

Rev.MVZ Córdoba 22(2):5829-5836, 2017. ISSN: 0122-0268

[DOI: doi.org/10.21897/rmvz.1011](https://doi.org/10.21897/rmvz.1011)

ORIGINAL

## Antibodies of *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania mexicana* and *Leishmania braziliensis* in domiciled dogs in Tabasco, Mexico

### Anticuerpos de *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania mexicana* y *Leishmania braziliensis* en perros domiciliados de Tabasco, México

Guadalupe Arjona J<sup>1</sup> M.Sc, Maritza Zaragoza V<sup>1</sup> M.Sc, Claudia Zaragoza V<sup>1</sup> M.Sc, Ricardo García Herrera<sup>1</sup> Ph.D, Manuel Sánchez M<sup>2</sup> Ph.D, Eliut Santamaria M<sup>1</sup> M.Sc, Luis Cruz B<sup>1\*</sup> Ph.D.

<sup>1</sup>Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, División Académica de Ciencias División Académica de Ciencias Agropecuarias. Carretera Villahermosa-Teapa, km 25, R/A. La Huasteca 2<sup>a</sup> Sección, CP 86280. Villahermosa, Tabasco, México. <sup>2</sup>Universidad de Granada. Facultad de Ciencias, departamento de Parasitología, Severo Ochoa s/n, E-18071 Granada, España.\*Correspondencia: lecb82@gmail.com

Received: May 2016; Accepted: November 2016.

#### ABSTRACT

**Objective.** To determine *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*), *Leishmania mexicana* (*L. mexicana*) and *Leishmania braziliensis* (*L. braziliensis*) circulating antibodies in dogs from Chontalpa region in Tabasco, Mexico using ELISA diagnostic techniques Fe-SOD and Western blot. **Materials and methods.** For this study, 119 serums were obtained from domiciled dogs. Serums were tested for antibodies against *T. cruzi*, *L. mexicana* and *L. braziliensis*, using ELISA and Western Blot sod as diagnostic test. The antigenic fraction used in both tests was the Fe-SOD excreted by the species of *Leishmania* and *Trypanosoma*. **Results.** The obtained frequency in this study was 3.36% for *T. cruzi*, 9.24% for *L. mexicana* and 10.08% for *L. braziliensis*. **Conclusions.** The present study has demonstrated the presence of antibodies to these parasites in Chontalpa region from Tabasco, Mexico.

**Keywords:** Antibodies, blood serum, enzyme – linked immunospot assay, *Western blotting* (Source: MeSH).

#### RESUMEN

**Objetivo.** Determinar la frecuencia de anticuerpos circulantes de *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*), *Leishmania mexicana* (*L. mexicana*) y *Leishmania braziliensis* (*L. braziliensis*) en una población de perros usando ELISA Fe-SOD y Western blot en la región Chontalpa del estado de Tabasco, México. **Materiales y métodos.** Para este estudio se obtuvieron 119 sueros de perros domiciliados, con el consentimiento previo de los propietarios. Los sueros fueron analizados para detectar anticuerpos contra *T. cruzi*, *L. mexicana*, y *L. braziliensis*, usando como prueba diagnóstica ELISA-sod y Western Blot. La fracción antigénica utilizada en las dos pruebas fue la Fe-SOD excretada por las especies de *Trypanosoma* y *Leishmania*. **Resultados.** La frecuencia obtenida en este estudio fue de 3.36% para *T. cruzi*, 9.24% para *L. mexicana* y 10.08% *L. braziliensis*. **Conclusiones.** El presente estudio demostró la presencia de anticuerpos para estos parásitos en la región Chontalpa del estado de Tabasco, México.

**Palabras clave:** Anticuerpos, inmuno ensayo ligado a enzimas, suero sanguíneo, *Western blotting* (Fuente: MeSH).

## INTRODUCTION

Protozoa are microorganisms that cause public health problems in humans. Among the most important protozoa, are *Trypanosoma cruzi*, which causes American Trypanosomiasis or Chagas disease (1) and *Leishmania* sp. which causes leishmaniasis. These agents are transmitted by a bed bug (*Triatoma dimidiata*) and a blood-sucking mosquito (*Lutzomyia* and *Phlebotomus*) respectively. However, recent studies have indicated that agents such as ticks of the genus *Rhipicephalus sanguineus* may be playing a role in the transmission of canine visceral leishmaniasis (2).

American trypanosomiasis, also known as Chagas disease, is a parasitic zoonosis caused by a protozoan, and characterized by using two guests, vertebrate (dog) and other invertebrate (*triatoma*) to complete its life cycle (3); Leishmaniasis is a disease caused by a complex group of protozoa. The life cycle takes place in two evolutionary forms, one transmitted by the bite of a sandfly Diptera (vector) and one in the host (dogs) that often acts as a reservoir of the parasite (4). According to the epidemiological importance of dogs in the transmission of Chagas disease as reservoirs of the parasite in endemic areas, it is essential to know the prevalence of infection, as a measure of active surveillance to identify the circulation of the parasite before it infects the human population susceptible (5). Some studies carried out in Yucatan on Trypanosomiasis in dogs reported seroprevalence of 10.74% (Merida, Molas and Xcalacoop) and 21.34% in the state of Quintana Roo (Playa del Carmen, Akumal Xcalac) (6). *Leishmania* sp. is very common in almost all the world, especially in tropical and subtropical areas.

