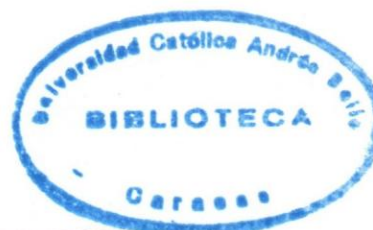


TESIS
ED 2000
R7

UNIVERSIDAD CATÓLICA ANDRÉS BELLO
FACULTAD DE HUMANIDADES Y EDUCACIÓN
ESCUELA DE EDUCACIÓN
ESPECIALIDAD CIENCIAS BIOLÓGICAS



ESTUDIO COMPARATIVO DE LA PROTEÍNA K39 FRENTE
A PROMASTIGOTES MUERTOS DE *L. donovani* EN LA
DETECCIÓN DE LA LEISHMANIASIS VISCERAL EN PERROS
Y HUMANOS

Trabajo Especial de Grado para optar al título de
Licenciado en Educación, Mención Ciencias Biológicas



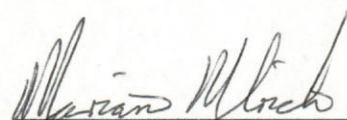
Autor: Ignacio A. Ribon A.
Tutor: Dra. Marian Ulrich

Caracas, Octubre de 2000

APROBACIÓN DEL TUTOR

En mi carácter de tutor del Trabajo Especial de Grado titulado: "**Estudio comparativo de la proteína K39 frente a Promastigotes muertos de *L. donovani* en la detección de la Leishmaniasis Visceral en Perros y Humanos**", realizado por Ignacio Andrés Ribon Alvarez, para optar al título de Licenciado en Educación, Mención Ciencias Biológicas, considero que dicho trabajo reúne los requisitos y méritos suficientes para ser sometido a su defensa oral y evaluación por parte del Jurado examinador designado.

En Caracas, a los diez del mes de Octubre de 2000


Dra. Marian Ulrich

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar a Dios, por darme la fuerza y voluntad para cumplir mis objetivos.

Mis padres por apoyarme y creer en mí en todo momento.

A mi tutor la Dra. Marian Ulrich por enseñarme y guiarme en el desarrollo del siguiente trabajo.

A Vestalia, Martha, Migdalia y todo el personal que trabaja en el Instituto de Biomedicina del Hospital Vargas por su asesoría y ayuda incondicional.

A mis tíos Ramón, Gisela, Okarina, Tarcisio y primos, que me brindaron todo su apoyo y ayuda.

A mis amigas y compañeras de clase: Norka, Claudiexi, Alexandra, Taimy, Nairobi, Edelmira y Eva; que estuvieron conmigo en todo momento.

DEDICATORIA

A mi familia en especial a mis padres, Esther y Hernando.

UNIVERSIDAD CATÓLICA ANDRÉS BELLO
FACULTAD DE HUMANIDADES Y EDUCACIÓN
ESCUELA DE EDUCACIÓN

**Estudio comparativo de la proteína K39 frente a Promastigotes
muertos de *L. donovani* en la detección de Leishmaniasis
Visceral en Cánidos y Humanos**

RESUMEN

La leishmaniasis visceral (LV) es una enfermedad producida por el parásito protozoario intracelular de la especie *Leishmania chagasi*. Los reservorios del parásito incluyen el perro doméstico, el zorro común y los marsupiales (el rabipelado). Es una enfermedad grave que, en Venezuela, afecta principalmente a los niños. Los signos clínicos fundamentales son fiebre, anemia, hepatoesplenomegalia (inflamación del hígado y del bazo) y enflaquecimiento progresivo. De mal pronóstico para pacientes no tratados, esta enfermedad puede ser fatal en un 75% a 85% de los casos en niños y en 90% a 95% de los adultos. La especie vectora clásicamente involucrada como responsable de la transmisión de LV en el continente americano ha sido *Lutzomyia longipalpis*. Su distribución geográfica en Venezuela abarca 15 estados agrupados principalmente en 3 focos: un central con los estados Aragua, Carabobo, Cojedes, Guárico y Yaracuy; un occidental que incluye Falcón, Lara, Portuguesa, Trujillo y Zulia y un foco oriental constituido por los estados Nueva Esparta, Sucre, Anzoátegui y Monagas. Uno de los focos poco

estudiados es la Isla de Margarita. En los últimos 9 años, se han diagnosticado 54 casos en Margarita, con un promedio de 9 casos por año en los últimos años y dos muertes en 1998. El control de la enfermedad es de enorme importancia debido a su impacto sobre la población de la isla y, a largo plazo, un posible impacto sobre el turismo. En estudios preliminares, en comunidades de la Isla de Margarita donde se han diagnosticado pacientes humanos, se ha determinado que más de un 25% de los perros domésticos están infectados. Hasta el momento una de las pocas medidas de control de la enfermedad es la detección y eliminación de los animales infectados. Esta medida de control no es aceptada fácilmente por la población; por lo tanto es necesario contar con un método de diagnóstico muy confiable, altamente sensible y específico. El procedimiento utilizado para mejorar los métodos de diagnóstico, en personas que presentan estas patologías, consiste en identificar los antígenos dominantes que pueden inducir el desarrollo de anticuerpos específicos detectables por exámenes serológicos. Actualmente el más recomendable es un antígeno específico potente llamado K39, originalmente clonado de un aislado de *L. chagasi*. En esta investigación, hemos estudiado algunos aspectos de la leishmaniasis visceral en Margarita, tanto en la población humana como en los caninos que representan la fuente más importante de la infección.

INDICE GENERAL

	Pag.
APROBACIÓN DEL TUTOR	II
AGRADECIMIENTOS	III
DEDICATORIA	IV
RESUMEN	V
INDICE GENERAL	VII
INDICE IMÁGENES, GRÁFICOS Y TABLAS	IX
INTRODUCCIÓN	
1. LEISHMANIASIS VISCERAL HUMANA	1
1.1 Reseña Histórica	1
1.2 Descripción de la Enfermedad	9
1.3 Taxonomía	10
1.4 Tipos Epidemiológicos de LV	13
1.5 Desarrollo de la Enfermedad	14
1.6 Manifestaciones Clínicas	17
1.7 Período de Incubación	18
1.8 Diagnóstico de la Enfermedad	20
1.9 Tratamiento de la Enfermedad	22
1.10 Antecedentes de LV en Venezuela	23
2. LEISHMANIASIS VISCERAL CANINA	
2.1 Descripción General	25
2.2 Descripción Clínica	26
2.3 Pruebas Diagnósticas	28
2.4 Tratamiento de la Enfermedad	29
3. VECTOR DE LA ENFERMEDAD	
3.1 Generalidades	31

3.2	Proceso de Infección (ciclo de vida)	34
	OBJETIVOS	36
	Objetivo General	36
	Objetivos Específicos	36
	MATERIALES y METODOS	
1.	Grupos de Estudio	
1.1	Sueros Humanos	37
1.2	Sueros Caninos	37
2.	Material para la prueba de ELISA	38
3.	Método	39
4.	Análisis de Resultados	41
	RESULTADOS y DISCUSIÓN	43
	CONCLUSIONES	49
	RECOMENDACIONES	51
	BIBLIOGRAFÍA	52
	ANEXO	76

INDICE IMÁGENES, GRÁFICOS Y TABLAS**IMÁGENES**

Taxonomía de las Leishmanias	12
Distribución Geográfica de la LV	15
<i>Lutzomyia longipalpis</i> . Sand Fly	33
Ciclo de Vida	35

TABLAS

Nº 1 Reactividad serológica de sueros caninos de Margarita con los antígenos DD8 y K39.	61
Nº 2 Resultados de las pruebas de ELISA con los Sueros caninos.	63
Nº 3 Reactividad serológica frente a los antígenos DD8 y K39 en sueros caninos del grupo Control (Caracas).	64
Nº4 Porcentajes de los sueros caninos positivos de Nueva Esparta frente a los Ag DD8 y K39.	65
Nº5 Reactividad serológica frente a los antígenos DD8 y K39 en pacientes con diagnóstico clínico de LV.	66
Nº 6 Reactividad serológica frente a los antígenos DD8 y K39 en personas sanas de un área no-endémica (Instituto de Biomedicina)	67

Nº 7	Reactividad serológica frente a los antígenos DD8 y K39 en personas sanas de áreas endémicas de LV en Margarita.	68
Nº 8	Resultados positivos en los grupos de pacientes, controles y personas sanas en áreas endémicas de Nueva Esparta.	70
Nº9	Porcentajes de pruebas positivas en humanos Contactos frente a Ag DD8 y K39.	71
Nº10	Promedio y Desviación Estándar de la reactividad De sueros caninos frente a los antígenos DD8 y K39.	72
Nº11	Promedio y Desviación Estándar de la reactividad de sueros control frente a los Ag DD8 y K39.	73

GRÁFICOS

Nº 1	Promedios de la reactividad de sueros caninos frente a los antígenos DD8 y K39.	74
Nº2	Promedios de la reactividad de sueros humanos Con LV y sueros control frente a los antígenos DD8 y K39.	75

INTRODUCCIÓN

1. LEISHMANIASIS VISCERAL HUMANA

1.1 Reseña Histórica

La historia de la Leishmaniasis se remonta desde algunos miles de años, encontrándose citas de epidemias provocadas por esta enfermedad en la Biblia y numerosos manuscritos orientales.

El conocimiento más remoto de la Leishmaniasis Visceral del Mediterráneo probablemente data de las observaciones de Roser, quien en 1835 enfocó la atención en una afección llamada "ponos", o agrandamiento doloroso del bazo que ocurría en niños pequeños, en la Isla de Spezia, localizada en la Costa del Peloponeso. Poco tiempo después, Pallas descubrió que la afección también era endémica en la Isla de Hydra. Posteriormente, Karamitsas y Stephanos, 1880 y 1881 respectivamente, describieron la sintomatología clínica en Grecia. En 1976, el médico italiano Tommaso Cigliano publicó un libro titulado "Leucemia Lienal del Mambini Curata Omiopáticamente"; allí describen la sintomatología de la enfermedad en 40 casos, el primero de los cuales fue observado en 1867, y según el autor, la enfermedad era conocida en Italia desde tiempos remotos con el nombre de

“tacone” (suela de zapato endurecida) por la forma y la consistencia dura del bazo.

El descubrimiento y la descripción de los parásitos responsables dieron inicio con las observaciones efectuadas por Clark en la India. Este Miembro de la Comisión Sanitaria de la India, llamó la atención del público al dar cuenta en 1882 de 100 casos descritos como una forma severa de Caquexia Malárica, que devastaba ciertas áreas geográficas al pie de las Colinas Garo en Assam. Esta región está situada al noreste de la India, cerca de la China; los Garos llamaban a la infección “Kala-Azar” que significa “fiebre negra” y aparentemente la conocían desde 1869. Se sabe que causó en esa época gran mortalidad de dicha población y se llegaron a extremos tales como quemar a los enfermos en sus cabañas después de intoxicarlos. La epidemia avanzó lentamente hacia los distritos de Kamrup y Nowgong donde llegó a matar hasta el 31,5% de la población de este último distrito. Este foco epidémico es uno de los más antiguos que se conoce. Napier reportó que los mayores índices de mortalidad se observaron en la región desde 1890 a 1900, y que se trataba de un área virgen, a diferencia de Bengala del sur, donde la infección era epidémica desde hacía muchos años.

