

R. Fisa
M. Portús
M. Gállego
D. Valls
M.J. Aisa

Laboratori de Parasitologia, Facultat de Farmacia,
Avda. Diagonal, s/n 08028 Barcelona

El diagnóstico serológico de la leishmaniosis canina en la comarca del Priorat (Tarragona).

33

RESUMEN

Se investiga la presencia de anticuerpos anti-*Leishmania* mediante una técnica de «Dot-ELISA» en 1.328 muestras de sangre procedentes de 902 perros de la comarca del Priorat (Cataluña), importante foco de leishmaniosis canina. El umbral de positividad para la mencionada técnica (1/800) se establece a partir de los datos obtenidos al realizar en paralelo cultivo y serología.

Los resultados serológicos obtenidos permiten observar una tasa de prevalencia de la infección de 10,2 %. Tan sólo el 49,8 % de los sueros estudiados son totalmente negativos. Al 40 % restante se le detecta anticuerpos anti-*Leishmania* a títulos inferiores al umbral establecido cuyo posible significado se discute.

PALABRAS CLAVE

Leishmaniosis; Perro; Diagnóstico serológico.

SUMMARY

The presence of anti-Leishmania antibodies is studied in 1328 blood samples from 902 dogs from the Priorat region (Catalonia), an important focus of canine leishmaniosis, by a Dot-ELISA technique. The cut-off (1/800) is established through the data obtained by serology and culture in parallel.

The prevalence of seropositives observed was 10,2 %. Only 49,8 % of sera were completely negative. The remaining 40 % had anti-Leishmania antibodies at titres below the cut-off, the possible significance of which is discussed.

KEY WORDS

Leishmaniosis; Dog; Serologic diagnostic.

INTRODUCCIÓN

La leishmaniosis canina es una enfermedad presente con elevada prevalencia en nuestro entorno. Estudios realizados durante los últimos años en distintos puntos de la geografía catalana han mostrado que los índices de seroprevalencia son muy diversos en las distintas zonas^(5 y 13). Ello es comprensible si tenemos en cuenta que las leishmaniosis evolucionan en focos naturales, limitados geográficamente y climatológicamente, donde *Leishmania* es capaz de circular gracias a la presencia de los elementos necesarios para seguir su ciclo biológico, el vector (*Phlebotomus* sp.) y el reservorio (cánidos).

En nuestras latitudes, el perro es considerado el reservorio principal del parásito, a pesar de que otros animales pueden también, ocasionalmente, hallarse parasitados por *Leishmania* (zorros, ratas)^(7, 10 y 14). El hombre se considera que entra en la cadena epidemiológica de modo accidental.

El diagnóstico serológico de la leishmaniosis canina es en la actualidad una importante herramienta:

- a) en estudios epidemiológicos, para valorar el alcance de la enzootia canina, en los que se necesita de técnicas de cribado de ejecución sencilla.
- b) en clínica veterinaria, dada la notable diversidad en el cuadro clínico que presentan los animales leishmaniósicos, la poca sensibilidad de las técnicas de examen directo y la dificultad de realizar técnicas de cultivo en la mayor parte de las consultas veterinarias.

Al igual que para la mayoría de enfermedades infecciosas, las pruebas serológicas para el diagnóstico de una leishmaniosis pueden dar lugar a falsas interpretaciones, debidas tanto a respuestas humorales anormales del hospedador como a problemas inherentes al método serológico que se está empleando, intrínsecos de la técnica o derivados de los reactivos utilizados (antígeno, conjugado, substrato, etc).

En este trabajo se exponen los resultados serológicos obtenidos en el transcurso de las encuestas caninas realizadas en la comarca del Priorat (Tarragona), importante foco de leishmaniosis canina, y su valoración dentro de su contexto clínico-epidemiológico.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se han estudiado 902 perros, entre los años 1987-1990, que procedían de 26 localidades de la comarca del Priorat (Tarragona).

Las extracciones de sangre se realizaron en el transcurso de las campañas de vacunación anti-rábica, que se efectúan habitualmente en primavera y principios de verano. Se tomó muestra de todos los animales que acudieron a la misma con excepción de los nacidos durante el invierno o de aquellos otros para los que el dueño no autorizó la extracción.