The prevalence in the Yucatan Peninsula reported for *L. braziliensis* (7.52%), *L. infantum* (6.07%) and *L. mexicana* (20.63%) (7), while it was reported 41.4% for the peninsula in general (8) and 30.2% (9) for Merida. The most common worldwide used techniques for detection of these agents are diagnostic techniques Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA), indirect immunofluorescence (IFI) and Polymerase Chain Reaction (PCR). ELISA test Fe-SOD has high sensitivity for the diagnosis of Leishmaniasis, since it has a specificity between 99 and 99.7%; and a sensitivity between 96.2 and 100% (7, 10,11). The use of Western Blot is justified by high sensitivity compared to ELISA, however their values are consistent with those obtained with ELISA Fe-SOD, but has a higher cost. (7).

## INTRODUCCIÓN

Los protozoarios son un grupo de microorganismos capaces de generar problemas de salud pública en la población humana. Dentro de los protozoarios de mayor relevancia en salud pública, se encuentran, *Trypanosoma cruzi*, causante de la Tripanosomiasis americana o Enfermedad de Chagas (1) y *Leishmania* spp, causante de la Leishmaniasis. Estos agentes son transmitidos por una chinche (*Triatoma dimidiata*) y mosquitos hematófagos (*Lutzomyia* y *Phlebotomus*), respectivamente; sin embargo estudios recientes han señalado que agentes como las garrapatas del género *Rhipicephalus sanguineus* pueden estar jugando un rol en la transmisión de la Leishmaniasis visceral canina (2).

La tripanosomiasis americana o también conocida como enfermedad de chagas, es una zoonosis parasitaria, causada por un protozoario, y caracterizada por utilizar dos huéspedes, uno vertebrado (perro) y otro invertebrado (*triatoma*) para completar su ciclo biológico (3); La leishmaniasis es una enfermedad producida por un complejo grupo de protozoos. El ciclo biológico se desarrolla en dos formas evolutivas, uno transmitido por la picadura de un díptero flebótomo (vector) y otra en el hospedador (perros) que en muchas ocasiones actúa como reservorio del parásito (4). De acuerdo con la importancia epidemiológica de los perros en la transmisión de la enfermedad de chagas como reservorios del parásito en las zonas endémicas, es fundamental conocer la prevalencia de la infección, como medida de vigilancia epidemiológica activa, para identificar la circulación del parásito antes de que este infecte a la población humana susceptible (5). Algunos estudios en la Península de Yucatán reportan seroprevalencias de 10.74% (Mérida, Molas y Xcalacoop) y de 21.34% en el Estado de Quintana Roo (Playa del Carmen, Akumal y Xcalac) (6). El agente *Leishmania* spp., se encuentra altamente distribuida en el mundo, delimitada principalmente en zonas tropicales y subtropicales.

La prevalencia en la Península de Yucatán se reporta para *L. braziliensis* (7.52%), *L. infantum* (6.07%) y *L. mexicana* (20.63%) (7), mientras que se reporta 41.4 % para la península en general (8) y 30.2% (9) para la ciudad de Mérida. Las técnicas diagnósticas más empleadas a nivel mundial para la detección de estos agentes son el Ensayo Inmunoenzimático Ligado a Enzimas (ELISA), Inmunofluorescencia Indirecta (IFI) y la Reacción de la Cadena de Polimerasa (PCR). La prueba ELISA Fe-SOD tiene alta sensibilidad para el diagnóstico de Leishmaniasis, puesto que posee una especificidad entre el 99 y 99.7 %; y una sensibilidad entre 96.2 y 100% (7,10,11). El uso de Western Blot se justifica por tener una alta sensibilidad en

Since there is not accurate information regarding the frequency and scope of these diseases in the state of Tabasco, this work aimed to estimate the frequency of *Trypanosoma cruzi* circulating antibodies, *Leishmania mexicana* and *Leishmania braziliensis* in a population of dogs using Fe-SOD ELISA and Western blot diagnostic techniques.

## MATERIALS AND METHODS

**Field of study.** An epidemiological cross-sectional for convenience study was carried out in the canine population of the Chontalpa subregion of the state of Tabasco, Mexico (latitude 17°15'-18°39', longitude 94°00'-94°17'). The climate is tropical, with temperatures of 15-44°C and relative humidity above 90%.

**Sample size.** A sample size of 119 individuals, was calculated for an infinite dog population, with 95% confidence level, an error of 5% and an expected prevalence of 10% (6) using the statistical software WinEpiScope 2.0.