En relación con la etiología de la afección Hindú, llamada Kala-Azar o fiebre de Dum-Dum, inicialmente se pensó que se trataba de una forma aguda

de Paludismo. En 1897, Giles fue designado para investigar la causa; habiendo encontrado huevos de uncinaria en la mayoría de los casos, concluyó que la enfermedad no era "ni más ni menos que una Anquilostomiasis". Leonard Rogers, en 1896, después de estudiar Kala-Azar, concluyó que se trataba de Paludismo grave, esta teoría era refutada por Sir Patrick Manson, quien en base a la ausencia de parásitos de Plasmodium, la ineficacia de la quinina y la falta de periodicidad en la fiebre consideró en 1903, que podría tratarse de una Tripanosomiasis. Sir Ronald Ross creyó también desde 1899, que se trataba de Malaria, sin embargo, sospechó que se encontraba asociado a algún otro tipo de infección. En 1902, Bentley estudió la infección y basándose en las reacciones de aglutinación observadas, concluyó erróneamente que se trataba de una forma maligna de fiebre de malta.

El 30 de Mayo de 1903, Sir William Leishman reportó el hallazgo de ciertos "cuerpos ovals pequeños", en frotis coloreados del bazo de un soldado muerto en Netley; en el Hospital Militar de Londres en 1900 el paciente había contraído una fiebre en Dum-Dum, India (cerca de Calcuta). El Mayor Leishman había observado estos microorganismos intracelulares dos años y medio antes de su publicación, pero no los reportó en 1900, por no estar seguro de su identidad, sin embargo, en 1903 después de examinar una rata infectada por Tripanosomiasis, llegó a la conclusión que existía similitud entre los parásitos en el bazo humano y los observados en la rata.

En julio de ese mismo año histórico de 1903, (2 meses después del reporte de Leishman), Donovan reportó en Madras, India, el hallazgo de un parásito similar en preparaciones hechas de material obtenido por punción esplénica tomada de tres pacientes vivos con fiebre de Dum-Dum.

Probablemente Laveran y Mesnil examinaron los frotis de Donovan y aparentemente, debido al hecho que algunos parásitos parecían estar asociados o adheridos a eritrocitos, los clasificaron como un Piroplasma y propusieron el nombre *Piroplasma donovani*. Sin embargo, ambos abandonaron esta teoría a raíz de estudios posteriores.

El 14 y 28 de noviembre de 1903 Sir Ronald, Oficial del Servicio Médico de la India, clasificó el nuevo parásito como Esporozoario y sugirió el nombre del género: *Leishmania* en honor a Sir William Leishman, el primero en observarlo de material clínico humano. De esta manera, el nombre científico aceptado fue *Leishmania donovani*. En 1904, Rogers fue el primero en demostrar la naturaleza flagelada del parásito al lograr el cultivo de promastigotes. Obtuvo material por punción esplénica que colocó en 1 ml. de solución salina estéril y 5 – 10% de citrato de sodio; incubó a 20° - 22°C (no arriba de 25°C) y después de tres días de incubación pudo observar la multiplicación de los promastigotes. Hizo énfasis en el hecho de que los cultivos no crecían en presencia de bacterias. Poco más tarde en 1907, Patton

comprobó la presencia de amastigotes en sangre periférica y describió el hecho fundamental de encontrar formas flageladas en el intestino de insectos alimentados con la sangre e pacientes con Kala-Azar. Cathoire (1904), Pianese (1905) y Nicolle (1908), encontraron un parásito idéntico en niños del Mediterráneo que sufrían la llamada "Anemia Esplénica Infantil". En 1908, Nicolle y Comte encontraron el parásito en perros de Túnez. (TORRES, 1991; KASSIRKI, 1991)

La historia del descubrimiento de la etiología de la Leishmaniasis cutánea también se remonta al año histórico de 1903. En ese año, Wright estudió en Boston el caso de un niño de Armenia que sufría de una úlcera tropical; encontró corpúsculos intracelulares que guardaban mucha semejanza con los encontrados por Leishman y Donovan. Este microorganismo había sido observado por Firth en 1891. Wright propuso el nombre de *Helcosoma Tripicum* y sugirió que se trataba de un protozooario relacionado con los microsporidios.

Marzinowsky y Bogrow encontraron en Rusia en 1904 un organismo similar en una úlcera de la piel de un niño que había vivido en Persia. Propusieron el nombre de *Ovoplasma orientale* para el agente del "Botón de Oriente". Posteriormente varios investigadores demostraron que los organismos de Wright y Marzinowsky eran morfológicamente indistinguibles del agente del Kala-Azar por lo que los incluyeron en el mismo género, de manera

que el nombre aceptado para el agente del Botón o úlcera oriental, fue *L. tropical* de la úlcera oriental. Esta observación demostró claramente la relación taxonómica entre el agente del Kala-Azar de la India, el Mediterráneo y el agente etiológico de la forma de Leishmaniasis Cutánea llamada botón de oriente, de manera que Nicolle dio el nombre de *L. infantum* al agente etiológico de Kala-Azar del Mediterráneo.

La primera referencia sobre una Leishmaniasis Visceral en América se debe a las observaciones efectuadas por el eminente brasileño Carlos Chagas, quién recorrió el Valle del Amazonas y sus afluentes en 1911 a 1912, él demostró la ausencia de hematozoarios en individuos con sintomatología de Kala-Azar en la región.

Posteriormente en 1913, un italiano de Padua de apellido Migone diagnosticó en Asunción, Paraguay, un caso de Leishmaniasis Visceral; en su artículo afirma que encontró un ejemplar de *Leishmania* en la sangre lo que condujo al examen de preparaciones de sangre sacada directamente del bazo e hígado. Señaló que en este último material es más frecuente el hallazgo de parásitos, demostrándolo con coloraciones de Giemsa y Azul Marino. Según la historia clínica, el paciente contrajo la infección en Matto Grosso, Brasil, y no en el Mediterráneo; fue llevado a la capital del Paraguay en el período final de la evolución de la infección. (Gómez, 1951).

Después de esta descripción, se encuentra la de Mazza y Cornejo Arias (1936), quienes encontraron por punción esplénica en dos niños de Salta, Argentina, en febrero de 1934, India, Vivoli y Vacarezza describen el estudio anatómico clínico de un caso de Kala-Azar en un adulto Yugoslavo. Algunos años después, la Leishmaniasis Visceral es diagnosticada en Venezuela (1941), en Guatemala (1949) y en México (1951)

Vianna en 1911, había sugerido el nombre de la especie *L. braziliensis*, para el parásito que él, Lindembreg, Splendore y otros científicos habían observado en lesiones cutáneas y naso-orales en Brasil. Años más tarde, E. Chagas y sus colegas en 1937, postularon el nombre de *L. chagasi* para clasificar el parásito obtenido por punción hepática de pacientes en Brasil.

En el mismo año Penna describe el primer caso autóctono de Kala-Azar en el Brasil, en una muestra tomada de hígado, en el Servicio de Vicerotomía.

En otros meses más, otras 40 muestras resultan positivas al examen anatomopatológico, dando un total de 41 casos. Estos hallazgos fueron confirmados por Evando Chagas y col. en 1936, en el Instituto Oswaldo Cruz, quienes lo que en esa época se creyó una nueva especie, la Leishmaniasis Chagásica. Luego aparecen descripciones de casos en Bolivia 1939, por Gotti, Boggimo y Prieto describen un caso diagnosticado por necropsia en un

prisionero Paraguayo del Norte de Bolivia, frontera con el Estado Amazonas. (GOMÉZ, 1951; BUSTAMANTE, 1948).

En Venezuela podemos considerar como una afección de reciente descripción porque ella permaneció por mucho tiempo confundida, con otras patologías que azotaban el territorio nacional, enmascarando cuadros que cursasen procesos de fiebre prolongada, visceromegalia, entre ellos el Paludismo que diezmo el Territorio Nacional. (RÓNDON, 1993).

En el año 1941, los Dres. Armiño Martínez Niochet y Adolfo R. Pons, presentaron un caso autóctono de Kala-Azar en nuestro país, de un hombre de 28 años soltero, de color trigueño, venezolano, nacido en Altagracia de Orituco, procedente de la población Las Mercedes, del Edo. Guárico, que inició su enfermedad caracterizada por accesos febriles tipo Palúdico. (MARTINEZ & PONS, 1941). El diagnóstico se logra por punción esplénica.

En 1942 Potenza y Andueza describen el segundo caso en una niña negra de diez años, natural de las Bombitas (Edo. Bolívar), luego aparecen una serie de publicaciones de Franco Palacios 1945, Misle Peña, Ron Pedrique, J. Henríquez 1946; en el año 1954 Pifano presenta un estudio general del Kala-Azar en Venezuela llamando la atención sobre los aspectos epidemiológicos de

la dolencia señalando la distribución en los diferentes Estados de la República. (GUANIPA y col., 1962; TORREALBA, 1964)

En el año 1970 J. W. Torrealba publica su magistral tesis titulada "Observaciones sobre Diagnóstico, Terapéutica y Evolución de la Leishmaniasis Visceral y Canina", donde reporta un gran total de 174 casos registrados en el país, hasta la fecha. (TORREALBA, 1970)

Es a partir de esa información que el Departamento de Dermatología Sanitaria se encargó del control y tratamiento de esta afección y se inician los trabajos en el oriente del país, por los Dres. García, Rassi. (GARCÍA & RASSI, 1971)

1.2 Descripción de la enfermedad

La Leishmaniasis Visceral (LV), es una enfermedad producida por el parásito protozoario intracelular del género *Leishmania chagasi*, según Carlos Chagas.

La Leishmaniasis Visceral se encuentra distribuida principalmente en las zonas tropicales y subtropicales, tanto del Nuevo Mundo como del Viejo Mundo;

su mayor concentración se encuentra en las áreas rurales. En América más del 90% de los casos han sido registrado en Brasil. (W., Mayrink, 1996).

La LV es una enfermedad grave, cuyos signos fundamentales son fiebre, anemia, hepatoesplenomegalia y enflaquecimiento progresivo. Entre signos secundarios pueden aparecer trastornos hemorrágicos, alteraciones digestivas, pulmonares y adenopatías. De mal pronóstico para pacientes no tratados, esta enfermedad puede ser fatal en 75% a 85% de los casos en niños y 90% en adultos. (Rey, L., 1973).

