurrir debido a reacciones cruzadas, formas resolutivas o latentes de la infección o baja respuesta humoral en el animal o contacto con diferentes parásitos hospederos (infecciones mixtas) (Aisa et al., 1998; Cabrera et al., 2003). En el caso que se den estas situaciones, es necesario confirmar el resultado con otra prueba convencional para asegurar el verdadero diagnóstico del paciente (Guhl & Nicholls, 2001).

Así mismo, en la prueba IFI se utilizan preparaciones de antígenos crudos, que no pueden ser correlacionados con el nivel de parasitismo, ni con el estatus de la infección de los caninos de las zonas endémicas (Aisa et al., 1998). Otras de las desventajas descritas para esta técnica, son: que no tiene ningún valor la titulación obtenida sobre la progresión de la enfermedad, no revela la intensidad de transmisión por parte de los reservorios caninos y no discrimina los caninos susceptibles de aquellos resistentes (De Paula et al., 2003).

Inmunoensayo ligado a enzimas (ELISA)

La prueba de ELISA se empezó a utilizar en el diagnóstico de la LVC en la década de los 70, teniendo variaciones de Dot-ELISA, Ligandos de Fucosa Manosa-ELISA FML-ELISA, mucina submaxiliar bovina-ELISA (BSM-ELISA), Fast ELISA, micro ELISA, entre otras (Alexandre & Dias 2004). Esta prueba ha presentado valores de sensibilidad que oscilan entre el 85 y el 96% y de especificidad del 86% al 98%, valores muy similares a los presentados por la prueba de IFI (Bernardina et al., 1997; Travi et al., 2001; Vega et al., 2003). La utilización de antígenos recombinantes o purificados como las glicoproteínas de membrana (gp63, gp72 o rK39) específicas del género *Leishmania*, ha mejorado la sensibilidad y especificidad de la técnica (Lauricella et al., 1998, Vercammen et al., 2002., Abdeen, et al., 2002; Braz et al., 2002).

Las variaciones en la sensibilidad y especificidad de la prueba de ELISA se deben a modificaciones introducidas en la preparación de los antígenos completos o a el empleo de antígenos purificados y/o recombinantes (Alexandre & Dias, 2004). Las preparaciones de antígenos crudos elaboradas con promastigotes completos o sus extractos solubles limitan la estandarización de las pruebas y la reproducibilidad de los resultados (Riera et al., 1999; Vega et al., 2003; Alexandre & Dias, 2004; Do Rosario, et al., 2005). Los antígenos crudos son derivados de promastigotes cultivados in vitro y consisten en una amplia variedad de antígenos somáticos y componentes de superficie. Se ha reportado además, que la prueba de ELISA permite la reacción antigénica cruzada entre *Leishmania sp.* y *Trypanosoma cruzi*, aportando información epidemiológica confusa que interfiere en el diagnóstico específico y el tratamiento (Bastrenta et al., 2003; Maalej et al., 2003).

La técnica ELISA usando antígeno crudo colombiano, ha demostrado en trabajos recientes valores de sensibilidad y especificidad bajos del 51,5% y 57,5%, respectivamente (Vargas, 2005); de otra parte, identificó el 37,55% de animales evaluados como seropositivos cuando se procesaron sueros provenientes de zona no endémica para la Leishmaniasis Visceral; aspectos que favorecen la aparición de animales tanto falsos negativos, como falsos positivos, descrito por Bastrenta et al. (2003) y Maalej et al. (2003). Así mismo, se ha descrito que ELISA es una prueba sensible para diagnosticar la infección en caninos infectados, pero es menos sensible para los caninos en el período de latencia de la enfermedad (Courtenay et al., 2002).

Western Blot (WB)

La prueba de inmunoblot ha sido propuesta para el estudio de LVC en trabajos experimentales y de campo, porque las fracciones antigénicas obtenidas con esta prueba, permitirían detectar animales infectados y discriminar las fases iniciales de la infección (Riera et al., 1999; De Paula et al., 2003). 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 con *L. infantum* y aún no existe consenso en cuanto al patrón de reconocimiento antigénico requerido para obtener valores altos de sensibilidad y especificidad (Aisa et al., 1998; De Paula et al., 2003). Se han descrito como desventajas del WB: que es una técnica que requiere de experiencia para su desarrollo y que está limitada a investigaciones de laboratorio, no siendo aplicable como rutina de diagnóstico (Ferroglia et al., 2007).