**Blood sampling.** Blood samples were collected during the months of July-August 2013, taking into account, the ethical, technical, scientific and administrative standards of the Autonomous University of Tabasco (UJAT), as well as the consent of the dogs' owners through an informed consent. Before samples were taken, a general physical exam was carried out on each dog along with the identification of skin lesions and general health status. 5 ml of blood were taken of the cephalic vein by puncture using Vacutainer system. The samples were collected in tubes without anticoagulant and refrigerated at 4°C. Then, the samples were centrifuged at 1500 rpm per 10 minutes to obtain the serum. Once the serum was obtained, it was stored at -20°C and subsequently processed at the Faculty of Sciences of the University of Granada, Spain.

**Statistical analysis.** For the analysis of the results descriptive statistics were used and the Kappa value was calculated as well as the sensitivity and specificity for the ELISA test by means of a 2x2 table.

**Laboratory analysis.** For the samples analysis, a parasite culture was carried along with the extraction and purification of the Fe-SOD excreted; subsequently the serological ELISA test and Western blot were performed. Each of these procedures are described below.

**Parasite culture, extraction and purification of the Fe-SOD excreted.** Parasites were cultured in vitro in sterile medium liquid MTL

comparación con ELISA, sin embargo sus valores están en concordancia con los obtenidos con ELISA Fe-SOD, pero posee un costo mayor. (7). Dado que en el Estado de Tabasco la frecuencia y magnitud de estos padecimientos se desconoce, el objetivo del presente trabajo fue determinar la frecuencia de anticuerpos circulantes de *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania mexicana* y *Leishmania braziliensis* en una población de perros mediante las técnicas de diagnóstico de ELISA superóxido dismutasa (Fe-SOD) y Western blot.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Área de estudio.** Se realizó un estudio epidemiológico de corte transversal por conveniencia en la población canina de la subregión Chontalpa del Estado de Tabasco, México (latitud 17°15'-18°39' Norte, longitud 94°00'-94°17' Oeste). El clima es tropical húmedo, con temperaturas de 15-44°C y humedad relativa superior 90%.

**Tamaño de muestra.** Se obtuvo un tamaño de muestra de 119 individuos, calculado para una población canina infinita, con 95% de nivel de confianza, un error del 5% y una prevalencia esperada del 10% (6) utilizando el software estadístico WinepiScope 2.0. 2001.

**Recolección de muestras sanguíneas.** Las muestras fueron colectadas durante los meses de julio-agosto de 2013, considerando las normas éticas, técnicas, científicas y administrativas de la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco (UJAT), así como el consentimiento previo de los propietarios de los animales, mediante un consentimiento informado. A cada animal se le realizó examen físico general previo a la toma de la muestra. Se tomaron 5 ml de sangre por punción de la vena cefálica utilizando el sistema Vacutainer®. Las muestras fueron colectadas en tubos sin anticoagulante y refrigeradas a 4°C. Posteriormente las muestras fueron centrifugadas a 1500 rpm por 10 minutos para la obtención del suero. Una vez obtenido el suero de cada muestra se conservó a -20°C y posteriormente fueron procesados en la Facultad de Ciencias de la Universidad de Granada, España.

**Análisis estadístico.** Para el análisis de resultados se utilizó estadística descriptiva y se calculó el valor Kappa, así como la sensibilidad y especificidad para la prueba de ELISA, mediante una tabla 2x2.

**Análisis de laboratorio.** Para el análisis de las muestras se realizó el cultivo de los parásitos, así como la extracción y purificación de la Fe-SOD excretada, posteriormente se realizaron el test serológico de ELISA y Western Blot. A continuación se describe cada procedimiento.

(Trypanosomes Liquid Medium) supplemented with 10% (v/v) inactivated fetal bovine serum at 56° C/30 minutes. The parasite inoculum at the beginning of the culture was  $5 \times 10^4$  cells/ml in 5 ml of media in Falcon plastic jars of 25 cm<sup>2</sup> and they were kept in an oven at 28°C. The cultures were routinely performed until the needed cell mass for further studies was obtained. The extraction and purification of Fe-SOD was obtained through cultures in exponential growth phase.

Parasites were washed twice through a procedure known as free of serum MTL. The parasites were counted using a hemocytometer and then distributed into aliquots of  $5 \times 10^9$  parasites/ml. Subsequently a second parasite culture through medium MTL was performed without serum for 24 hours, a supernatant was obtained by centrifugation at 1500 xg for 10 minutes, filter after centrifugation was obtained, using a filter of 0.45 microns. The filtrate was washed twice with ammonium sulfate at concentrations of 35% and 85% respectively, then centrifuged at 9000 xg for 20 minutes at 4°C, obtaining a precipitate which was re suspended in 2.5 ml of potassium phosphate 20 mM pH 7.8, 1 mM EDTA as buffer solution. Additionally the precipitate was dialyzed through a Sephadex G-25 (Pharmacia, PD 10), previously equilibrated with buffer solution to a total volume of 2.5 ml of Fe-SOD. Protein content was determined using the Bio-Rad assay, according to the Bradford method (Immunochemicals Sigma, St. Louis), using bovine serum albumin as standard as described by Marin (12). The Fe-SOD obtained was used as antigen in the ELISA and Western Blot for the diagnosis of *T. cruzi*, *L. mexicana* and *L. braziliensis* (8).

