

Evaluación por Western Blot, Inmunofluorescencia Indirecta y ELISA de Perros Infectados con *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum*

Western blot, ELISA and indirect immunofluorescence test
evaluation of *Leishmania (Leishmania) infantum*-infected dogs

Jimmy J. Vargas-Duarte¹, Myriam C. López-Páez², Jesús E. Escovar-Castro³
y José Fernández-Manrique³

1 Instituto de Genética, Universidad Nacional de Colombia. jjvargasd@unal.edu.co.

2 Departamento de Salud Pública, Parasitología. Facultad de Medicina, Universidad Nacional de Colombia. mclopezp@unal.edu.co.

3 Departamento de Ciencias básicas. Universidad de la Salle. jeescobar@unisalle.edu.co, josefernandezm@yahoo.com

Recibido 19 Enero 2009/Enviado para Modificación 9 Julio 2009/Aceptado 15 Julio 2009

RESUMEN

Objetivo Evaluar el desempeño de las pruebas empleadas en Colombia para el diagnóstico de la leishmaniasis visceral canina y adaptar una técnica de Western blot empleando animales experimental y naturalmente infectados.

Metodología Se obtuvieron sueros de 10 perros infectados experimentalmente con *L. infantum*, 5 perros infectados naturalmente, 16 perros sanos, 26 de reacción cruzada (infectados con *Babesia canis*, *Ehrlichia canis*, *Dirofilaria immitis*, *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania (Viannia)* spp.), 40 de zonas no endémicas y 150 de zona endémica. Todos fueron evaluados mediante las pruebas de inmunofluorescencia indirecta (IFI), ELISA y Western blot (WB).

Resultados Se encontró que IFI tuvo el mayor porcentaje de positividad en los perros infectados (73 %) mientras que el menor porcentaje de falsos positivos se obtuvo por WB (2,5 %). La prueba de ELISA fue la menos eficiente. Fueron reconocidas 24 fracciones antigénicas, las bandas de 29, 34, 50, 69, 75, 86, 99 y 123 kDa fueron responsables de reacciones inespecíficas en los sueros de perros sanos, de zona no endémica y de reacción cruzada. Las bandas por debajo de 29 kDa mostraron ser potencialmente diagnósticas, especialmente la fracción de 13 kDa.

Conclusiones Los métodos directos y serológicos pueden subdiagnosticar la infección por *Leishmania*, solamente un constructo que combine tanto pruebas directas como indirectas sería la forma más eficiente de diagnóstico.

Palabras Clave: Leishmaniasis Visceral, Western blotting, prueba ELISA, pruebas inmunológicas, reservorios (fuente: DeCS, BIREME).

ABSTRACT

Objective Evaluating canine visceral leishmaniasis diagnostic test performance in Colombia and adapting the Western blot test in naturally and experimentally infected dogs.

Methods Sera were obtained from 10 experimentally *L. Infantum*-infected dogs, 5 naturally infected dogs, 16 healthy dogs, 26 *Babesia canis*, *Ehrlichia canis*, *Dirofilaria immitis*, *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania (Viannia)* spp infected dogs, 40 dogs from non-endemic areas and 150 from endemic areas. Sera were tested for *L. infantum* infection using immunofluorescent antibody (IFAT), ELISA and Western blot (WB) tests.

Results Positives results were obtained for 73 % of known infected dogs by the IFAT test and false positives were obtained for 2.5 % of non-infected dogs using WB. ELISA was not efficient for diagnosis. 24 antigenic fractions were recognised in tested sera using WB; however, 29, 34, 50, 69, 75, 86, 99 and 123 kDa bands were recognised in sera from dogs from non-endemic areas, healthy dogs and *Trypanosoma cruzi*, *Ehrlichia canis*, *Dirofilaria immitis* and *Babesia canis* infected dogs. The 13 kDa fraction proved potentially useful for diagnosing canine visceral leishmaniasis.

Conclusions The separate use of parasitological and serological test could lead to misdiagnosis of *Leishmania* infection; using both kinds of technique simultaneously is thus highly recommended.

Key Words: Leishmaniasis, immunoblotting, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), fluorescent antibody technique, immunological test, reservoir (*source: MeSH, NLM*).

La leishmaniasis visceral (LV) es una de las enfermedades parasitarias más importantes en humanos y su transmisión en América se relaciona con la presencia de reservorios animales (1). Durante los últimos 30 años se han incrementado los casos de LV debido a factores como malnutrición, el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), cambios demográficos y ecológicos, incremento de cepas resistentes a los tratamientos, establecimiento de nuevos mecanismos de transmisión y fallas en las estrategias convencionales de control de reservorios y flebótomos (2,3).