Ello ha supuesto el análisis serológico de 1.328 muestras de sangre, ya que de algunos animales se realizaron diversos controles en el tiempo para seguir su evolución. Las muestras de sangre se recogieron sobre papel de filtro (Whatman 3) por la facilidad que representa tanto para la toma de muestra, como para su posterior traslado y almacenaje, siendo los resultados totalmente comparables a los obtenidos con muestras de suero^(6 y 16).

Paralelamente a la toma de muestras se realizó un examen clínico, visual, del animal, anotando en la ficha correspondiente, junto a los datos de filiación, las observaciones patológicas realizadas (lesiones cutáneas, descamación, pérdida de pelo, conjuntivitis, onicogriposis, delgadez, etc) o aquellos que relataba el dueño (astenia, anorexia, etc). En base a dichos datos, y siguiendo el criterio de Mancianti y col⁽⁹⁾ se agruparon los animales en asintomáticos, oligosintomáticos y sintomáticos.

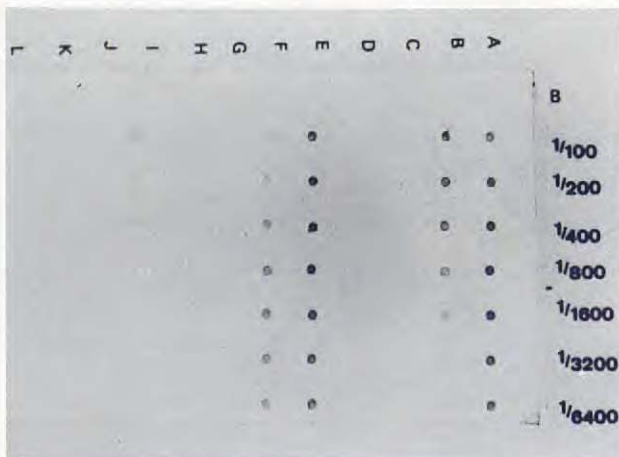
La prueba serológica utilizada ha sido el «Dot-ELISA», descrito y estandarizado inicialmente por Pappas y col⁽¹²⁾ para el diagnóstico de la leishmaniosis visceral en el Viejo Mundo. Es una técnica inmunoenzimática, de lectura visual, que precisa pequeños volúmenes de antígeno fijados sobre una membrana de nitrocelulosa y un substrato cromogénico precipitable. La técnica ha sido objeto de diversas modificaciones por nuestra parte y adaptada al estudio del reservorio canino utilizando como antígeno una suspensión de promastigotes de la cepa de *L. infantum* autóctona, aislada en perro, MCAN/ES/84/BCN-3 ZMON-1 y como conjugado la Proteína-A unida al enzima peroxidasa, capaz de unirse con gran afinidad a las in-

R. Fisa
M. Portús
M. Gallego
D. Valls
M.J. Aisa

El diagnóstico serológico de la leishmaniosis canina en la comarca del Priorat (Tarragona).

- Fijación del antígeno a la nitrocelulosa. Gotas de 1 μ l de una suspensión de promastigotes a una concentración de 10^8 /ml en PBS (tampón fosfato pH: 7,2) formol 1,5 %.
- Bloqueo de la placa con TS (Tris-salino pH: 7,6)-leche descremada 5 %. (Las membranas sensibilizadas pueden guardarse congeladas a -40° C).
- Incubación de la muestra (suero o sangre eluida) a las diluciones de trabajo 1/100, 1/200,... en TST (Trissalino-Tween 20 al 0,05 %)-leche descremada 1 %. 30 min a 37° C. Tres lavados de la membrana en TST, un lavado en TS.
- Incubación del conjugado-Proteína A-peroxidasa (Sigma) al 1/2000 en TST-leche descremada 1 %. 30 min a 37° C. Tres lavados en TST y un lavado en TS.
- Revelado con 4 cloro-1-naftol (Merck).

Tabla I. Pauta de trabajo para la técnica «Dot-ELISA»



Gráfica 1. Placa «Dot-ELISA» revelada.

munoglobulinas de tipo IgG del perro⁽¹⁷⁾. (Tabla I, Gráfica 1).