**ELISA serological test.** For the ELISA test, polyethylene microtiter plates (Nunc, Denmark) were sensitized with antigen Fe-SOD fraction at a concentration of 1.5 g in carbonate buffer (pH 8.2) for 2 hours at 37°C. Plates were washed 3 times with phosphate buffered saline (PBS), 0.05% tween® 20 (wash buffer) removing unbound antigens. The free adsorption sites were blocked for 2 hours at 37°C using a blocking solution (PBS-Tween 20® at 0.2% bovine serum albumin at 1%). The plate was then incubated for 45 minutes in the presence of dog serum at a dilution of 1:200. After this further washing was performed and it was incubated for 30 minutes at 37°C with immunoconjugate (Anti IgG with peroxidase anti-dog, Sigma Immunochemicals) at a dilution of 1:1000. The enzymatic reaction with the chromogenic substrate was OPD (hydrogen peroxide O-phenylenediamine-Sigma®, Madrid, Spain) and 10 ul of 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

### **Cultivo del parásito, extracción y purificación de la Fe-SOD excretada.**

Los parásitos fueron cultivados *in vitro* en esterilidad en medio líquido MTL (Medium Trypanosomes Liquid) suplementado con un 10% (v/v) suero bovino fetal inactivado a 56°C/30 minutos. El inóculo de parásitos para iniciar el cultivo fue de  $5 \times 10^4$  células/ml en 5 ml de medio en frascos de plástico Falcon de 25 cm<sup>2</sup> y se mantuvieron en una estufa a 28°C. Los cultivos se realizaron de manera rutinaria hasta conseguir la masa celular necesaria para los posteriores estudios. La extracción y purificación de Fe-SOD se obtuvo a través de cultivos en fase de crecimiento exponencial. Los parásitos se lavaron dos veces en un medio conocido como libre de suero MTL.

Los parásitos fueron contados mediante un hematocitómetro y posteriormente distribuidos en alícuotas de  $5 \times 10^9$  parásitos/ml. Posteriormente se realizó un segundo cultivo de parásitos en medio MTL sin suero durante 24 horas, se obtuvo un sobrenadante por centrifugación a 1500 x g durante 10 minutos, se obtuvo un filtrado después de centrifugado, mediante un filtro de 0.45 micras. El filtrado se lavó dos veces con sulfato de amonio en concentraciones de 35% y 85% respectivamente, después fue centrifugado a 9000 x g durante 20 minutos a 4°C, obteniendo un precipitado, el cual fue resuspendido en 2.5 ml de fosfato potásico 20 mM de pH 7.8, 1 mM de EDTA como solución tampón. Adicionalmente el precipitado se dializó a través de una columna de Sephadex G-25 (Pharmacia, PD 10), previamente equilibrada con la solución tampón hasta alcanzar un volumen total de 2.5 ml de Fe-SOD. Se determinó el contenido de proteína utilizando el ensayo Bio - Rad, de acuerdo con el método de Bradford (Immunochemicals Sigma, St. Louis), utilizando albúmina de suero bovino como estándar de acuerdo a lo descrito por Marin (12). El Fe-SOD obtenido se utilizó como antígeno en el ELISA y Western Blot para el diagnóstico de *T. cruzi*, *L. mexicana* y *L. braziliensis* (8).

**Test serológico ELISA.** Para el test de ELISA, se sensibilizaron placas de polietileno de microtitulación (Nunc, Denmark) con la fracción antigénica de Fe-SOD a una concentración de 1.5 g en tampón de carbonato (pH 8.2) durante 2 horas a 37°C. Las placas fueron lavadas 3 veces con solución salina tamponada con fosfato (PBS), tween 20® 0.05% (tampón de lavado) eliminando los antígenos no fijados. Los sitios libres de absorción fueron bloqueados durante 2 horas a 37°C utilizando una solución de bloqueo (PBS-Tween 20® al 0.2%, albúmina de suero bovino al 1%). Posteriormente la placa se incubó durante 45 minutos en presencia de suero de perro a una dilución 1:200. Después de esto se realizó un lavado adicional y se incubó de nuevo durante 30 minutos a 37°C con

per 25 ml for 20 minutes in darkness. The reaction was blocked by adding 50  $\mu$ l of  $\text{HCl}_3\text{N}$ . Absorbance was read at 492 nm in a microplate reader (SunriseTM, TECAN). All samples were tested in triplicate in microtiter plates. The median and standard deviation (SD) of optical density of the negative control sera (belonging to the faculty of the University of Granada, Spain) were used to calculate the cutoff value (mean +3xSD) according to the technique suggested by ongoni (8).