Se han sugerido patrones de reconocimiento antigénico obtenidos por WB, relacionados con antígenos de bajo peso molecular, descritos como muy sensibles en el diagnóstico de los casos asintomáticos de LVC, reportando que aparecen mucho antes que los títulos de seropositividad establecidos por las pruebas de IFI y ELISA. Posiblemente estas mismas bandas, permitirían evaluar la evolución del tratamiento de la enfermedad, porque desaparecen cuando el tratamiento es efectivo o cuando se presenta mejora del estado clínico del canino (Riera et al., 1999).

Usando animales provenientes de zonas endémicas de LVC en España, se estableció que los caninos con la infección natural, presentan anticuerpos que revelan entre 3 y 33 fragmentos de polipéptidos del antígeno de *Leishmania* con una masa molecular que se encuentra en el rango entre 12 y 85 kDa. Las bandas de mayor sensibilidad fueron la 70, 65, 46, 30, 28, 14 y 12 kDa. Los autores consideran que en la prueba de WB, un resultado se toma como positivo, cuando una de las bandas de 46, 30, 28, 14 y 12 kDa está presente. La identificación de las bandas de fracciones antigénicas de 12 y 14 kDa en caninos, pueden ser usadas para detectar fases tempranas de la enfermedad, permitiendo realizar el seguimiento y la evaluación de la resolución de la enfermedad (Aisa et al., 1998). Similares resultados se han observado en Colombia, donde recientemente fue estandarizada (Vargas, 2005), sugiriéndose que proteínas con pesos moleculares de 14 y 29 kDa podrían ser potencialmente diagnósticas y permitirían desarrollar un antígeno recombinante con una alta especificidad, para

discriminar caninos infectados y no infectados localizados en las zonas endémicas (Vargas, 2005; Romero, 2006).

Métodos moleculares

El uso conjunto de la Reacción de la Cadena de la Polimerasa (PCR) y las pruebas serológicas pueden ayudar a determinar la extensión de la infecciones subclínicas y permiten estimar el número de caninos objeto del programa de control (Reithinger et al., 1999). Mientras que el diagnóstico por PCR para la LV en humanos puede ser considerado como eficiente, el diagnóstico de la enfermedad en caninos, sigue presentando inconvenientes, debido por ejemplo, al desconocimiento del tejido que ofrezca más información para ser muestreado, las dificultades encontradas en la preparación del DNA o la alta frecuencia de inhibidores del PCR en presencia de la sangre canina (Lachaud et al., 2001).

El uso del PCR para la identificación de DNA de *Leishmania sp.* en muestras de tejidos de perros es desarrollado usando primers para amplificar la secuencia del gen de la subunidad pequeña rRNA de *Leishmania* y la región constante del DNA del kinetoplasto (Travi, et al., 1998; Solano-Gallego et al., 2001), siendo esta última, la más sensible para la detección de *Leishmania* en caninos asintomáticos (Solano-Gallego et al., 2001; Lachaud et al., 2001).

Muchos tejidos han sido estudiados: nódulos linfáticos, aspirados de médula ósea, sangre completa, biopsias de piel embebidas en parafina, piel congelada, conjuntiva del ojo, con resultados variados. El PCR basado en médula ósea, nódulos linfáticos y muestras de piel, han sido las muestras diagnósticas con mayor sensibilidad y especificidad para el diagnóstico de la LVC; sin embargo, se recomienda el uso de sangre periférica, porque su obtención requiere de técnicas poco invasivas, produciendo bajo estrés en los animales, facilita su reproducibilidad, su efectividad ha sido demostrada en PCR en humanos y en caninos se ha demostrado la circulación del parásito en sangre periférica; han

demostrado ser técnicas más sensibles que otros métodos parasitológicos como citologías teñidas o el cultivo del parásito (Lachaud et al, 2001); aunque otros autores indican, que el uso de médula ósea como muestra para el desarrollo de PCR no es apropiada, por los bajos valores de sensibilidad obtenidos (Solano-Gallego et al., 2001). El PCR combinado con sondas específicas de DNA pueden ser herramientas sensibles, en comparación con el aislamiento y la caracterización de parásitos, por la demostración de que las cepas infectantes de humanos y caninos son las mismas (Reithinger & Davies, 1999).