En los perros la LV induce un cuadro clínico variable con manifestaciones tanto cutáneas como viscerales, sin embargo, del 35 al 59 % de los animales infectados son asintomáticos lo que plantea un importante problema de salud pública (4). La infección en el perro, principal reservorio doméstico de LV, facilita la transmisión vectorial al hombre, mediante mosquitos flebótomos contaminados con los amastigotes presentes en la sangre y la piel de este tipo de mascotas (1,5). Las pruebas serológicas han sido las herramientas de elección en el diagnóstico de LV canina, especialmente cuando se requiere detectar portadores asintomáticos o monitorear esquemas de control (6-9). Se han reportado valores entre 90 - 100 % de sensibilidad y 80% de especificidad para

inmunofluorescencia indirecta (IFI) (3,9-10), del 85 – 96 % de sensibilidad y 86 – 98 % de especificidad para las pruebas de ELISA (4,6,10-13) y con respecto a la prueba de aglutinación directa (DAT) se habla de una sensibilidad del 100 % y una especificidad del 98,8 % (14). Pruebas serológicas como el Western blotting (WB), son consideradas herramientas altamente sensibles y que han mejorado el diagnóstico de LV en perros, sin embargo, no existe aún consenso con respecto al patrón de reconocimiento de polipéptidos que pueda relacionarse con la dinámica clínica o parasitológica durante la infección en el perro (3,7,8,15-24).

El presente trabajo evaluó el desempeño de las diferentes pruebas empleadas en el diagnóstico de LV canina, con el propósito de reforzar las estrategias de control en reservorios y mediante la adaptación de la prueba de WB buscó establecer el grado de correlación presente entre los resultados obtenidos y los estados clínico y parasitológico.

MATERIALES Y METODOS

Perros inoculados experimentalmente con *Leishmania infantum*: Se inocularon 2 grupos de 3 perros cada uno con 10^6 y 10^4 promastigotes de la cepa MCAN/COL/98/CAT por vía intravenosa (IV) respectivamente y un grupo de 4 perros con 10^4 parásitos vía intradérmica (ID). Todos fueron sometidos a los 2, 4 y 8 meses post inoculación (mpi) a valoración clínica, toma de sangre, aspirados de ganglio linfático poplíteo y cultivo en medio 3N. Los sueros fueron alicuotados y almacenados a -20°C .

Perros inoculados experimentalmente con *Trypanosoma cruzi*: Se inocularon 3 perros con tripomastigotes de la cepa MHOM/CO/SPR y 2 perros con la cepa MHOM/CO/DA por vía IV con 2×10^4 parásitos por kg de peso. Todos los perros fueron sometidos a los 15 días, 1, 2 y 4 meses post inoculación a valoración clínica, toma de sangre de la vena cefálica para prueba de microhematocrito y para la obtención de sueros.

Sueros controles positivos y negativos: Se tomaron 5 sueros de perros de zona endémica y 16 sueros de perros de la ciudad de Bogotá D.C. Todos fueron confirmados parasitológicamente por impronta y cultivo de muestras de ganglio linfático poplíteo, hígado, bazo y médula ósea.

Sueros de reacción cruzada con otros parásitos: Se recolectaron 10 muestras de sueros de perros infectados con *Babesia* spp. (3), *Ehrlichia* spp. (3), *Dirofilaria* spp. (2) y *Leishmania* (*Viannia*) spp. (2).

Sueros de perros de zona endémica y no endémica: Se colectaron 150 y 40 muestras de sangre en zona endémica y no endémica respectivamente.

Prueba de Inmunofluorescencia indirecta: Se llevó a cabo teniendo en cuenta lo descrito por Corredor *et al.* (25) empleando promastigotes de *Leishmania infantum* y un conjugado anti-Ig G canina marcado con fluoresceína a la dilución de 1:32. Se emplearon diluciones seriadas de los sueros desde 1:16 hasta 1:4096 y el punto de corte fue establecido en una dilución $\geq 1:32$.

Prueba de ELISA: Se llevó a cabo teniendo en cuenta lo descrito por Pappas *et al.* (26) y Vega *et al.* (10) empleando un lisado de promastigotes de *Leishmania infantum* con una concentración de 7,5 μ /ml y diluciones de suero de 1:600. Se empleó un conjugado anti-Ig G canina marcado con fosfatasa alcalina a la dilución 1:6000. El punto de corte fue establecido a un valor de absorbancia ≥ 0.421 .

Prueba de Western Blotting (WB): Se llevó a cabo siguiendo lo descrito por Laemmli (27) y Towbin *et al.* (28) empleando un lisado de promastigotes de *Leishmania infantum* cuya concentración de proteína fue medida por el método de Bradford (29) empleando 5 μ g por carril. La separación por electroforesis se llevó a cabo en geles de poliacrilamida al 12% con SDS 0,1 %. La dilución de suero empleada fue de 1:200 y del conjugado de 1:20000.