**Western blot analysis.** The fraction of Fe-SOD antigen (concentration of 1.5  $\mu$ g of protein) of *T. cruzi*, *L. mexicana* and *L. braziliensis*, was merged with IEF 3-9 gels and subsequently transferred to nitrocellulose for 20 minutes, as described in the Phast system manual. The membrane was blocked for two hours at room temperature using 0.4% gelatin and 0.2% Tween 20 in PBS, followed by three washes in 0.1% Tween 20 in PBS (PBS-T), subsequently they were incubated for two hours at room temperature with dog sera in a dilution of 1:100. Before the washing, the membrane was incubated for two hours mass room temperature with the second antibody, anti-dog immunoglobulin G conjugated with peroxidase (Sigma Immunochemicals; dilution 1/1000. The latter was washed with diaminobenzidine substrate (0.5 mg/ml in Tris buffer/HCl 0.1M pH 7.4 containing  $\text{H}_2\text{O}_2$  1/5000 [10 v/v]) and was added to the reaction, which was stopped with a number of washings with distilled water according to the technique suggested by Marin et al (13).

## RESULTS

The frequency of seropositive dogs by ELISA (Fe-SOD) was 6.7, 15.1 and 14.2 for *T. cruzi*, *L. mexicana* and *L. braziliensis* respectively; while the frequency of seropositive dogs by Western blot was 3.4, 9.2 and 10.1 for *T. cruzi*, *L. mexicana* and *L. braziliensis* respectively (Table 1).

**Table 1.** Sera of dogs positive to *T. cruzi*, *L. mexicana* and *L. braziliensis* using the ELISA and Western blot-sod tests, carried out in the Chontalpa subregion of Tabasco, Mexico.

Antigen	Elisa - SOD	Frequency	Western Blot	Frequency
<i>Trypanosoma cruzi</i>	8	6.7%	4	3.4 %
<i>L. mexicana</i>	18	15 %	11	9.2 %
<i>L. braziliensis</i>	17	14.2%	12	10.1%
Total serum	119			

inmunoconjugante (Anti IgG con peroxidasa anti-perro, Sigma Immunochemicals), a una dilución de 1:1000. La reacción enzimática, cromogénico se hizo con el sustrato OPD (peróxido de hidrógeno O-fenilendiamina-Sigma®, Madrid, España) y 10  $\mu$ l de  $\text{H}_2\text{O}_2$  al 30% por cada 25 ml durante 20 minutos en oscuridad. La reacción se bloqueó mediante la adición de 50 $\mu$ l de  $\text{HCl}_3\text{N}$ . La absorbancia se leyó a 492 nm en un lector de microplacas (SunriseTM, TECAN). Todas las muestras se analizaron por triplicado en placas de microtitulación. La mediana y desviación estándar (SD) de la densidad óptica de los sueros de control negativo (pertenecientes a la Facultad de Ciencias de la Universidad de Granada, España) se utilizaron para calcular el valor de corte (mediana +3xSD) de acuerdo con la técnica sugerida por Longoni (8).

**Análisis de Western blot.** La fracción de antígeno Fe-SOD (concentración de 1.5  $\mu$ g de proteína) de *T. cruzi*, *L. mexicana* y *L. braziliensis*, se fusionó con IEF 3-9 geles y posteriormente se transfirieron a nitrocelulosa durante 20 minutos, como se describe en el manual del sistema Phast. La membrana se bloqueó durante dos horas a temperatura ambiente usando 0.4% de gelatina y 0.2% de Tween 20 en PBS, seguido de tres lavados en 0.1% de Tween 20 en PBS (PBS-T), posteriormente se incubaron durante dos horas a temperatura ambiente con sueros de perro en una dilución de 1:100. Previo al lavado, la membrana se incubó durante dos horas más a temperatura ambiente con el segundo anticuerpo, anti-perro de inmunoglobulina G conjugada con peroxidasa (Sigma Immunochemicals; dilución 1/1000). Esta última se lavó con sustrato Diaminobenzidina (0.5 mg/ml en un tampón de Tris/HCl 0.1 M, pH 7.4 que contiene 1/5000  $\text{H}_2\text{O}_2$  [10 v/v]) y se añadió a la reacción, que se detuvo con una serie de lavados con agua destilada de acuerdo a la técnica sugerida por Marín et al (13).

## RESULTADOS

La frecuencia de perros seropositivos mediante ELISA (Fe-sod) fue 6.7, 15.1 y 14.2 para *T. cruzi*, *L. mexicana* y *L. braziliensis* respectivamente; mientras que la frecuencia de perros seropositivos mediante Western blot fue 3.4, 9.2 y 10.1 para *T. cruzi*, *L. mexicana* y *L. braziliensis* respectivamente (Tabla 1). En la tabla 2 se presentan los resultados del análisis de fiabilidad de la prueba de ELISA (Fe-sod) para la detección de anticuerpos de *T. cruzi*, *L. mexicana* y *L. braziliensis*, presentando valores Kappa de 0.65, 0.71 y 0.68 respectivamente.