1.3 Taxonomía

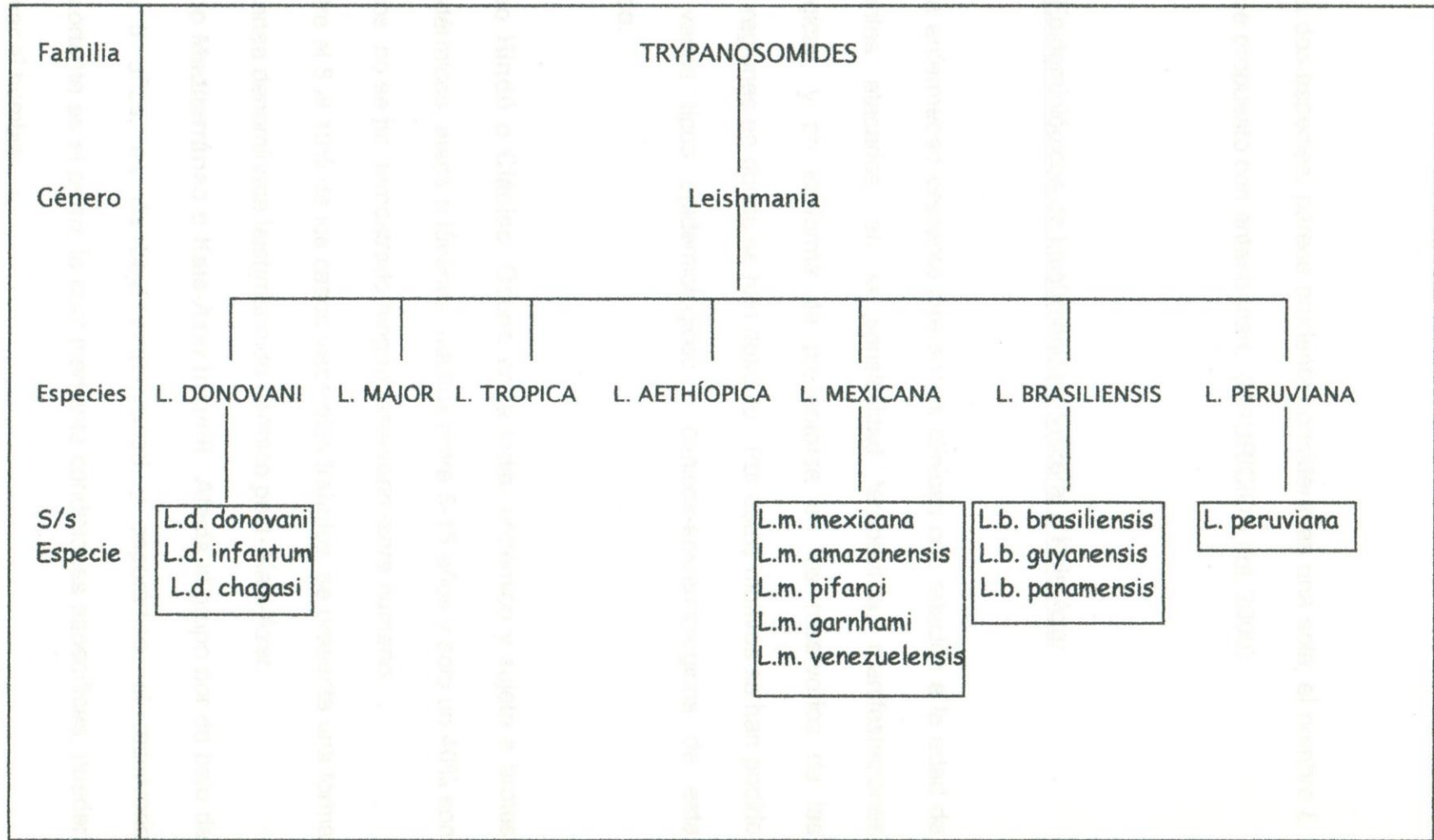
El problema de las especies de *Leishmania* que parasitan al hombre continua sin resolverse, han existido diferentes opiniones. Se considera que la primera descripción aceptable fue, las especies *Leishmania donovani*, *Leishmania tropica* y *Leishmania braziliensis*; se parte de este principio para poder estudiar las múltiples clasificaciones de estos parásitos. (RONDÓN, 1993).

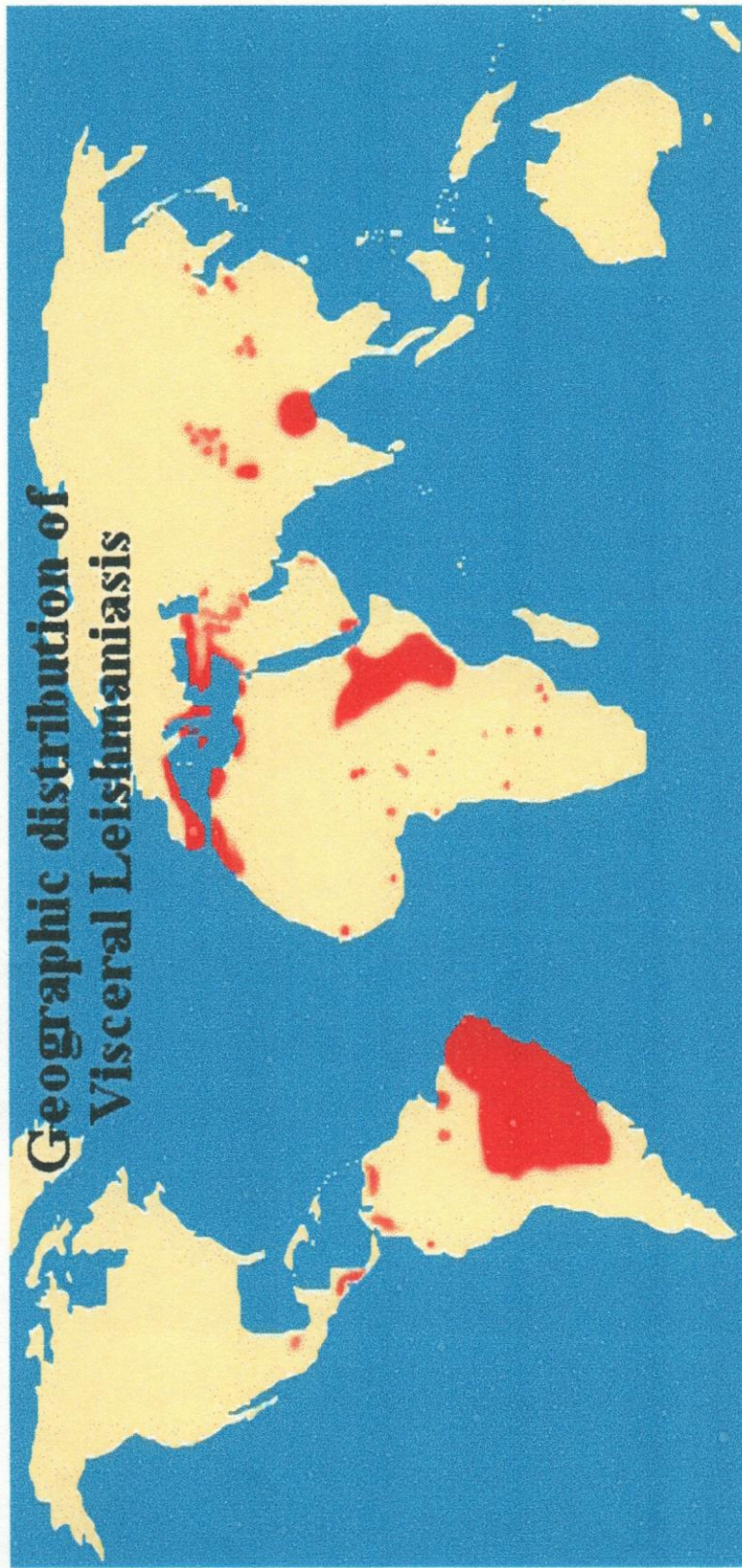
Se han descrito del agente causal de la Leishmaniasis Visceral cinco variedades:

- 1.- *Leishmania Donovanii* (Laveran y Mesnil 1903), Ross, 1903, agente etiológico del Kala-Azar tipo Hindú.
- 2.- *Leishmania Infantum* (Nicole 1908), agente causal del Kala-Azar tipo Mediterráneo.
- 3.- *L. Nilótico* Brumpt 1913, responsable por el Kala-Azar Sudanés.
- 4.- *Leishmania Donovanii Chagásica*. Cunha y Chagas 1913, productora del Kala-Azar de la región neotropical.
- 5.- Un tipo de *Leishmania* que produce el Kala-Azar, del sur de la Unión Soviética.

En la actualidad existe una polémica respecto a que si *L. infantum*, que está presente en el Viejo Mundo y *L. chagasi*, presente en América, es la misma especie. Los métodos enzimáticos y genéticos más modernos no permiten demostrar características únicas para aislados del Viejo Mundo y del Nuevo Mundo. La mayoría de los autores del Viejo Mundo considera que el parásito que causa la Leishmaniasis Visceral Americana llegó al Nuevo Mundo con los colonizadores hace unos 600 años; por lo tanto, es indistinguible de la *L. infantum* del mediterráneo. En contraste, algunos autores americanos sugieren que la *L. chagasi* es autóctona al Nuevo Mundo, con una historia en este continente de varios millones de años. Sin caracteres que permiten

TAXONOMÍA DE LAS LEISHMANIAS





Con relación a esta patogénesis de la enfermedad, desde hace muchos años los investigadores se han preocupado por establecer la cronología de los acontecimientos en la afección del hombre por los parásitos del género *Leishmania*. Es así como para el Kala-Azar se han establecido tres estadios:

- **Primario:** Representado por pequeñas lesiones cutáneas descritas en Asia Central, éstas regresan espontáneamente y dejan manchas pigmentadas.
- **Secundario o de infección generalizada:** Admite varios métodos de diseminación de la infección, entre los cuales el sistema linfático puede jugar un papel importante. En este estadio los parásitos pueden ser detectados prácticamente en todos los tejidos.
- **Terciario:** La Leishmaniasis Dérmica post Kala-Azar, así como las localizaciones mucosas en la nasofaringe que pueden presentarse concomitantes a la infección visceral o también después del tratamiento específico. Esta modalidad no ha sido observada en Venezuela hasta los actuales momentos. (RONDÓN, 1995).

1.6 Manifestaciones Clínicas.

El cuadro clínico de la Leishmaniasis Visceral Americana en sus líneas generales se presenta con exteriorización muy uniforme, en todas las regiones en donde prevalece endémica o esporádicamente.

Las variaciones observadas en el curso de la enfermedad y sus modalidades clínicas dependen de varios factores, entre ellos:

- La mayor o menor rapidez que evoluciona la enfermedad en el individuo.
- La edad del paciente.
- Estado nutricional o el patrón de alimentación del mismo.
- Coexistencia de otras patologías particularmente infecciosas y parasitarias.
- Estado de inmunidad del individuo y la comunidad.
- Determinación de los fenómenos patológicos, integrantes de la propia infección: Ej.: manifestaciones hemorrágicas, fiebres, hepato-esplenomegalia, alteraciones hematológicas, que conforman las manifestaciones clínicas de la enfermedad. (NIEVES, 1978).

1.7 Período de Incubación

Este período es difícil de determinar, por la dificultad de precisar la fecha de inoculación, pocos casos se consiguen identificados por las lesiones primarias. El período de incubación varía de dos a cuatro meses para Napier, de dos semanas a cuatro meses para Giraud, de cuatro a seis meses para Manson-Bahr, se han registrado pacientes de 1 mes hasta 12 meses como período de incubación.

La iniciación del cuadro patológico se manifiesta con la aparición de un cuadro febril, según varios autores se han descritos hasta 12 variedades de fiebre, que semejan a otras patologías, pero las más clásicas son dos picos febriles uno de mañana y otro en la tarde, que se prolongan hasta la noche; con sudores profusos, la temperatura oscila entre 37°C, el enfermo puede adaptarse a ellas por tiempo prolongado.

El enfermo presenta pérdida de peso progresivo, palidez, desnutrición, caquexia, deficiencia de factores vitamínicos múltiples; al nivel de piel, es seca, descamativa, la piel en algunos focos se torna de color oscuro, hay caída de cabello, diarrea intensa, a veces alternada con cuadro disentérico, tos seca asociada a epistaxis, aparición de edemas al nivel de los miembros inferiores, no siendo excepción registro de anasarca, a medida que la enfermedad avanza

aparece cuadro de hemorragia (epistaxis, gingivorragia, petequias y lesiones purpúricas), derrame pleural, ascitis, circulación colateral.

Es común que el bazo crezca con ritmo semejante al útero gravídico, al primer mes rebasa el reborde costal, este bazo es blando y sensible a la palpación. Con la evolución de la enfermedad se transforma duro, algunas veces llega a la fosa iliaca.

El aumento del hígado es aproximadamente con el bazo, pero de menos tamaño. Por debajo del reborde costal y limita de 3 a 14 centímetros. También encontramos adenomegalia especialmente en la región axilar e inguinal.

De modo general hay tos que se acompaña de signos estertores acústicos que se pueden confundir con otras enfermedades pulmonares (bronquitis, neumonía, bronconeumonía) que complican y agravan el cuadro.