El diagnóstico etiológico se ha realizado, generalmente, en animales con títulos elevados de anticuerpos o con sintomatología sospechosa, para confirmar la parasitación. Se ha basado en el examen directo y en el cultivo, en medio NNN, de muestras tomadas de ganglio poplíteo.

La prevalencia de la enfermedad en la comarca se ha calculado teniendo en cuenta los resultados se-

rológicos hallados durante los años 1988-1989-1990 (1.169 sueros estudiados), donde se engloban la mayor parte de los animales estudiados, ya que se acepta que los focos de leishmaniosis canina permanecen constantes durante largo tiempo^(3 y 8). De aquellos animales en los que, por una u otra causa, se realizó más de una determinación serológica en un mismo año tan sólo se tuvo en cuenta la que dio el título más elevado. Se omitieron, para el cálculo de la prevalencia, los sueros obtenidos de perros seleccionados en función de los resultados serológicos obtenidos con anterioridad.

RESULTADOS

En la Tabla II se indica la relación existente entre los tres parámetros estudiados: resultados serológicos «Dot-ELISA», expresados en títulos, sintomatología que presentaba el animal en el momento del análisis y resultados de los cultivos ganglionares. La tabla resume los datos obtenidos de cada perro, durante los diversos años, considerándolos como independientes.

La frecuencia de aislamientos de *Leishmania* de muestras tomadas de ganglio poplíteo se ha mantenido prácticamente constante a títulos $\geq 1/800$, oscilando alrededor del 50 % de positividad, sin observarse incrementos importantes al aumentar el título serológico e independientemente de la sintomatología que presentase el animal. Destaca el 12 % de positividad hallado en animales con título serológico 1/400 y el porcentaje nulo de positividad hallado entre los animales con título $= < 1/200$.

Por ello se ha considerado como título diagnóstico (título inferior que detecta una leishmaniosis evolutiva) el título 1/800, aceptando la pérdida de un bajo número de positivos a títulos inferiores, con especial importancia a 1/400.

En la Tabla III se indican las frecuencias de los títulos serológicos obtenidos en la comarca. Puede observarse que se detecta un 10,2 % de animales seropositivos con título $\geq 1/800$, que representa la prevalencia hallada en la comarca, junto a un 40 % de animales con serologías bajas y un 49,8 % de animales seronegativos.

Títulos «Dot-ELISA»	Sintomatología						Total		
	0		+		++		N	C/cul.	%
	Nº	C/cul.	Nº	C/cul.	Nº	C/cul.			
neg	560	0/3	39	0/1	5	0/0	604	0/4	0
1/100	247	0/5	31	0/3	8	0/0	286	0/8	0
1/200	141	0/6	28	0/5	8	0/3	177	0/14	0
1/400	59	2/5	34	0/14	12	1/6	105	3/25	12
1/800	29	1/2	32	3/12	16	4/6	77	8/20	40
1/1600	7	0/1	8	2/4	15	6/8	30	8/13	62
1/3200	3	1/1	8	2/3	8	1/4	19	4/8	50
>=1/6400	8	1/2	6	1/3	16	6/10	30	8/15	53
Totales	1.054	5/25	186	8/45	88	18/37	1.328	31/107	

Nº: número de perros; C/cul.: cepas de *Leishmania* aisladas/cultivos ganglionares realizados; 0: asintomático; +: oligosintomático; ++: sintomático; %: frecuencia de aislamientos.

Tabla II. Resultados serológicos «Dot-ELISA», sintomatología y resultados de los cultivos

«Dot-ELISA» (título)	neg	1/100	1/200	1/400	1/800	1/1600	1/3200	>1/6400
Nº sueros (1.169)	582	257	149	62	51	27	15	26
Frecuencia (%)	49,8	22	12,7	5,3	4,4	2,3	1,3	2,2

Tabla III. Títulos de anticuerpos anti-*Leishmania* obtenidos en el Priorat. Tabla de frecuencias

DISCUSIÓN

El «Dot-ELISA» se ha mostrado como una técnica sensible al aceptar como título diagnóstico el valor 1/800 (sensibilidad 90,3 %). Su especificidad es totalmente comparable a la estimada para la inmunofluorescencia indirecta (IFI), técnica ampliamente utilizada y estandarizada para el estudio de la leishmaniosis canina y humana^(7 y 8), lo cual convierte al Dot-ELISA en un instrumento diagnóstico muy útil dada su facilidad de ejecución.