Table 2 shows the results of reliability analysis of the ELISA test (Fe-SOD) for the detection of *T. cruzi* antibodies, *L. mexicana* and *L. braziliensis* present presenting Kappa values of 0.65, 0.71 and 0.68 respectively .

**Table 2.** Reliability indices of the diagnostic test (ELISA) using Fe-SOD fraction of *T. cruzi*, *L. mexicana*, *L. braziliensis* in sera from dogs of the Chontalpa subregion of Tabasco, Mexico.

	<i>T. cruzi</i>	<i>L. mexicana</i>	<i>L. braziliensis</i>
Sensitivity	100%	100%	100%
Specificity	96.5%	89.1%	88.2%
Negative predictive value	100%	100%	100%
Kappa Value	0.65	0.71	0.68

## DISCUSSION

In the present study the frequency of antibodies to *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania mexicana* and *L. braziliensis* was lower than previously reported in the Yucatan Peninsula (9) (Table 1), and the State of Morelos (14); as well as studies in Latin American countries like Paraguay and Colombia (15). The prevalence found in this study may be related to factors such as: a) changes in the environment, b) presence of jungle-peridomestic wildlife, c) Actions of prevention – control of the vector, d) the diversity and abundance of vectors related with the disease (influenced by environmental conditions of the geographical area), e) the socioeconomic conditions of the study area (urban vs. rural; in rural areas high prevalences have been reported 29.9%, due to close contact with areas of forest, favoring the interaction of animals like dogs and farm animals, with triatomine at certain seasons of the year); f) Age of the animals (As age of dogs increases the prevalence increases); and g) The handling of pets in urban vs. rural areas, in rural areas the dogs are released, providing that come into contact with vectors. The condition of freedom for dogs, allow dogs to remain in surrounding areas to the Household, in those areas higher collections and diversity of triatomine collections have been reported, giving as a result higher serological frequency in dogs (16-19).

Monitoring of diseases such as Trypanosomiasis and Leishmaniasis in pets, is of great importance (16), as animals like dogs, act as reservoirs of the parasite in endemic areas, and it is necessary to identify the movement of agents in order to prevent possible infection in humans (4). Pets like dogs, cats and rodents, presented high prevalence of *T. cruzi*; according to some studies, the presence of dogs in homes increases the risk of infection for the

## DISCUSIÓN

En el presente estudio la frecuencia de anticuerpos para *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania Mexicana* y *L. braziliensis* fue menor a lo previamente reportado en la península de Yucatán (9) (Tabla 1), y el estado de Morelos (14); así como estudios realizados en países de América latina como Paraguay y Colombia (15). La prevalencia encontrada en el presente estudio puede estar relacionada con factores como: a) modificaciones en el medio ambiente, b) presencia de fauna selvática-peridoméstica, c) acciones de previsión-control de vectores, d) la diversidad y abundancia de vectores relacionados con la enfermedad (influenciada por las condiciones ambientales de la zona geográfica), e) las condiciones socioeconómicas del área de estudio (urbanas vs rurales; En las zonas rurales se encuentran prevalencias altas 29.9%, debido al contacto cercano con áreas de selva, favoreciendo la interacción de animales como los perros y animales de producción, con los triatominos en ciertas épocas del año); f) La edad de los animales (conforme la edad de los perros se incrementa la prevalencia aumenta); y g) El manejo de las mascotas en las zonas rurales vs urbanas, en las zonas rurales los perros se encuentran en libertad, facilitando que entren en contacto con los vectores. La condición de libertad para los perros, favorece que permanezcan en áreas aledañas al domicilio, y es en éstas áreas donde se han reportado las mayores colectas y diversidad de triatominos, dando como consecuencia mayor frecuencia serológica en perros (16-19).

El monitoreo de las enfermedades como la Trypanosomiasis y Leishmaniasis en mascotas, es de gran importancia (16), ya que animales como los perros, fungen como reservorios del parásito en las zonas endémicas, y es necesario identificar la circulación de los agentes para evitar la posible infección en humanos (4). Animales domésticos como los perros, gatos y roedores, han presentado altas prevalencias de *T. cruzi*; de acuerdo con algunos estudios, la presencia de perros en las viviendas incrementa el riesgo de infección para la población humana de 3 a 5 veces (20, 21). En estados como el Estado de México, Puebla y Morelos se ha reportado una correlación de seropositividad entre humanos (7, 4 y 1.2%) y perros (21, 10 y 24.2%) respectivamente; de acuerdo con dichos resultados, la presencia de perros en las viviendas representa un factor de riesgo para adquirir la enfermedad de chagas (20). Estudios realizados en el Estado de Quintana Roo, México señalan que el diagnóstico frecuente de leishmaniasis canina, puede relacionarse con