Aparato digestivo, con su cuadro diarreico se observa abdomen doloroso extendido, náuseas, vómitos, pérdida del apetito.

En el 40% de los pacientes de Brasil hay alteración urinaria, albuminuria, piuria, hematuria y cilindruria. De las manifestaciones endocrinas hay alteración menstrual y del desarrollo normal durante la pubertad. En el período final se

reacción, se utilizan unos iniciadores específicos para identificar y amplificar fragmentos específicos de ácido desoxiribonucleico del parásito.

La reacción de PCR es costosa y requiere experticia en su aplicación. Quizás en parte por estas desventajas, se utilizan procedimientos inmunológicos con más frecuencia en el diagnóstico de la leishmaniasis Visceral. Se dispone actualmente de un antígeno muy específico aislado de *L. chagasi* por Reed y col., el antígeno K39, que permite identificar todas las infecciones activas de LV, tanto en humanos como en animales; es independiente de la especie infectante. Este antígeno es un producto recombinante formado por 39 aminoácidos repetidos, se obtiene a partir de la proteína 230-kDa, la cual predomina en los tejidos de los amastigotes de *L. chagasi*. Normalmente se utiliza un inmunoensayo enzimático o reacción de ELISA para detectar la presencia de los anticuerpos contra este antígeno que permiten establecer el diagnóstico.

1.9 Tratamiento de la enfermedad.

Hasta la Primera Guerra Mundial las tasas de mortalidad eran alarmantes y apenas un pequeño porcentaje de casos (1% según JEMMA 1916) se curaban espontáneamente. El gran paso para el tratamiento de la Leishmaniasis Cutánea fue realizado por Gaspar Vianna quien en 1911 usó productos antimoniales en el tratamiento de esta afección, de estos resultados obtenidos en Brasil, Di Cristina Caronia (1915) experimenta en Leishmaniasis Visceral Infantil en Sicilia, este tratamiento modificó y redujo la totalidad del 86% a un 25% iniciándose la época de quimioterapia en Kala-Azar.

Partiendo de esta primicia la droga de elección en el tratamiento de Leishmania Visceral son los antimoniales pentavalentes. (DAVIDSON, 1993)

Meglumine antimoniate y sodio Stibogluconate. En Venezuela se utiliza el glucantime a razón de 15 a 30 mgs. Por kgs/peso por 12 -15 días, se descansan 10 a 15 días y se aplica una segunda serie.

Oros medicamentos utilizados son:

- ✓ Alopurinol a razón de 21 mg/Kg, por 30 días.
- ✓ Los antimicóticos, azoles y ketaconazol.

El primer caso reportado en la Isla de Margarita con LV fue en 1965 por VELASQUEZ *et al.* La detección de LV en humanos ha incrementado recientemente, de un promedio de 3.6 casos por año entre 1990 y 1994 a un promedio de 9 casos por año en los próximos 4 años. Se han reportado unos 54 casos en los últimos 9 años, un 85% ocurre en niños menores de 2 años de edad (datos clínicos no publicados, M. Benitez). Se le atribuye 2 muertes a la Leishmaniasis visceral las cuales fueron reportadas en 1998, pero no se encontró otros muertos en una revisión de historias clínicas de todos los pacientes con hepatoesplenomegalia en las últimas décadas. (O. Zerpa, 1999)

2. LEISHMANIASIS VISCERAL CANINA

2.1 Descripción General

La Leishmaniasis es una enfermedad de los seres humanos y los animales, producida por el parásito protozoo del género *Leishmania*. Los perros desarrollan usualmente la forma sistémica (visceral) de la infección, con una presentación clínica muy variable. La Leishmaniasis canina puede ser difícil de diagnosticar y frustrante para tratar. Se considera que los perros son el reservorio principal de la Leishmaniasis Visceral en humanos. (NOLI, 1999)

Los casos de Leishmaniasis canina diagnosticados en zonas no endémicas son usualmente en animales que han sido importados de las zonas endémicas o que han estado viviendo en ellas durante algún tiempo. Ocasionalmente se han descrito infecciones incluso después de unas cortas vacaciones. Sin embargo, ocasionalmente, se han descrito casos autóctonos en países en los que no hay flebotomos.(SLAPPENDEL, 1988). En estos casos los animales afectados nacieron en países no endémicos y nunca viajaron al extranjero, aunque han estado en contacto con animales infectados. Esto sugiere la existencia de un insecto vector alternativo, posiblemente una garrapata, o de otro ectoparásito. En un caso, un perro nacido en una zona no endémica de una perra afectada desarrolló la enfermedad, sugiriendo la

posibilidad de transmisión intrauterina. (DÍAZ *et al*, 1997). Ocasionalmente, la enfermedad se puede transmitir como resultado de una transfusión de sangre de animales afectados.

La infección no tiene predilección por edad, raza o sexo, aunque se cree que las razas miniatura están menos afectadas, ya que frecuentemente viven dentro de la casa. Además, en las zonas endémicas, rara vez se ve la enfermedad en animales muy jóvenes y muy viejos, debido al largo periodo de incubación (usualmente más de cuatro meses) y a la baja tasa de curación. Se debe aclarar que la transmisión directa de perros a humanos sin un insecto vector es probablemente imposible, aunque no se sabe si el contacto con lesiones mucosas abiertas está completamente desprovisto de riesgos. (NOLI, 1999).

2.2 Descripción Clínica.

Varios órganos pueden estar afectados, ya que se han encontrado parásitos en todas las partes del cuerpo excepto, probablemente, en el sistema nervioso central. Por esta razón, la Leishmaniasis puede tener características clínicas diferentes.

Los principales signos de presentación son: debilidad, disminución de la actividad física, enfermedad de la piel y pérdida de peso. Los perros parecen mucho más viejos de lo que son debido a una atrofia muscular prominente, particularmente de la cabeza. La anorexia está presente y está relacionada probablemente con la insuficiencia renal. La debilidad y la disminución de la actividad física pueden ser consecuencia de la anemia, la atrofia muscular, la poliartropatía o la insuficiencia renal crónica. Los problemas locomotores no son muy frecuentes e incluyen cojera debida a poliartritis autoinmune, polimiositis y lesiones óseas, en las que se encuentran los parásitos en grupos de lesiones inflamatorias granulomatosas. (DENEROLLE, 1996)

Las Leishmanias se multiplican en los macrófagos del hígado, produciendo una hepatitis crónica activa y, ocasionalmente, un aumento palpable del hígado, vómitos, poliuria y polidipsia, anorexia y pérdida de peso. Se ha descrito colitis ulcerativa crónica con diarrea y melena así como también enteritis aguda fatal asociada con Leishmaniasis. La enteritis puede ser el resultado del daño parasitario directo (enteritis granulomatosa) o consecuencia de la insuficiencia renal. También se ha descrito un caso de pancreatitis hemorrágica aguda. (CARRASCO, 1991)

Frecuentemente se observa en los perros afectados una insuficiencia renal de moderada a grave. Se han descrito dos lesiones histológicas: la

glomerulonefritis membranosa y una glomerulonefritis extra-membranosa, ambas como consecuencia de la deposición de complejos inmunes. (DÍAZ, 1997). Rara vez se han visto lesiones proliferativas. La proteinuria asociada puede producir síndrome nefrótico y uremia, que es una insuficiencia renal aguda rápidamente fatal sin otros signos de Leishmaniasis.(DENEROLLE, 1996)

Se ha descrito enfermedad cardíaca y trombosis, pero ambas parecen ser bastante infrecuentes. Frecuentemente se ve epistaxis, generalmente unilateral y se considera que es el resultado de las lesiones ulcerosas de la mucosa nasal y/o de la alteración de la coagulación, debida a hiperglobulinemia y trombocitopenia.

2.3 Pruebas Diagnósticas

El diagnóstico de la Leishmaniasis Visceral canina es difícil por dos razones principales:

- Los signos clínicos son muy variables y pueden ser semejantes a otras enfermedades.

- La apariencia histológica es extremadamente inespecífica, y puede ser similar a la de otras infecciones o enfermedades mediadas por inmunidad.

La presentación clínica del perro afectado puede sugerir el diagnóstico, pero es necesario confirmarlo. Se dispone de tres tipos de pruebas:

- Técnicas parasitológicas, cuyo objetivo es visualizar los microorganismos.
- Pruebas serológicas que identifican los anticuerpos anti-leishmanias circulantes.
- Métodos moleculares (reacción en cadena de la polimerasa), en las que se amplifica el ADN parasitario y se lo detecta en los tejidos huéspedes.

2.4 Tratamiento de la enfermedad.

Aunque el tratamiento consigue la curación clínica transitoria en el perro, raramente produce la eliminación completa de la parásitos y las recaídas son frecuentes. Todavía no se ha encontrado un medicamento que elimine la

infección de forma segura y rápida. Las investigaciones actuales tratan de desarrollar nuevos protocolos terapéuticos con medicamentos ya en uso y tratan de encontrar nuevos medicamentos.(OLIVIA, et al, 1996).

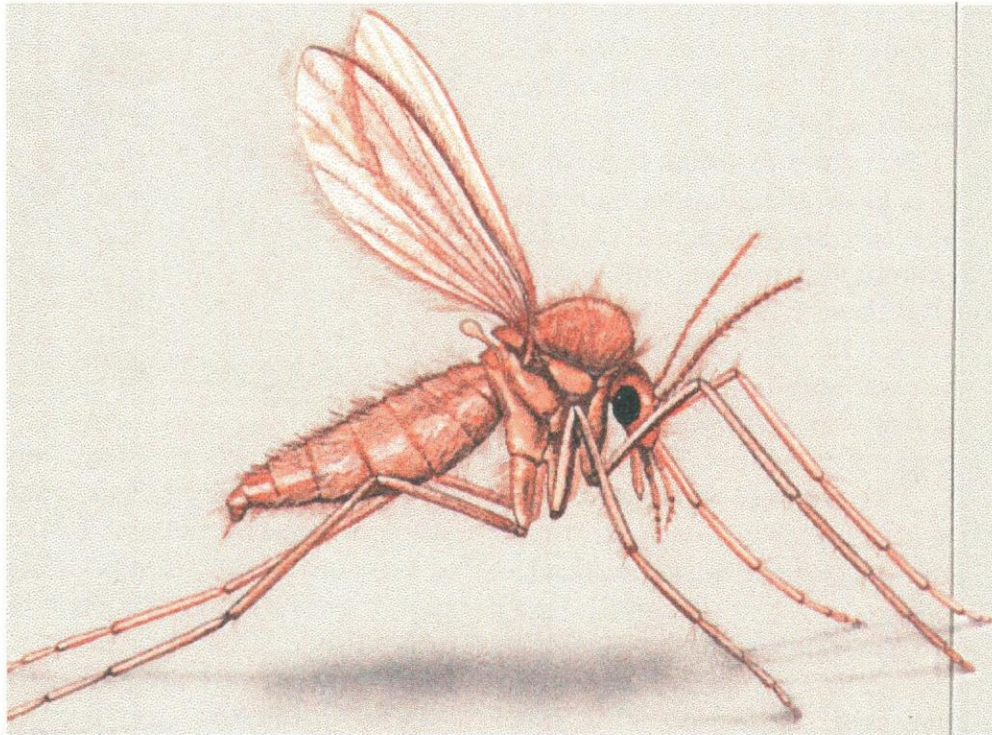
Antes de comenzar el tratamiento se debe realizar un análisis completo de sangre, un perfil bioquímico y un análisis de orina (incluyendo pruebas cuantitativas como el cociente proteínas: creatinina en orina) para evaluar las funciones renal y hepática. Además, es necesario obtener un perfil de la electroforesis de las proteínas séricas como valor basal para las comparaciones subsiguientes y la evaluación de la eficacia del tratamiento.

infectada (FELICIANGELI *et al*, 1993).