La técnica ha permitido realizar el cribado serológico de un gran número de animales, que ha puesto de manifiesto la importancia real de la enfermedad en la zona estudiada (seroprevalencia: 10,2 %). Destaca el bajo porcentaje de animales sintomáticos detectado entre los animales afectados (35 %), junto a un porcentaje elevado (65 %) de animales oligosintomáticos y asintomáticos.

Resalta, además, el elevado porcentaje (40 %) de animales con títulos serológicos bajos que no alcanzan el umbral diagnóstico. Estos valores no

han sido hallados en otros lugares, donde la leishmaniosis no es una enfermedad endémica, utilizando la misma técnica serológica. En efecto, en la isla de Menorca, donde la totalidad de perros leishmaniósicos detectados procedían de otras islas de las Baleares o de lugares de la Península Ibérica donde la enfermedad es endémica, tan sólo se obtuvo 1-2 % de animales con títulos que no alcanzaban el umbral de positividad⁽¹⁵⁾. Algo parecido ocurre en la ciudad de Barcelona donde de 146 animales recogidos por el Servicio de Zoonosis Municipal tan sólo 5 dieron serología dudosa⁽⁵⁾. Debe señalarse en este caso que, aun cuando el área de Barcelona constituye un importante foco endémico de leishmaniosis, la enfermedad no alcanza el centro urbano por no darse en él las condiciones ecológicas necesarias para la supervivencia de los flebotomos y, por lo tanto, para la transmisión y mantenimiento del ciclo del parásito. Estos resultados serológicos con títulos dudosos, poco significativos de una leishmaniosis evolutiva, en cambio, parecen frecuentes en los focos activos de la enfermedad^(1 y 2). Pueden corresponder

a animales que se hallan en la fase prepatente de la infección, a los infectados que desarrollan una mala respuesta humoral, a aquellos que presentan títulos de recuerdo de una leishmaniosis auto-limitada y aquellos otros con tasas bajas de anticuerpos producidos como consecuencia de inoculaciones repetidas de promastigotes por parte de los flebotomos sin que lograra asentarse una infección verdadera. El seguimiento temporal de dichos animales ha permitido comprobar que entre un 10-20 % de ellos desarrollan una leishmaniosis patente y realizan una seroconversión, quedando en los demás la tasa de anticuerpos más o menos estable en el tiempo⁽⁶⁾.

Por todo ello consideramos que la técnica sero-

El diagnóstico serológico de la leishmaniosis canina en la comarca del Priorat (Tarragona).

lógica descrita, «Dot-ELISA», es un instrumento sumamente eficaz para realizar un diagnóstico rápido, sencillo y específico, máxime cuando los valores hallados son títulos extremos. Como en toda técnica serológica debe, por otro lado, valorarse con extrema cautela los títulos intermedios, en cuya interpretación deberá tenerse siempre en cuenta la clínica y la epidemiología.

Agradecimientos

Los autores desean agradecer la inestimable colaboración prestada por todos los habitantes de la comarca del Priorat y muy especialmente la de sus veterinarios, sin la cual el trabajo no habría podido realizarse. El estudio ha sido subvencionado por la CICYT a través de los proyectos PB86-0546 y SAL-90-0960-CO2. Parte del trabajo se ha beneficiado también de una ayuda de la CEE, a través del contrato TS2M-0058-F.