human population of 3 to 5 times (20,21). In states such as the State of Mexico, Puebla and Morelos has reported a correlation of seropositivity among humans (7, 4 and 1.2%) and dogs (21, 10 and 24.2%) respectively; according to these results, the presence of dogs in homes represents a risk factor for acquiring Chagas disease (20). Studies in the State of Quintana Roo, Mexico indicate that frequent diagnosis of canine leishmaniasis, may be related to increases in the presentation of the disease in infected pet owners (8,17). Most pets living with the human population, shows a connection between urban - rural and peridomestic, bringing along several repercussions on public health (22). Therefore, the use of specific tests for the monitoring and control of diseases such as Trypanosomiasis and Leishmaniasis, is very important; in this study, Western blot test showed values of 100% sensitivity and specificity for *T. cruzi*, *L. mexicana* and *L. braziliensis*, compared to ELISA (Table 2), however, considering the low cost and easy reproducibility of the ELISA test, should be considered as a viable option for the development of monitoring and control programs in endemic areas Trypanosomiasis and Leishmaniasis tool. In conclusion, there are circulating antibodies to *T. cruzi*, *L. mexicana* and *L. braziliensis* in dogs from Chontalpa region of the State of Tabasco, Mexico. The frequency of antibodies to *T. cruzi*, *L. mexicana* and *L. braziliensis* in dogs Chontalpa region of the State of Tabasco, is lower than reported by other authors for the Mexican southeast and Latin America. It is suggested to conduct epidemiological studies on population dynamics and diversity of vectors in the study area, in order to design effective control plans for *T. cruzi*, *L. mexicana* and *L. braziliensis* in dogs.

incrementos en la presentación de la enfermedad en los propietarios de las mascotas infectadas (8,17). La mayor convivencia de los animales domésticos con la población humana, demuestra una conexión entre el medio urbano - rural y peridoméstico, trayendo consigo diversas repercusiones en salud pública (22). Por lo anterior, el uso de pruebas específicas para el monitoreo y control de las enfermedades como la Trypanosomiasis y Leishmaniasis, es de gran importancia; en el presente estudio, la prueba de Western blot presentó valores de 100% de sensibilidad y especificidad para *T. cruzi*, *L. Mexicana* y *L. Brasiliensis*, en comparación con la ELISA (Tabla 2), sin embargo, considerando el bajo costo y fácil reproducibilidad de la prueba de ELISA, debe considerarse como una herramienta viable para el desarrollo de programas de control y monitoreo en zonas endémicas de Trypanosomiasis y Leishmaniasis. En conclusión, existen anticuerpos circulantes para *T. cruzi*, *L. Mexicana* y *L. braziliensis* en perros de la región Chontalpa del Estado de Tabasco, México. La frecuencia de anticuerpos para *T. cruzi*, *L. Mexicana* y *L. Braziliensis* en perros de la región Chontalpa del Estado de Tabasco, es menor a lo reportado por otros autores para el sureste Mexicano y Latinoamérica. Se sugiere realizar estudios epidemiológicos sobre la dinámica poblacional y diversidad de los vectores en la zona de estudio, para diseñar planes de control efectivos para *T. cruzi*, *L. mexicana* y *L. braziliensis* en perros.

## REFERENCIAS

1. Gradoni L. Canine Leishmania vaccines: still a long way to go. *Vet Parasitol* 2015; 208(1-2):94-100.
2. Araúz-Viol M, Guerrero DF, Miranda de Oliveira BC, Hudson Loila S, Dias de Melo G, et al. Identification of *Leishmania* spp. Promastigotes in the intestines, ovaries, and salivary glands of *Rhipicephalus sanguineus* actively infesting dogs. *Parasitol Res* 2016; 115(9):3479-3484.
3. Araujo CA, Costa AP, Silva IWG, Matos NNVG, Dantas ACS et al. Epidemiological aspects and risk factors for infection by *Leishmania infantum* chagasi in dogs from municipality of Petronila, Northeastern Brazil. *Vet Parasitol* 2016; 3:41-48.
4. Meneses JA, Ferreira EDC, Andrade-Filho JD, Sousa AMD, Morais MHG, et al. An integrated approach using spatial analysis to study the risk factors for Leishmaniasis in area of recent transmission. *Biomed Res Int* 2015; 1.
5. Esch KJ, Petersen CA. Transmission and epidemiology of zoonotic protozoal diseases of companion animals. *Clin Microbiol Rev* 2013; 26(1):58-85.
6. Lopez CA, Longoni SS, Sauri ACH, Rodriguez VRI, Villegas N, Escobedo OJ, et al. Seroprevalence of antibodies against the excreted antigen superoxide dismutase by *Trypanosoma cruzi* in dogs from the Yucatan peninsula (México). *Zoonoses Public Health* 2013; 60(4):277-283.