Perspectivas de investigación

La selección de la “prueba de oro” para el diagnóstico de la LVC continúa sin resolverse, más aún, cuando investigadores han indicado que la proporción de portadores asintomáticos de *Leishmania* en la población canina, puede ser mayor a la previamente descrita. La evolución de estos portadores asintomáticos dentro de la categoría de animales “resistentes” o “clínicamente enfermos”, es muy importante, por su rol en el mantenimiento de la endemidad de la enfermedad. Por tal motivo se hace necesario desarrollar nuevas pruebas diagnósticas, rápidas, de bajo costo y aplicables a nivel de campo.

Las pruebas serológicas convencionales IFI y ELISA que detectan anticuerpos IgG, son sensibles y específicas, pero no están adaptadas a las condiciones de campo y en trabajos en Colombia han demostrado bajos valores de correlación entre sus resultados. Es importante recordar que en estudios epidemiológicos se deben preferir las pruebas con alta sensibilidad, para disminuir la tasa de falsos negativos. Una alta sensibilidad evitaría que los animales positivos permanezcan como fuentes de infección para los vectores; mientras que la especificidad se requiere para la confirmación clínica de los caninos sospechosos.

Las fracciones antigénicas de 14, 29, 32 y 57 kDa identificadas en los estudios de WB en Colombia son promisorias para el desarrollo de pruebas diagnósticas más sensibles y específicas para ser usadas en trabajos de campo en zonas endémicas y no endémicas, mediante la obtención de epitopes específicos de las cepas del parásito circulantes en Colombia.

El uso de pruebas rápidas de serodiagnóstico con membranas de nitrocelulosa impregnadas con antígenos recombinantes como el rK39, han mostrado altos valores de sensibilidad y especificidad (entre el 95 y 100%) en Europa, siendo necesario evaluar su utilidad bajo diferentes condiciones epidemiológicas en Colombia o mediante el uso de antígenos específicos de cepas de *Leishmania infantum* circulantes en el país.

La PCR ha sido valiosa para evaluar el nivel parasitario y el seguimiento del tratamiento, éste último en aquellos países donde el tratamiento de los caninos es posible. Para el procesamiento de muestras caninas se requiere la identificación de tejidos más sensibles, la estandarización de la técnica y probablemente por los requerimientos de infraestructura para su desarrollo, se presenta como una herramienta para la investigación de laboratorio o en su defecto para hacerla disponible comercialmente.

Se hace necesario además, evaluar la aplicabilidad de las nuevas técnicas diagnósticas a las condiciones de campo propias de cada área afectada. De otra parte, se requieren pruebas rápidas que puedan incrementar la capacidad de diagnóstico de los médicos veterinarios involucrados en los trabajos de campo. El diagnóstico de caninos asintomáticos puede disminuir significativamente el promedio de duración de su capacidad infectante y reducir el riesgo de transmisión de los parásitos a otros caninos, permitiendo un mejor control de la infección en los perros e indirectamente en el hombre.