Análisis de resultados: Se calcularon los parámetros de sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo, valor predictivo negativo y prevalencia aparente para cada una de las pruebas así como la concordancia entre ellas con la sintomatología clínica tanto a nivel experimental como a nivel de campo empleando el programa WinEpiscope 2.0 (Borland® & Delphi TM, 1998).

Aspectos éticos: Se aplicó la Ley 84 de 1989 (30) y la Resolución No. 8430 de 1993 del Ministerio de Salud (31).

RESULTADOS

Los perros inoculados experimentalmente mostraron variaciones en la respuesta clínica y parasitológica dependiendo del tipo de inóculo y de la fase de infección. En los inóculos 10^6 y 10^4 IV se observaron perros sintomáticos y asintomáticos mientras que con el inóculo 10^4 ID todos los perros en algún momento fueron sintomáticos. No se logró demostrar la presencia de amastigotes en 3 de los 10 perros inoculados experimentalmente (Tabla 1).

Tabla 1. Resultados obtenidos en los perros infectados experimental y naturalmente a nivel clínico, parasitológico y serológico

| Inóculo Experimental | Perro No. | Fase infección experimental | Presencia de signos clínicos | Examen parasitológico | Título IFI | Absorbancia ELISA |
|-------------------------|-----------|-----------------------------|------------------------------|-----------------------|------------|-------------------|
| 10 ⁸ prom IV | 1 | 2 mpi | + | - | 1:64 | 0.268 |
| 10 ⁸ prom IV | 1 | 4 mpi | + | nLp | 1:256 | 1.266 |
| 10 ⁸ prom IV | 1 | 8 mpi | ~ | ~ | ~ | ~ |
| 10 ⁶ prom IV | 2 | 2 mpi | - | - | 1:16 | 0.222 |
| 10 ⁶ prom IV | 2 | 4 mpi | - | - | 1:128 | 0.326 |
| 10 ⁶ prom IV | 2 | 8 mpi | - | - | 1:16 | 0.279 |
| 10 ⁶ prom IV | 3 | 2 mpi | - | - | 1:128 | 0.994 |
| 10 ⁶ prom IV | 3 | 4 mpi | + | nLp | 1:256 | 1.500 |
| 10 ⁶ prom IV | 3 | 8 mpi | ~ | ~ | ~ | ~ |
| 10 ⁴ prom IV | 4 | 2 mpi | - | - | NR | 0.338 |
| 10 ⁴ prom IV | 4 | 4 mpi | + | nLp | NR | >2 |
| 10 ⁴ prom IV | 4 | 8 mpi | + | - | 1:256 | 1.65 |
| 10 ⁴ prom IV | 5 | 2 mpi | - | - | 1:16 | 0.208 |
| 10 ⁴ prom IV | 5 | 4 mpi | - | - | 1:64 | 0.419 |
| 10 ⁴ prom IV | 5 | 8 mpi | - | - | NR | 0.432 |
| 10 ⁴ prom IV | 6 | 2 mpi | - | - | 1:128 | 0.362 |
| 10 ⁴ prom IV | 6 | 4 mpi | - | nLp | 1:256 | 0.738 |
| 10 ⁴ prom IV | 6 | 8 mpi | - | - | 1:128 | 0.921 |
| 10 ⁴ prom IV | 7 | 2 mpi | - | - | 1:16 | 0.384 |
| 10 ⁴ prom IV | 7 | 4 mpi | - | nLp | 1:16 | 0.189 |
| 10 ⁴ prom IV | 7 | 8 mpi | - | nLp | 1:64 | 0.262 |
| 10 ⁴ prom ID | 8 | 2 mpi | - | - | 1:32 | 0.311 |
| 10 ⁴ prom ID | 8 | 4 mpi | + | nLp | 1:128 | 0.719 |
| 10 ⁴ prom ID | 8 | 8 mpi | + | nLp | 1:256 | 1.512 |
| 10 ⁴ prom ID | 9 | 2 mpi | + | - | 1:32 | 0.253 |
| 10 ⁴ prom ID | 9 | 4 mpi | + | - | 1:128 | 0.612 |
| 10 ⁴ prom ID | 9 | 8 mpi | + | - | 1:32 | 1.216 |
| 10 ⁴ prom ID | 10 | 2 mpi | + | - | 1:16 | 0.362 |
| 10 ⁴ prom ID | 10 | 4 mpi | + | - | 1:64 | 0.267 |
| 10 ⁴ prom ID | 10 | 8 mpi | + | nLp | 1:64 | 0.267 |
| Inf. natural | 11 | ~ | + | nLp | 1:128 | 1.5 |
| Inf. natural | 12 | ~ | + | nLp | 1:4096 | 2.5 |
| Inf. natural | 13 | ~ | + | nLp | 1:4096 | 2.443 |
| Inf. natural | 14 | ~ | + | nLp, B | 1:4096 | 1.434 |
| Inf. natural | 15 | ~ | + | B | 1:512 | 1.5 |