Posteriormente, en el mismo foco se detectó infección natural en *Lu. longipalpis*. Usando primers universales (Rogers *et al*, 1990) los parásitos suprapilóricos recuperados de *Lu. longipalpis* fueron tipificados como pertenecientes al género *Leishmania spp.* Mientras que la obtención de cultivos a partir de tubos digestivos de *Lu. evansi* infectados, permitió una más precisa caracterización mediante análisis de restricción de k-DNA e hibridización con k-DNA específico de *L. chagasi*.

Con la referencia de *Lu. evansi* infectada con promastigotos en el barrio Los Magallanes en Valencia (Aguilar *et al*, 1998), se completa la lista de registros de infección natural reportados en vectores de Leishmaniasis Visceral para Venezuela.

Se señala ahora el primer hallazgo de *Lutzomyia longipalpis* encontrado naturalmente infectado con promastigotos en la Isla de Margarita. En los últimos dos años (1996-1997) se han reportado en esta área geográfica 19 casos de Kala-Azar sobre una población estimada para el año 1997 de 349.139 habitantes (OCEI, 1991). Esta situación motivó a un grupo multidisciplinario para la realización de un estudio integral de foco a nivel del hospedador susceptible, de reservorios domésticos (*Canis familiaris*) y de vectores. (FELICANGELI, 1998).



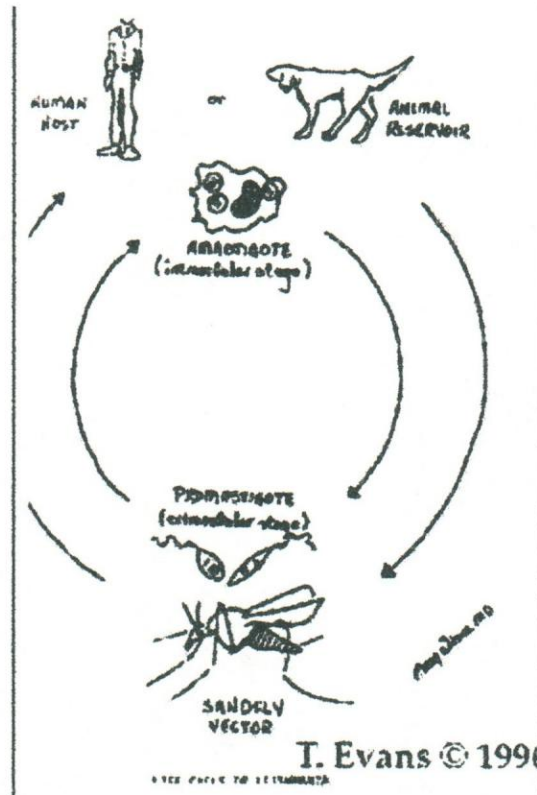
Lutzomyia longipalpis. Sand Fly (Mosca de arena)

El perro doméstico es el principal reservorio de *L. chagasi*. Por ser el compañero del hombre, contribuye a esparcir la enfermedad durante las migraciones humanas. Los protozoos son transmitidos de un mamífero huésped a otro, incluyendo humanos, esto ocurre gracias a las picadas de las moscas de arena o *Lutzomyia longipalpis* quienes han picado a perros infectados anteriormente. (ARIAS, *et al*, 1996)

3.2 Proceso de infección (ciclo de vida)

El insecto vector chupa de un vertebrado infectado e ingiere los parásitos amastigotes. Estos se multiplican en el intestino y se transforman en promastigotes. El flagelo les permite migrar dentro del aparato chupador del insecto. Cada vez que el insecto chupa sangre se depositan parásitos en la piel de un nuevo huésped. Estos son internalizados por los macrófagos y otras células dendríticas, donde pueden sobrevivir y multiplicarse. Las Leishmanias son capaces de vivir en las células del huésped y detoxifican los metabolitos oxigenados. En los macrófagos, los parásitos se multiplican por fisión binaria hasta que rompen la célula y se diseminan a otros macrófagos. (NOLI, 1999).

Ciclo de Vida



OBJETIVOS

Objetivo General.-

Comparar la reactividad frente a la proteína K39 y promastigotes muertos de *Leishmania chagasi* en la detección de LV humana y canina.

Objetivos Específicos.-

.- Evaluar sueros de personas sanas en contacto con perros infectados, para detectar posibles infecciones subclínicas que requieren vigilancia posterior.

.- Determinar la frecuencia de Leishmaniasis visceral canina en la Isla de Margarita.

.- Evaluar las posibles ventajas y desventajas de los antígenos utilizados.

MATERIALES Y METODOS

1. Grupos de Estudio:

1.1 Sueros Humanos

10 Pacientes de Margarita con LV

20 Sueros control de personas sanas (caraqueños)

50 Sueros de personas sanas, familiares o en contacto con
pacientes en Margarita.

1.2 Sueros Caninos

50 Sueros de perros domésticos de Margarita, de comunidades
donde se ha diagnosticado LV.

20 Sueros control de perros sanos de Caracas.

2. Material para la prueba de ELISA:

Placas de microtitulación (poliestireno)

Pipetas calibradas

Lavadora automática de placas

Solución salina fisiológica

Albúmina bovina

Suero anti-inmunoglobulina humano y perro, conjugado con peroxidasa.

Sustrato (H_2O_2 + o-fenilendiamino. 2HCL)

Lector de placas (espectrofotómetro)

El diagnóstico se realiza utilizando la reacción de ELISA (siglas en inglés de inmunoensayo enzimático). El anticuerpo secundario o detector de la reacción es conjugado con una enzima—p.e. peroxidasa de rábano—que no altera su capacidad de reaccionar con la inmunoglobulina primaria. Al añadir el sustrato apropiado $-H_2O_2$ en el caso de la peroxidasa— y un cromógeno incoloro soluble, o-fenilendiamino.2HCL, éste cambia a un color anaranjado en la presencia de la enzima. La intensidad del color es proporcional a la cantidad del conjugado.

Al realizar la reacción en placas de microtitulación, que requieren volúmenes muy pequeños de reactivos, el ELISA permite estudiar docenas o hasta centenares de muestras en un día; por lo tanto, la prueba permite el rastreo de grandes números de sueros en estudios inmuno-epidemiológicos.

La prueba es ampliamente conocida por su utilidad en establecer el diagnóstico presuntivo del síndrome de inmunodeficiencia adquirida, SIDA, pero posee muchas otras aplicaciones en el diagnóstico y seguimiento de muchas patologías infecciosas, autoinmunes u otras.

3. Método:

- A. Sensibilizar las placas de microtitulación (poliestireno) con una suspensión de promastigotes formalinizados en PBS con azida sódica al 0,02%, 2×10^7 parásitos/ml, 50 μ l por pozo, o con 40 ng/pozo de antígeno recombinante K39 en los estudios de Leishmaniasis visceral. Normalmente se deja un pozo sin antígeno y dos con antígeno para cada suero o dilución a probar. Coloque PBS con azida al 0,02% en el marco de la placa y en los pozos control.
- B. Colocar las placas tapadas en la incubadora a 37 °C durante 16 h.

- C. Lavar las placas 6 veces con PBS, pH 7.2, que contiene 0,1% Tween 20(PBST). Coloque 100 μ l de la solución bloqueadora (PBST + 1% albúmina de suero bovino – PBST- BSA), en todos los pozos. Guarde las placas a 37 °C durante 1 hora.
- D. Eliminar la solución bloqueadora. Añada los sueros, previamente diluidos a 1:300 en PBST- BSA, 50 μ l/pozo en los ensayos con promastigotes o diluidos 1:100 en los ensayos con el antígeno rK39. Incluya un suero control positivo y uno negativo en cada placa. Guarde las placas a 37°C durante 1 hora.
- E. Lave las placas 6 veces con PBST.
- F. Coloque el antisuero polivalente contra inmunoglobulinas humanas, conjugando con peroxidasa, previamente titulados y diluidos en PBST- BSA, en todos los pozos, 50 μ l/pozos. (Dilución del conjugado del Diagnostics Pasteur = 1:5000). Para los estudios con sueros caninos, utilice una dilución 1:2000 del conjugado contra Ig G canina de Sigma u otro previamente titulado. Guarde las placas a 37°C durante 1 hora.
- G. Lave las placas 6 veces con PBST.
- H. Añada 50 μ l del sustrato a cada pozo. Guarde las placas en la oscuridad a temperatura ambiente durante 20 min. (Sustrato 20 mg. De o-fenileno-diamino. 2HCL disuelto en 25 ml buffer citrato, pH 5.0; añada

Diagnostics Pasteur = 1:5000). Para los estudios con sueros caninos, utilice una dilución 1:2000 del conjugado contra Ig G canina de Sigma u otro previamente titulado. Guarde las placas a 37°C durante 1 hora.

G. Lave las placas 6 veces con PBST.

H. Añada 50 μ l del sustrato a cada pozo. Guarde las placas en la oscuridad a temperatura ambiente durante 20 min. (Sustrato 20 mg. De o-fenileno-diamino. 2HCL disuelto en 25 ml buffer citrato, pH 5.0; añada 10 μ l H₂O₂ justo antes de usarlo). (Buffer citrato: ácido cítrico 4,67g; Na₂HPO₄ 7,3g; H₂O 1000 ml).

I. Pare la reacción con 2,5 N H₂SO₄ (70 ml ácido sulfúrico concentrado, 930 ml H₂O), 50 μ l/pozo. Lea las placas en el espectrofotómetro a 490 nm.

4. Análisis de los resultados

En cada ensayo de ELISA, se utilizaron sueros de control positivo y negativo para controlar las múltiples variantes diarias en la prueba (variaciones mínimas de pH, la temperatura del ambiente, el número de placas utilizadas y, por lo tanto, pequeñas diferencias en el tiempo de procesarlas,

etc.). No es una prueba cualitativa, sino cuantitativa; no se evalúa un resultado simplemente como positivo o negativo excepto bajo ciertas condiciones en el campo.

Para cada grupo estudiado, se determinó el promedio de las densidades ópticas y la desviación estándar. Se utilizó el promedio + dos desviaciones estándar de los grupos de control negativos para establecer el límite que determinará si un perro o humano fuera positivo. Se compararon diferentes grupos de sueros utilizando la prueba "t" de Student. Se hicieron los cálculos estadísticos con el programa GraphPAD InStat.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados de la prueba de ELISA con los sueros individuales de caninos provenientes del Estado Nueva Esparta, se muestran en la Tabla N° 1. De un número de 50 muestras se obtuvo un 28% positivo, frente al antígeno de promastigotes y un 36% positivo, frente al antígeno K39 (Tabla 2). Se toma como un valor positivo todo aquel que sea mayor a 0.5445 con el antígeno DD8; y con el antígeno K39 debe ser mayor a 0.184.

En la Tabla 3, se muestran los valores de la prueba en los sueros individuales del grupo control. En el grupo control, caninos provenientes de Caracas, se observaron: un 10% positivo con el antígeno DD8 (2/20) y ninguno con K39 (Tabla 2). Se puede postular que las reacciones positivas con DD8 en el grupo de controles negativos reflejan reacciones cruzadas no-específicas con otros micro-organismos.

Cuando se compara la reactividad de ambos antígenos con los sueros de caninos de Nueva Esparta, estos datos se reflejan en la Tabla N° 4. Se puede observar que un 20% fue positivo para ambos antígenos, un 8% positivo solo con DD8, estos posiblemente se curaron solos o representan reacciones cruzadas (falsas positivas). El 14% negativo frente a DD8 y

positivo con K39, probablemente representan casos muy tempranos o en período de incubación, que más tarde podrían convertirse en casos francamente positivos, porque no se han reportado reacciones cruzadas ni falsas positivas con este antígeno. Un 58% fueron negativos para ambos antígenos, es decir totalmente inactivos.