Referencias bibliográficas

- Abdeen, Z.A.; Sawalha, S.; Eisenberger, C. et al. Epidemiology of Visceral Leishmaniasis in the Jenin District, West Bank: 1989-1998. **The American Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.66, n.4, p.329-333, 2002.
- Aisa, J., Castellejo, S., Gallego, M. et al. Diagnostic potencial of western blot analysis of sera from dogs with Leishmaniasis in endemic areas and significance of the pattern, **Am. Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.58, n.2, p.154-159, 1998.
- Alexandre, W & Dias, P. Reflexões sobre a qualidade do diagnóstico da leishmaniose visceral canina em inquéritos epidemiológicos: o caso da epidemia de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, 1993-1997. **Cad Saude Publica**, n.20, p.259-265, 2004.
- Alves, W.A.; Bevilacqua, P.D. Quality of diagnosis of canine visceral Leishmaniasis in epidemiological surveys: an epidemic in Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, 1993-1997, **Cad. Saude Pública**, v.20 n.1, p.259-265, 2004.
- Bastrenta, B, Mita, N., Buitrago, R. et al. Human mixed infections of *Leishmania spp.* and *Leishmania-Trypanosoma cruzi* in a Sub Andean Bolivian Area: identification by Polymerasa Chain Reaction/Hybridization and Isoenzyme. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.98, n.2, p.255-264, 2003.
- Bernardina, W.E.; De Luna, R.; Oliva, G. et al. An immunodifusion assay for the detection of canine leishmaniosis due to infection with *Leishmania infantum*. **Veterinary Parasitology**, n.73, p.207-213, 1997.
- Binhazim A.; Chpman Jr.; Shin S. et al. Determination of virulence and pathogenesis of canine strain of *Leishmania leishmania infantum* in hamsters and dogs. **American Journal of Veterinary Research**, v.54, p.113-120, 1993
- Braz, R.; Nascimento, E.; Martins D. et al. The sensitivity and specificity of *Leishmania chagasi* recombinant k39 antigen in the diagnosis of American Visceral Leishmaniasis and in differentiating active from subclinical infection. **The American Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.67, n.4, p.344-348, 2002.
- Cabrera, M.A.; Paula, A.; Camacho, L.A., et al. Canine Visceral Leishmaniasis in Barra de Guaratiba, Rio de Janeiro, Brazil: Assesment of risk factors. **Rev. Institute Medicine Tropical Sao Paulo**, v.45, n.2, n.79-83, 2003.
- Ciaramella, P; Oliva, G.; De Luna R. et al. A retrospective clinical study of canine leishmaniosis in 150 dogs naturally infeced by *Leishmania infantum*. **Veterinary record**, v.141, p.539-543, 1997.
- Courtenay, O. ; Rupert, J. ; Quinnell, L. et al. Infectiousness in a Cohort of Brazilian dogs: Why culling fails to control visceral leishmaniasis in areas of high transmission. **The Journal of Infectious diseases**, n.186, p.1314-20, 2002.
- De Paula, A.; Da Silva, A.; Fernades, O. et al. The use of immunoblot analysis in the diagnosis of canine visceral leishmaniasis in an endemic área of Rio de Janeiro. **Journal of Parasitology**, n.89, p.832-836, 2003.
- Do Rosário, E.; Generao, O.; Franca-Silva, M. et al. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay using crude *Leishmania* and recombinant antigens as a diagnostic marker for canine visceral leishmaniasis. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.100, n.2, p.197-203, 2005.
- Fernández J.; Charry T.; Bello F. et al. Prevalencia de Leishmaniosis Visceral canina en municipios de Huila Colombia. **Rev. Salud pública**, v.4, n.3, p.278-285, 2002.
- Fernández-Pérez F.J.; Méndez S.; De La Fuente C. et al. Short report: Improved diagnosis and follow-up of canine Leishmaniasis using amastigote-based indirect immunofluorescence. **The American Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.61, n.4, p.652-653, 1999.
- Ferroglio, F.; Centaro E.; Mignone, W. et al. Evaluation o fan ELISA rapad device for the serological diagnosis of *Leishmania infantum* infection in dog as compared with immunofluorescence assay and Western blot. **Veterinary Parasitology**, v.144, p.162-166, 2007.
- Gradoni, L. The diagnosis of canine Leishmaniasis. In: From canine Leishmaniasis; an update. Proceedings of a canine Leishmaniasis. Forum, 2002.
- Guhl, S. & Nicholls, S. **Manual de procedimientos para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas**. 1. ed. Bogotá, Colombia: Organización Mundial de la Salud, Ministerio de Salud de Colombia, Instituto Nacional de Salud y Universidad de los Andes. 2001. 98p.
- Iniesta, L.; Fernández-Barredo S.; Bulle B. et al. Diagnostic techniques to detect Cryptic Leishmaniasis in dogs. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v.9, n.5, p.1137-1141, 2002.
- Lachaud L.; Marchergui-Hammami S.; Chabbert E. et al. Comparison of six PCR methods using peripheral blood for detection of Canine Visceral Leishmaniasis. **Journal of Clinical Microbiology**, v.40, n.1, p. 210-215, 2001.
- Lauricella, M.A.; Castanera, M.B.; Gürtler, R.E. et al. Immunodiagnosis of *Trypanosoma cruzi* (Chagas Disease) Infection in Naturally Infected Dogs. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.93, n.4, p.501-507, 1998.
- Maalej, I.; Chenik, M.; Louzir, H. et al. Comparative evaluation of ELISAS based on ten recombinant or purified *Leishmania* antigens for the serodiagnosis of mediterranean visceral leishmaniasis. **The American Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.68, n.3, p.312-330, 2003.
- Marzochi, M.C.; Marzochi, K.B.F. Tegumentary and Visceral Leishmaniasis in Brazil-Emerging Anthroozoonosis and Possibilities for their control.