BIBLIOGRAFÍA

1. Abranches, P., Lopes, F.J., Silva, F.M.C., Ribeiro, M.M.S., Pires, C.A. Le kala-azar au Portugal. III. Résultats d'une enquête sur la leishmaniose canine réalisée dans les environs de Lisbonne. Comparaison des zones urbaines et rurales. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.* 58(4): 307-315, 1983.
2. Acedo Sánchez, C., Morillas Márquez, F., Martín Sánchez, J., Sánchez Marín, M.C. Leishmaniosis canina en el medio urbano del sur de España. Resumen I Cong. Inter. Asoc. Sudoc. Europ. Parasitol., Valencia, 309, 1991.
3. Bettini, S., Gradoni, L. Canine leishmaniasis in the Mediterranean area and its implications for human leishmaniasis. *Ins. Sc. Applic.* 7(2): 241-245, 1986.
4. Botet, J. Los *Phebotomidae* (Insecta, Diptera) de Barcelona en tanto que vectores de *Leishmania Ross*, 1903. Contribución a su conocimiento. Tesis Doctoral, Fac. Farmacia, Univ. Barcelona, 31 Opp, 1991.
5. Botet, J., Serra, T., Portus, M., Mora, R., Gallego, M. Incidencia de la leishmaniosis en el área de Barcelona. *Rev. Ibér. Parasitol.* Vol. Extra. 51-55, 1987.
6. Fisa, R. Estudios sobre la estructura y dinámica del foco de leishmaniosis del Priorat (Catalunya). Tesis Doctoral, Fac. Farmacia, Univ. Barcelona, 289, 1992.
7. Gradoni, L., Pozio, E., Gramiccia, M., Maroli, M., Bettini, S. Leishmaniasis in Tuscany (Italy): VII. Studies on the role of the black rat, *Rattus rattus*, in the epidemiology of visceral leishmaniasis. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 77(4): 427-431, 1983.
8. Lanotte G. Le foyer de leishmaniosis viscerale des Cévennes. Limites et structures. Essai méthodologique. Tesis Doctoral, Fac. Med., Univ. Montpellier, 269, 1975.
9. Mancianti, E., Gramiccia, M., Gradoni, L., Pieri, S. Studies on canine leishmaniasis control. 1. Evolution of infection of different clinical forms of canine leishmaniasis following antimonial treatment. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 82(4): 566-567, 1988.
10. Marín Iniesta, F., Marín Iniesta, E., Martín Luengo, F. Papel de perros y zorros como reservorio de leishmaniosis en la población murciana. Resultados preliminares. *Rev. Ibér. Parasitol.* 42(3): 307-313, 1982.
11. Morillas Márquez, F., Benavides Delgado, I., González Castro, J., Reyes Magaña, A., Valero López, A. Découverte de *Leishmania* sp. dans des *Rattus rattus* de la province de Granaide (Espagne). *Ann. Parasitol. Hum. Comp.* 60(6): 768-770, 1985.
12. Pappas, M.G., Hajkowski, R., Diggs, C.L., Hockmeyer, W.T. Development of an antigen conservative enzyme immunoassay (dot-ELISA) for the rapid diagnosis of visceral leishmaniasis. (Correspondence). *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 77(3): 425-426, 1983.
13. Portus, M., Fisa, R., Serra, R., Gallego, M., Mora, R. Estudios seroepidemiológicos sobre la leishmaniosis canina en Cataluña. *Med. Vet.* 4(11): 44-48, 1987.
14. Rioux, J.A., Albaret, J.L., Houin, J.P., Dedet, J.P., Lanotte, G. Ecologie des leishmaniasis dans le sud de la France 2. Les réservoirs selvatiques. Infestation spontanée du Renard (*Vulpes vulpes* L.). *Ann. Parasitol. Hum. Comp.* 43(4): 421-428, 1968.
15. Seguí, M.G. Estudio epidemiológico de la leishmaniosis en la isla de Menorca. Tesis Doctoral, Fac. Farmacia, Univ. Barcelona, 289, 1991.
16. Seguí, M.G., Valls, D., Fisa, R., Gallego, M., Portus, M. Estandarización de las condiciones de conservación y elución de muestras de sangre recogidas en papel de filtro para el estudio serológico de la leishmaniosis. *Rev. Ibér. Parasitol.* 50(3-4): 323-328, 1990.
17. Tijssen, P. Laboratory techniques in Biochemistry and Molecular Biology. Practice and Theory of Enzyme Immunoassays. Vol. 15. Edit. Burdon, R.H. y Vanknippenberg, P.H. Elsevier, Amsterdam-New York-Oxford, 548, 1986.