Al realizar la prueba "t" de Student a la muestra de sueros caninos de Nueva Esparta expuesta al Ag DD8 frente a los datos obtenidos de los sueros controles, caninos de Caracas, se obtiene una probabilidad de 0.02 ($P < 0.05$), indicando así que la diferencia entre los dos grupos es estadísticamente significativo. Al realizar la misma operación con los sueros de caninos provenientes de Nueva Esparta frente a los sueros control sometidos al Ag K39, la probabilidad fue 0.003 ($P < 0.0001$), indicando así una diferencia entre los dos grupos muy significativa. Evidentemente el antígeno K39 mostró una discriminación mucho mejor entre el grupo control negativo y los animales estudiados en Margarita.

Al tabular los datos obtenidos de la reacción de ELISA con los sueros individuales de humanos con LV 5 o casos clínicos (Tabla N° 5), sanos (Tabla N° 6) y personas en contacto con los pacientes clínicos o de las áreas endémicas de Margarita (Tabla N° 7), se considera una persona positiva, es decir con Leishmaniasis Visceral clínica o sospecha de la enfermedad, a partir

del valor 0.321 con el antígeno DD8 y 0.137 para el K39 respectivamente. Entre los casos clínicos estudiados se obtuvo de 10 individuos un 90% positivos con DD8 y un 100% positivo con K39 indicando así la especificidad del antígeno (Tabla N° 8). Para la muestra de pacientes sanos o control proveniente de Caracas (10) se detectó solo un 10% positivo con DD8 (1/10) y ningún positivo con K39 (Tabla N° 8). Para las personas que se denominaron contactos o personas sanas del área endémica, de una población de 50 individuos se consiguió un 24% positivo frente al Ag DD8, probablemente debido a reacciones cruzadas o casos curados espontáneamente; y un 2% positivo con K39 (Tabla N° 8). Al comparar los valores obtenidos con ambos antígenos se puede determinar que solamente una persona (2%) dio francamente positivo para ambos antígenos, un 22% fue positivo con DD8 y negativo con K39, probablemente reacciones no-específicas, y un 38% fue negativo para ambos con ambos antígenos, inactivos. (Tabla N° 9)

Al comparar los valores de la reacción de los sueros de pacientes humanos con LV frente a los datos de individuos sanos, los cuales fueron realizados con DD8, se aprecia una probabilidad de 0.0009 ($P < 0.01$) representando una diferencia muy significativo entre los dos grupos. Al determinar la probabilidad de la muestra anterior pero con el antígeno K39 se obtuvo 0.001 ($P < 0.001$) también una diferencia estadística muy significativa.

Esta investigación no solo se basa solamente en los resultados obtenidos con las muestras de los pacientes respecto al grupo control o individuos sanos, también se toma en cuenta la posible relación que pueda existir entre el grupo de individuos que conforman al grupo familiar o de contacto con los pacientes clínicos; al realizar el cálculo estadístico y despejar la probabilidad de este grupo se obtuvo una probabilidad (P) de 0.0188 con el antígeno DD8, indicando que los valores en el grupo de contactos muestran una diferencia estadísticamente significativa comparados con los controles, reflejo de posibles infecciones con *Leishmania*. Para la muestra donde se utilizó el K39 como antígeno de la reacción de ELISA, la prueba de Student dio una probabilidad de 0.684, indicando que no hubo una diferencia significativa. Por lo tanto, se concluye que la frecuencia de infección en los humanos contactos no es significativo en Margarita.

En las Tablas N° 10 y N° 11, mostramos los promedios y desviación estándar en los perros y humanos frente a los dos antígenos, por lo importante de esta información estadística en el análisis de los resultados presentado arriba.

Los resultados demuestran muy claramente que la frecuencia de Leishmaniasis Visceral canina es muy elevada, mientras que la infección en el humano es poco frecuente. El 85% de los pacientes humanos con LV en

Margarita son niños de 2 años o menos. Se puede concluir que el parásito ataca al humano cuando su respuesta inmune es muy inmadura. En buenas condiciones de salud e higiene, el peligro para los niños es relativamente bajo, pero precarias condiciones de salud, nutrición y otras aumentan el riesgo a la población humana.

Por lo imposible de resolver todos los problemas sociales que aumentan el riesgo para los niños a corto plazo, es importante tratar de controlar la infección en los perros. Actualmente no aplican tratamiento a los canes, por lo costoso y ineficaz. La eutanasia de los perros infectados, que inicialmente no presentan signos clínicos de la enfermedad, es una solución muy poco aceptable para los dueños y para las autoridades de salud. Ha sido utilizado en grandes campañas en Brasil y es el único recurso de control disponible en Margarita actualmente. De todas maneras, se han iniciado estudios de vacunación preventiva en la población canina de Margarita. El control de esta enfermedad, con un ciclo de vida que incluye el perro, el vector y, ocasionalmente, el ser humano, ofrece un reto difícil para las autoridades sanitarias de Margarita y de otros focos de LV en Venezuela.

Al observar la distribución de las áreas endémicas en la Isla de Margarita, se nota una preferencia hacia la parte centro-norte. Los macizos montañosos que se alinean en sentido sureste-noreste aíslan completamente

las áreas endémicas de la zona de alta actividad turística, al este de las montañas. Posiblemente esto se deba al centro anticiclónico que cubre la Isla durante todo el año. Es interesante notar que gracias a este fenómeno meteorológico, quizás la enfermedad no ha invadido otras áreas en la Isla, ya que la dirección del viento y la presencia de las montañas regulan la distribución del vector *Lu. Longipalpis* en toda la Isla.

CONCLUSIONES

La especificidad del antígeno K39 muestra ser más elevada a la especificidad del antígeno DD8, para la detección de LV en humanos y caninos. Igualmente la sensibilidad de la prueba con K39 es elevada, porque detecta un porcentaje muy elevado de los casos con diagnóstico confirmado.

El antígeno DD8 muestra una baja especificidad; su poder antigénico es relativamente elevado porque detecta los casos positivos, pero se observan reacciones en personas y cánidos en los cuales no se confirmaron la enfermedad (falsas positivas), posiblemente debido a reacciones cruzadas con otros microorganismos.

Aparentemente la elevada frecuencia de infección en los cánidos confirma su importancia como el reservorio principal de la leishmaniasis visceral en la Isla de Margarita.

Existe una pequeña proporción de la población humana positiva con el antígeno DD8, pero casi todas negativas frente al antígeno K39. Por lo tanto, no sufren de LV activa. Las reacciones positivas con DD8 aparentemente son

reacciones cruzadas no-específicas, pero en algunos casos podría reflejar infecciones subclínicas que se curaron espontáneamente.

La aplicación de la prueba de ELISA se debe realizar periódicamente si se sospecha de alguna infección, ya que en etapas tempranas de la enfermedad puede dar negativo para ambos antígenos.

La frecuencia de infección en los humanos de contactos, familiares o personas que convivan con el paciente, es muy baja. Por lo tanto, la cepa de *L. chagasi* que circula en la Isla es poco patógena para el humano. El ataque del parásito en humanos puede ser mayor si su respuesta inmune es muy inmadura.

RECOMENDACIONES

Se debe implementar una campaña educativa, donde se tome como consigna la "prevención". La comunidad debe conocer la enfermedad y en que consiste, así sabrá la importancia que tiene controlar el vector. Entre las medidas de control que se deben tomar están: eliminar cualquier deposito de agua dulce, que permita que le vector se reproduzca o prolifere. Implementar el uso de repelente o mosquiteros, durante la noche. Propiciar hábitos de limpieza y salubridad en las personas en general.

Implementar el uso del antígeno K39 para la detección de la enfermedad, tanto en canes como en humanos, así permitirá un mejor control de la misma. Así se podría lograr un control más adecuado, con la eliminación de los canes que presenten la enfermedad de una manera más certera, ya que al eliminar el reservorio se erradicaría la enfermedad de la Isla de Margarita.

En el futuro, una vacuna eficaz contra la forma canina de LV podría ofrecer la forma más idónea para controlar la enfermedad.

BIBLIOGRAFÍA

AMARAL, A.; J. TORREALBA; C. HENRIQUEZ; W. KOWALENKO y P. BARRIOS. (1961). "Probable transmisor de la Leishmaniasis Visceral en Venezuela." Gaceta Médica. 70, p. 389-408.

AGUILAR, C.; E. FERNANDEZ; R. FERNANDEZ; D. CANNOVA; E. FERRER; Z. CABRERA, *et al*, (1998) "Urban visceral leishmaniasis in Venezuela" Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 93, p. 15-16.

AMARAL, A; J. TORREALBA; C. HENRIQUEZ; W. KOWALENKO y P. BARRIOS. (1961) "Consideraciones sobre el Kala-Azar en el mundo y su presencia comprobada en Venezuela desde 1941" Rev. VzI. Sand. Soc. Vol 25. P. 350-550.

ARIAS, F. (1999). "El Proyecto de Investigación". Guía para su Elaboración, (3ª ed.) Caracas. p. 95.

ARIAS, J; P. MONTEIRO y F. ZICKER. (1996) "The reemergence of visceral leishmaniasis in Brazil" Emerging Infectious Diseases. 2, p. 2.

BUSTAMANTE, H. (1948). "Epidemiología de la Leishmaniasis en América". Bol. Of Sanit Pan. 27, p. 611-618.

CARRASCO, L; F. DE LARA; E. MARTÍN et al. (1991) "Acute haemorrhagic pancreatitis associated with canine visceral Leishmaniasis." Veterinary Pathology. 28, p. 342- 343.

DAVIDSON, R. y S. CROTT. (1993) "Recent Advances in the treatment of Visceral Leishmaniasis." Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 87, p. 130-131.

DEANE, L. (1956). "Estudios sobre reservorios e transmisores realizados no estado de Ceará". Tesis Doctoral. Fac. Med.Univ. São Paulo. p. 162.

DENEROLLE, P. (1996) "Leishmaniose canine: difficulté du diagnostic et du traitement." Pratique Médicale et Chirurgienne des Animaux de Compagnie. 31, p. 137-145

DESJEUX, P. (1991). "Information on the epidemiology and control of the Leishmaniasis by country and territory" Who/Leish/91. p. 30.

DÍAZ, M. y R. SLAPPENDEL.(1997) "A case of autochthonous canine leishmaniasis in the Netherlands" *Veterinary Quarterly*. 19, p. 69-71.

FELICIANGELI, M; O. ZERPA; N. RODRIGUEZ; A. BRAVO; W. GALINDO y J. CONVIT. (1998). "Hallazgo de *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) naturalmente infectada con promastigotos en un foco endémico de Leishmaniasis Visceral en la Isla de Margarita, Venezuela" *Boletín de la Dirección de Mariología y Saneamiento ambiental*. 38, p. 73-75.

FELICIANGELI, M.; B. GOMEZ; O. DELGADO; L. GRACIA y C. BELLO. (1993) "Leishmania Visceral en el caserío La Ganadería de Guayabita, estado Aragua Venezuela: Infección natural de *Lutzomyia evansi* (Diptera:Psychodidae) a *Leishmania spp.*" *Acta Cient. Venez.* 44, p.262.

GARCÍA, R; A. BOASWAAIN y E. RASSI. (1973). "Informe de Kala-Azar sobre las actividades realizadas en el foco oriental " Presentado en la XVII Reunión anual de Dermatoprólogos.

GARCÍA, R. y E. RASSI. (1971-72). "Estado actual del Kala-Azar en el oriente venezolano" *Bol. Dermat. Sanit.* Vol. 14. P. 62

GOMÉZ, H. (1951). "Leishmaniasis visceral en las Américas". Boletín Sanitario Panamericano. 31, p. 338-340.