7. Lopez CA, Longoni SS, Sauri-Arceo CH, Sanchez MM, Rodríguez-Vivas R, Escobedo-Ortegón J, et al. Leishmania spp. Epidemiology of canine Leishmaniasis in the Yucatan Peninsula. *Scientific World Journal* 2012; 2012: 1-10
8. Longoni SS, Marín C, Sauri-Arceo C, López-Céspedes A, Rodríguez-Vivas R, Villegas N et al. An Iron-Superoxide Dismutase Antigen-Based Serological Screening of Dogs Indicates Their Potential Role in the Transmission of Cutaneous Leishmaniasis and Trypanosomiasis in Yucatan, Mexico. *Vector-Borne Zoonotic Dis* 2011; 11(7):815-821.
9. Arjona-Jiménez G, Villegas N, López-Céspedes Á, Marín C, Longoni S, Bolio-González M et al. Prevalence of antibodies against three species of Leishmania (*L. mexicana*, *L. braziliensis*, *L. infantum*) and possible associated factors in dogs from Mérida, Yucatán, Mexico. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2012; 106(4):252-258.
10. Marin C, Sánchez-Moreno M. The Trypanosomiasis diagnosis: a review on the role of the superoxide dismutase as molecular marker. *Curr Res Microbiol* 2009; 1:1-12.
11. Reyes L, Silesky E, Cerdas C, Chinchilla M, Guerrero O. Presencia de Anticuerpos contra *Trypanosoma cruzi* en perros de Costa Rica. *Parasitol Latinoam* 2002; 57(1-2):66-68.
12. Marín C, Longoni SS, Urbano J, Minaya G., Mateo H, de Diego J, Rosales MJ, Pérez-Cordón G, Romero Sánchez-Moreno M. Enzyme-linked immunosorbent assay for superoxide dismutase-excreted antigen in diagnosis of sylvatic and Andean cutaneous Leishmaniasis of Peru. *Am J Trop Med Hyg* 2009; 80(1):55-60.
13. Marín C, Longoni SS, Mateo H, de Diego J, Alunda J, Minaya G et al. The use of an excreted superoxide dismutase in an ELISA and Western blotting for the diagnosis of Leishmania (*Leishmania*) infantum naturally infected dogs. *Parasitol Rev* 2007; 101(3):801-808.
14. Portugal GC, Garcia VZ, Monteón PV, Chávez LV, Olanmendi PM, Ramos C. Anticuerpos contra *Trypanosoma cruzi* en humanos y perros y presencia del parásito en *Meccus pallidipennis* en la localidad de Puente Pantitlán, Morelos, México. *Rev Biomed* 2011; 22(3):67-75.
15. Fernández J, Charry T, Bello F, Escobar J, Lozano C, Ayala M et al. Prevalencia de Leishmaniosis visceral canina en municipios de Huila Colombia. *Rev Salud Pública* 2002; 4:278-285.
16. Cruz-Chan JV, Aguilar – Cetina AC, Villanueva – Lizama LE, Martínez – Vega PP, Ramírez – Sierra MJ, et al. A canine model of experimental infection with *Leishmania (L.) mexicana*. *Parasites & Vectors* 2014; 7:361.
17. Sánchez-García L, Berzunza-Cruz M, Becker-Fausser I, Rebollar-Tellez E. Sand flies naturally infected by *Leishmania (L.) mexicana* in the peri-urban area of Chetumal city, Quintana Roo, Mexico. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2010; 104(6):406-411.
18. Gutiérrez Vázquez J. Factores de riesgo ambientales en la transmisión de la leishmaniosis cutánea en una zona endémica del Estado de Tabasco. *Horizonte sanitario* 2014; 13(2):194-200.
19. Carrillo – Peraza JR, Manrique – Saide JC, Rodríguez – Buenfil JC, Escobedo – Ortegón JF, Rodríguez – Vivas RI et al. (2014) Estudio serológico de la tripanosomiasis americana y factores asociados en una comunidad rural de Yucatán, México. *Arch Med Vet* 2014; (46): 5-81.
20. Carabarin – Lima A, González – Vázquez MC, Rodríguez – Morales O, Baylón – Pacheco L., Rosales – Encina J.L., et al. Chagas disease (American trypanosomiasis) in Mexico: An update. *Acta Trop* 2013; 127:126-135.
21. Manrique – Abril D, Manrique – Abril F, Lorca HM, Ospina DJ. Prevalencia de anticuerpos para *Trypanosoma cruzi* en caninos de dos municipios endémicos de Boyacá. *Rev MVZ Cordoboa* 2012; 17(1):2916-2923.
22. Otranto D, Capelli G, Genchi C. Changing distribution patterns of canine vector borne diseases in Italy: leishmaniosis vs. dirofilariosis. *Parasites Vectors* 2009; 2(Suppl 1):S2.