- Cad. Saude Pública**, v.10, p.359-375, 1994 (Suppl. 2).
- Mettler, M.; Grimm, F.; Capelli G. et al. 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. **Journal of clinical microbiology**, v.43, n.11, p.5515-5518, 2005.
- Miles, M.A.; Vexenat, J.A. Canine Leishmaniasis in Latin America: control strategies for visceral leishmaniasis. In: Forum Barcelona. Memorias..., Intervet, p.46-53,1999.
- Moreira, M.A.B.; Luvizotto, M.C.R.; Garcia J.F. et al. Comparison of parasitological, immunological and molecular methods for the diagnosis of Leishmaniasis in dogs with different clinical signs. **Veterinary parasitology**, v.145, p.245-252, 2007.
- Palatnik-De-Sousa, C.B.; Wania R., Franca-Silva et al. Impact of canine control on the epidemiology of canine and human visceral Leishmaniasis in Brazil. **The American Society of Tropical Medicine and Higiene**, v.65, n.5, p.510-517, 2001.
- Pinelli, E.; Killick-Kendrick R.; Wagenaar J. et al. Cellular and Humoral immune responses in dogs experimentally and naturally infected with *Leishmania infantum*. **Infection and immunity**, Jan, p.229-235, 1994.
- Reithinger, R. & Davies, C. Is the domestic dog (canis familiaris) a reservoir host of American cutaneous Leishmaniasis? A critical review of the current evidence. **The American Society of Tropical Medicine and Higiene**, v.61, n.4, p.530-541, 1999.
- Riera, C.; Valladares, JE; Gallego, M. et al. Serological and parasitological follow-up in dogs experimentally infected with *Leishmania infantum* and treated with meglumine antimoniate. **Veterinary Parasitology**, v.84, p.33-47, 1999.
- Romero, M.H. **Comparación de pruebas serológicas para el diagnóstico de la Leishmaniasis visceral canina en sueros procedentes de municipios endémicos del departamento del Tolima**. Ibagué, Colombia: Universidad del Tolima, 2006. 85p. Tesis. (Maestría en Ciencias Biológicas).
- Savani, E.; Schimonsky B.V; Camargo, O.M.C. et al. Surveillance of American visceral Leishmaniasis in dogs from a non-endemic area, Brazil. **Revista Saude Pública**, v. 37, n. 2, p.260-262, 2003.
- Solano-Gallego, L.; Morell, P.; Arboix, M. et al. Prevalence of *Leishmania infantum* infection in dogs living in an area of canine Leishmaniasis endemicity using PCR on several tissues and serology. **Journal of Clinical Microbiology**, Feb, p.560-563, 2001.
- Travi, B. Un enfoque integral al estudio de animales reservorios, con énfasis en las Leishmaniosis del Nuevo mundo. **MEDICAS UIS**, 12:p.311-315, 1998.
- Travi, B.; Tabares, C.; Cadena, H. et al. Canine Visceral Leishmaniasis in Colombia: relationship between clinical and parasitologic status and infectivity for sand flies. **The American Society of Tropical Medicine and Hygiene**, 643,4:119-124, 2001.
- Vargas, J.J. 2005. **Inmunodiagnóstico de la leishmaniosis visceral zoonótica en caninos infectados con *Leishmania (leishmania) chagasi***. Bogotá, Colombia: Universidad Nacional de Colombia, 2005. 97p. Tesis. (Maestría en Microbiología).
- Vega, J.C.; López, M.C.; Vargas, J.J. et al. **Estandarización de la prueba de ELISA para el inmunodiagnóstico de la Leishmaiosis visceral canina**. In: Agudelo C. eds. I Encuentro de Investigadores en Salud Pública de la Universidad Nacional de Colombia. Bogotá: Instituto de Salud Pública, p.80-90,2003.
- Vercammen, F., Fernández-Pérez F.J.; Amo C. et al. Follow-up of *Leishmania infantum* naturally infected dogs treated with allopurinol: immunofluorescence antibody test, ELISA and Western blot. **Acta Tropica**, n.84, p.175-181, 2002.