GUANIPA, E.; M. FAJARDO y J. SOTO. (1962) "Kala-Azar en Venezuela" Bol. Hosp. Niño, J. M. De los Ríos. 4, p.219-236.

KASSIRKI, N. (1991). "Enfermedades de los países de clima cálido. Leishmaniasis". Editorial Paz Moscú. p. 114-115.

MAYRINK, W; O. GENARO; J. FRANÇA; R. DA COSTA; W. TAFURI; V. PEIXOTO; A. ROTONDO; A. BARBOSA; P. WILLIAMS y C. DA COSTA. (1996) "Phase I and II open clinical trials of a Vaccine against *Leishmania chagasi* infections in dogs" Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 6, p. 695-697.

MAURICIO, I; J. STOTHARD y M. MILES. (2000). "The strange case of *Leishmania chagasi*" Parasitology Today. 5, p.188 – 189.

MARTÍNEZ, A. y A. PONS. (1941) "Primer caso de Kala-Azar en Venezuela". Gaceta Médica Caracas. 48, p. 329-332.

MANSON, B. (1987) "The Leishmaniasis in biology and medicine. Clinical aspects and control". Peters W., Killick-Kenderick Editors. p. 703-729.

NOLI, C. (1999) "Leishmaniosis Canina" Waltham Focus. 9, p.17-23.

NIEVES, J.(1978) "Diagnóstico e tratamento las doencas infectuosas e parasitarias". Río de Janeiro: Guanabara Koogan.

OLIVIA, G.; L. CORTESE; P. CIARAMELLA y R. DE LUNA. (1996) "Trattamento terapéutico della leishmaniosi del cane". Veterinaria. 10, p. 115-127.

OCEI. (1991). Censo 1990. Oficina Central de Estadísticas de Informática. Caracas.

ORIHUELA, R. (1991) "Leishmaniasis Visceral (Kala-Azar)" Actualización en infectología. 3, p. 2-9.

PIFANO, F. (1969). "Algunos aspectos en la ecología y epidemiología de las enfermedades endémicas con focos naturales en el área tropical, especialmente en Venezuela" Ministerio de Sanidad y Asistencia Social. p.297.

PIFANO, F. y M. ROMERO (1964). "Investigaciones epidemiológicas sobre la Leishmaniasis visceral en la Isla de Margarita, Edo. Nueva Esparta, Venezuela" Gaceta Médica. 72, p. 425-430.

QU QUI, J.; LI Z.; M. MASOOM; M. ABDUR-RAB; H. AKSU; S. REED; K. CHANG y A. GILMAN. (1994). "Serodiagnosis of Asian Leishmaniasis with a recombinant antigen from the repetitive domain of a *Leishmania* Kinesin" *Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 88, 543 – 545.

REY, L. (1973) "Parasitología" Guanabara Koogan. P. 695

ROGERS, M.; S. POOPER y D. WIRTH. (1990). "Amplification of kinetoplast DNA as a tool in the detection and diagnosis of *Leishmania*." *Exper. Parasitol.* 71, p. 267-275.

RONDÓN, Antonio. (1993) "Leishmaniasis". Dermatología Venezolana. 31, p.39 – 46.

SLAPPENDEL, R. (1988). "Canine Leishmaniasis. A review based on 95 cases in the Netherlands". Veterinary Quarterly. 10, p. 1-16.

TRAVI, B.; J. VELEZ; L. BRUTUS; I. SEGURA; C. JARAMILLO y J. MONTOYA. (1990). "Lutzomyia evansi, an alternate vector of Leishmania chagasi in a Colombian focus of visceral leishmaniasis" Trans. Roy. Soc. Trop. Med. & Hyg. 84, p. 676-677.

TRAVI, B; J. MONTOYA; J. GALLEGO; C. JARAMILLO; R. LLANO e I. VELEZ. (1996). "Bionomics of Lutzomyia evansi (Diptera: Psychodidae) vector of visceral leishmaniasis in Northern Colombia" J, Med. Entomol. 33, p.278-285.

TORRES, F. y F. MARRNOQUIN. (1991). "Historia del género Leishmania" Centro de Investigaciones de enfermedades tropicales de la Universidad del Valle en Guatemala y el centro para el control de enfermedades de Atlanta (U.S.A.).

TORREALBA, J. (1964). "Consideraciones sobre epidemiología de la Leishmaniasis visceral en Venezuela" Gact. Med. Carc. 1-2, p. 99 – 114.

TORREALBA, J. (1970). "Observaciones sobre diagnóstico, terapéutica y evaluación de la Leishmaniasis Visceral humana y canina" Tesis Doctoral, Universidad de Carabobo.

VELASQUEZ, J.; J. MARCANO; J. PEÑALVER y H. PATIÑO. (1995) "Kala- azar en la Isla de Margarita." Primer caso. Archivos Venezolanos de Puericultura y Pediatría, 28, p. 91-96.

ZERPA, O.; M. ULRICH; E. NEGRÓN; N. RODRIGUEZ; M. CENTENO; V. RODRIGUEZ; R. BARRIOS; D. BELIZARIO; S. REED y J. CONVIT. (1999). "Canine visceral leishmaniasis on Margarita Island (Nueva Esparta, Venezuela)" Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. (Aceptado).

ZERPA, Olga. (1999) "Leishmaniasis Visceral en la isla de Margarita" Instituto de Biomedicina, Caracas. p.2.

TABLAS y GRÁFICOS

TABLA N° 1

Reactividad serológica de sueros caninos de Margarita con los antígenos DD8 y K39

Ind. N°	Ag DD8	Ag K39
513	0.267*	0.675
514	0.078	-0.032
515	0.216	0.046
517	0.348	0.013
518	0.857	0.729
519	0.712	0.859
520	0.479	0.706
521	0.544	0.001
522	0.244	0.003
523	0.245	0.008
524	0.359	0.039
525	0.198	0.039
526	0.360	0.299
527	0.253	0.02
528	1.17	0.987
529	1.082	0.983
530	0.755	0.623
531	0.809	0.016
532	0.117	0.003
533	0.144	0.037
534	0.142	0.028
535	0.329	0.039
536	0.252	0.021
537	0.621	0.035
538	0.592	0.052
539	0.303	-0.024
540	0.432	0.024
541	0.453	0.039

591	0.162	0.021
592	0.187	0.004
593	0.039	0.97
594	0.925	0.883
595	0.357	0.059
596	0.834	1.024
597	0.900	0.911
598	0.013	0.051
599	1.162	0.981
600	0.705	0.031
601	0.374	0.409
602	0.091	-0.012
603	0.173	-0.004
604	0.76	0.493
605	0.095	0.022
606	0.016	0.048
607	0.409	0.051
608	0.275	0.707
609	0.072	0.006
610	0.427	0.405
611	0.219	0.894
612	0.518	0.539

* Densidad óptica de la reacción serológica.

TABLA N° 2

Resultados de las pruebas ELISA
con los sueros caninos

Caninos	N° Ind.	Ag DD8	%	Ag k39	%
Nueva Esparta	50	14*	28	18	36
Caracas (Ctrl)	20	2	10	0	0

*Número de reacciones positivas

TABLA N° 3

**Reactividad serológica frente a los antígenos DD8 y K39 en
sueros caninos del grupo control (Caracas)**

Ind. N°	Ag DD8	Ag K39
1	0.129	-0.004
2	0.381	0.038
3	0.561	0.009
4	0.672	0.02
5	0.192	0.036
6	0.228	0.025
7	0.115	0.005
8	0.178	0.056
9	0.115	0.018
10	0.148	0.049
11	0.182	0.026
12	0.107	0.02
13	0.119	0.015
14	0.131	0.029
15	0.154	0.004
16	0.177	0.0095
17	0.384	0.099
18	0.229	0.11
19	0.3	0.078
20	0.209	0.111

TABLA N° 4

Porcentajes de los sueros caninos positivos de Nueva Esparta frente a los Ag DD8 y K39

Ag DD8	Ag K-39	N° total Ind.	%
Positivo	Positivo	10	20
Positivo	Negativo	4	8
Negativo	Positivo	7	14
Negativo	Negativo	29	58

TABLA N°5

**Reactividad serológica frente a los antígenos DD8 y K39 en
pacientes con diagnóstico clínico de LV**

Ind. N°	Nombre	Ag DD8	Ag K39
908	SJ	0.353	0.91
919	MM	0.545	1.011
921	DVB	0.681	0.296
939	RN	0.454	0.645
947	CM	0.504	1.002
948	VW	0.609	0.544
956	LP	0.332	1.02
963	VL	0.394	1.056
967	SL	0.279	0.315
969	VD	0.752	1.269

TABLA N°6

Reactividad serológica frente a los antígenos DD8 y K39
en personas sanas de un área no-endémica
(Instituto de Biomedicina, Caracas)

Ind. N°	Nombre	Ag DD8	Ag k39
1	MM	0.057	0.046
2	HI	0.021	0.006
3	RM	0.089	0.117
4	UM	0.071	0.022
5	LJ	0.376	0.005
6	MC	0.072	0.069
7	ZX	0.115	0.004
8	AA	0.169	0.079
9	RH	0.143	0.089
10	OA	0.124	0.093

TABLA N° 7

**Reactividad serológica frente a los antígenos DD8 y K39
en personas sanas de áreas endémicas de LV
en Margarita.**

Ind. N°	Ag DD8	Ag K39
401	0.173	0.0245
402	0.211	0.0075
403	0.224	0.042
404	0.227	0.017
405	0.245	0.0165
406	0.205	0.006
407	0.375	0.0325
408	0.052	0.008
409	0.58	0.0085
410	0.216	0.009
411	0.571	0.015
412	0.222	0.0035
413	0.081	0.018
414	0.523	0.025
415	0.246	0.01
416	0.429	0.0285
417	0.183	0.034
418	0.257	0.002
419	0.361	0.779
420	0.391	0.091
421	0.326	0.0155
422	0.322	0.07
423	0.318	0.0205
424	0.299	0.0225
425	0.239	0.0155

426	0.196	0.024
427	0.074	0.017
428	0.452	0.047
429	0.223	0.039
430	0.134	0.007
431	0.585	0.082
432	0.248	0.074
433	0.183	0.0125
434	0.063	0.018
435	0.15	0.0085
436	0.095	0.0055
437	0.155	0.023
438	0.151	0.015
439	0.085	0.033
440	0.112	0.004
441	0.162	0.011
442	0.093	0.0015
443	0.266	0.0115
444	1.031	0.011
445	0.127	0.01
446	0.219	0.015
447	0.132	0.119
448	0.099	0.0055
449	0.263	0.011
450	0.234	0

TABLA N° 8

**Resultados positivos en los grupos de pacientes,
controles y personas sanas en áreas
endémicas de Nueva Esparta**

Pacientes	N° Indv.	Ag DD8	%	Ag k-39	%
Clínicos	10	9	90	10	100
Sanos (ctrl.)	10	1	10	0	0
Contactos	50	12	24	1	2

TABLA N° 9

**Porcentajes de pruebas positivas en humanos contactos
frente a Ag DD8 y K39**

Ag DD8	Ag K39	N° total Ind.	%
Positivo	Positivo	1	2
Positivo	Negativo	11	22
Negativo	Positivo	0	0
Negativo	Negativo	38	76

TABLA N° 10

**Promedio y Desviación Estándar de la reactividad
de Sueros Caninos frente a los
antígenos DD8 y K39**

Antígeno	Promedio	Desviación Estándar
DD8 NE	0,41738	0,3148606
DD8 CCS	0,23255	0,1559826
K39 NE	0,294518	0,3795573
K39 CCS	0,050225	0,06693

NE = Sueros de Nueva Esparta

CCS = Sueros Control de Caracas

TABLA N° 11

Promedio y Desviación Estándar de la reactividad de Sueros Humanos con LV y Sueros Control frente a los antígenos DD8 y K39

Antígeno	Promedio	Desviación Estándar
DD8 NE	0,4853	0,1648746
DD8 CCS	0,1237	0,09877
K39 NE	0,8068	0,334939
K39 CCS	0,053	0,4196

NE = Pacientes Clínicos

CCS = Personas Sanas

GRÁFICO N°1

**Promedios de la reactividad de
sueros caninos frente a los
antígenos DD8 y K39**

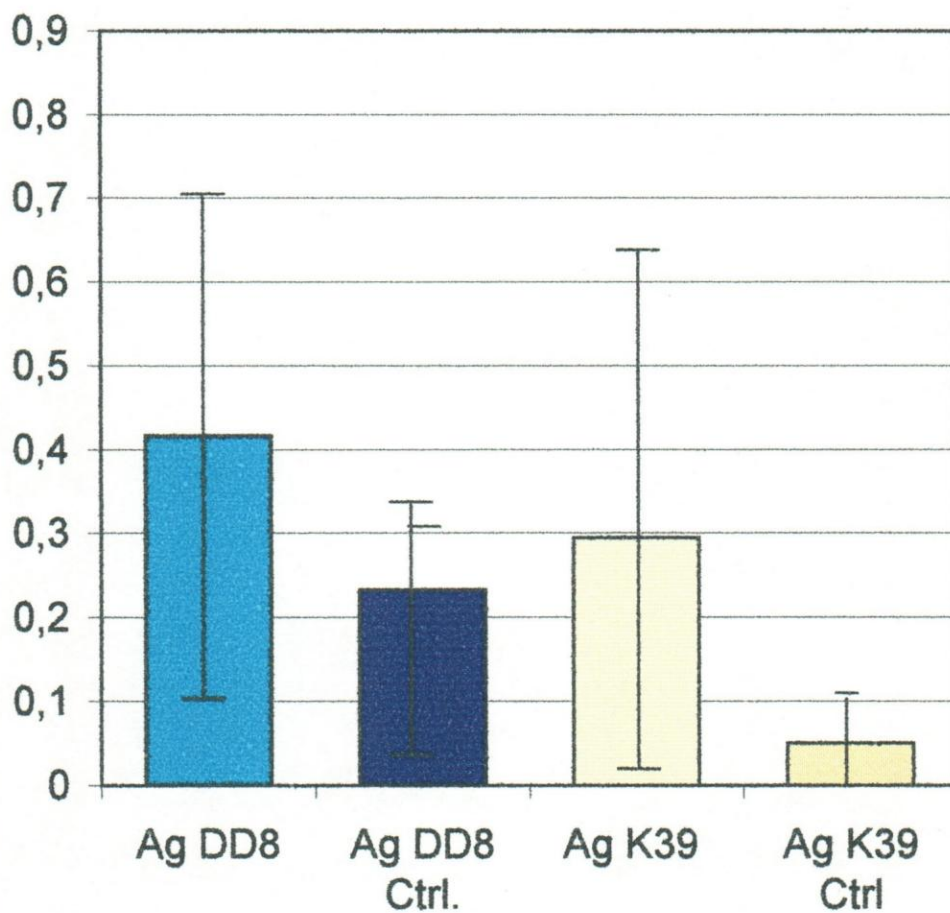
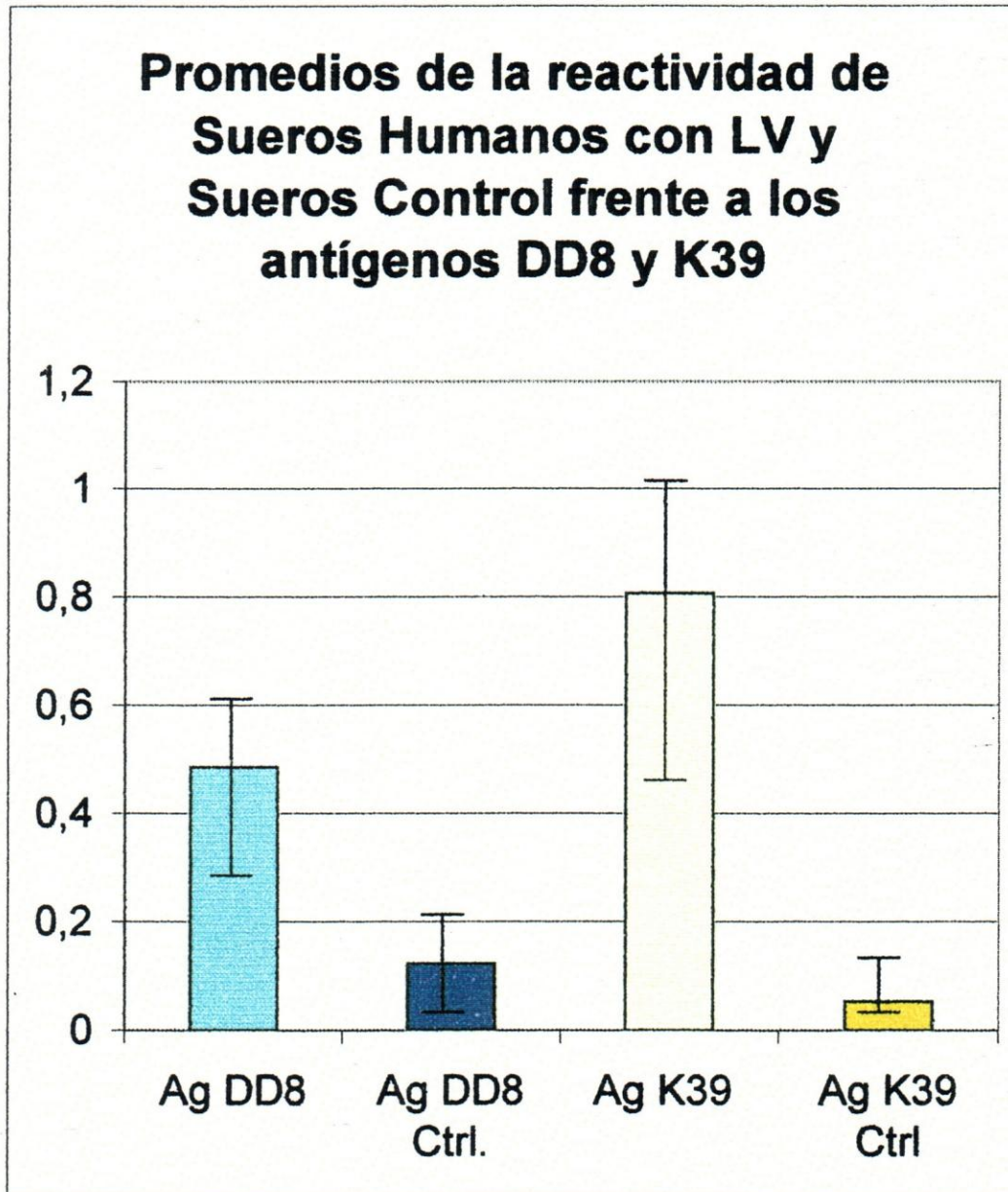


GRÁFICO Nº 2



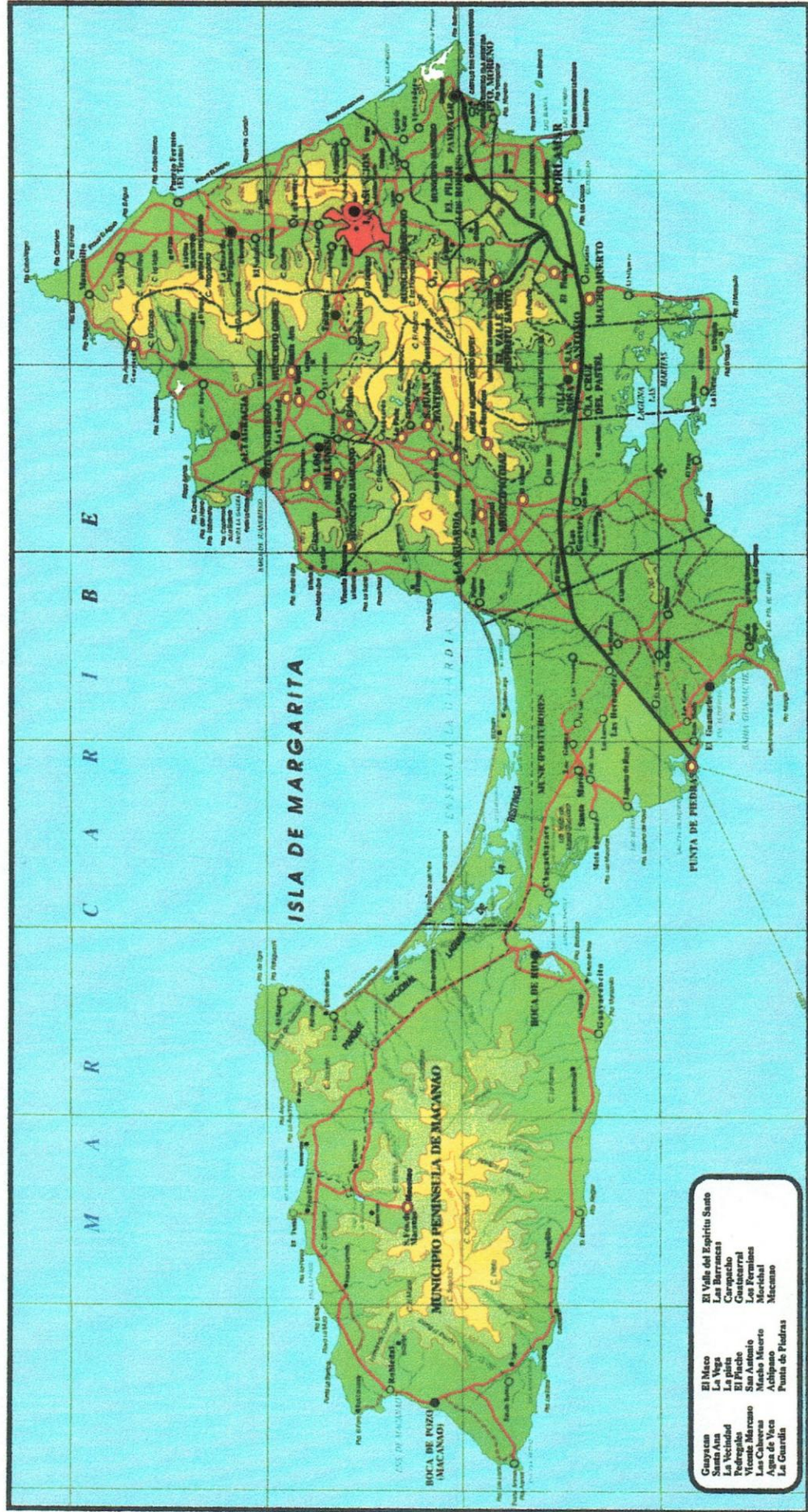
ANEXO



Estado Nueva Esparta

Focos de Leishmaniasis Visceral

1999



- Guayacan
- Santa Ana
- La Vega
- La Vieja
- Pedregal
- Vicente Marcano
- Las Chacaras
- La Guardia
- El Meco
- El Valle del Espilito Santo
- Las Barrancas
- Carapacho
- Guaitaral
- Los Fermiles
- Mercedal
- Niceman
- San Antonio
- Monje Muerto
- Amor y Paz
- Punta de Piedras

 FOCO DE LEISHMANIASIS VISCERAL