IV: Intravenoso. ID: Intradérmico. nLp: Nódulo linfático poplíteo. B: Bazo

Por WB, los sueros de los perros infectados experimentalmente con *L. infantum* reconocieron 15 fracciones antigénicas entre 10 y 123 kDa mientras que los perros infectados naturalmente reconocieron 9 fracciones antigénicas adicionales. Los perros infectados con *T. cruzi* mostraron reacciones cruzadas en 8 bandas. Los animales infectados con *Ehrlichia spp.*, *Babesia spp.* y *Dirofilaria spp.* reconocieron únicamente las bandas de 50 y 69 kDa; en el caso de los perros infectados con *L. (Viannia) spp.* no se observó reacción cruzada con la fracción antigénica de 13 kDa, la cual fue reconocida exclusivamente en sueros de perros infectados con *L. infantum*. Los perros sanos reconocieron las bandas de 69, 75, y 123 kDa.

Se encontró que el 64 % de los perros sintomáticos y el 37 % de los asintomáticos fueron positivos a WB. En muestras de perros parasitológicamente confirmados el 77 % fueron positivas a WB mientras que el 45 % fueron positivas para WB, pero negativas parasitológicamente a pesar de la infección experimental.

En los animales infectados experimentalmente con *L. infantum* se encontró que el 45,4 % fueron positivos a IFI y WB y que el 67,5 % de los perros no infectados fueron negativos a las dos pruebas. Por ELISA y WB se encontró que para estas dos pruebas de los animales infectados experimentalmente fueron positivos el 48,4 % y negativos el 57,5 % de los perros no infectados.

Tabla 2. Parámetros calculados para la evaluación del estado clínico, parasitológico y las pruebas serológicas de IFI, ELISA y WB en los casos de leishmaniasis visceral canina

| Parametro Evaluado | Pruebas Diagnósticas Empleadas | | | | |
|---------------------------|--------------------------------|-------------------------------|------------------|------------------|------------------|
| | Estado Clínico % (IC)* | Examen Parasitológico % (IC)* | IFI % (IC)* | ELISA % (IC)* | WB % (IC)* |
| Sensibilidad | 51.5 (34.5-68.6) | 39.4 (22.7-56.1) | 69.7 (54.1-85.4) | 51.5 (34.5-68.6) | 57.6 (40.7-74.4) |
| Especificidad | 50 (34.5-65.5) | 100 | 67.5 (52.9-82.1) | 57.5 (42.2-72.8) | 100 |
| Valor Predictivo Positivo | 45.9 (29.9-62) | 100 | 63.8 (48.2-79.6) | 50 (33.1-66.8) | 100 |
| Valor Predictivo Negativo | 55.6 (39.3-71.8) | 66.7 (34.5-65.5) | 72.9 (58.6-87.3) | 58.9 (43.5-74.4) | 74.1 (62.4-85.8) |
| Prevalencia Aparente | 50.7 (39.2-62.2) | 17.8 (9.03-26.6) | 49.3 (37.8-60.8) | 46.6 (35.1-58.1) | 26.1 (16.1-36.1) |
| Prevalencia Real | 45.2 (33.8-56.6) | | | | |

* $\alpha=0.05$

Los resultados y los parámetros de todas las pruebas pueden observarse en la Tabla 2. El examen parasitológico mostró la menor sensibilidad y las prevalencias aparentes obtenidas mediante las pruebas de WB y el examen parasitológico son las más bajas, además la prevalencia obtenida mediante el examen parasitológico difiere significativamente ($\alpha=0,05$) de la prevalencia real. Los índices kappa (κ) más altos se presentaron con la prueba de IFI y ELISA ($\kappa=0,59$), examen parasitológico y estado clínico ($\kappa=0,59$) y examen parasitológico y WB ($\kappa=0,52$).

DISCUSIÓN

El desarrollo de herramientas diagnósticas para detectar animales infectados con *L. infantum* constituye una de las tareas prioritarias establecidas por la OMS para el control de la leishmaniasis zoonótica (1,32). De Paula *et al.* (3) e Iniesta *et al.* (17) afirman que los estudios epidemiológicos y las medidas de control, en los casos de LV zoonótica, deben basarse en los valores verificados de sensibilidad y especificidad de cada prueba, sin embargo, no existe consenso sobre cual técnica sería la más eficiente.

Según Desjeux (1), en humanos el diagnóstico por aspirado de bazo es considerado el “gold estándar”. Esto contrasta con lo obtenido en los perros infectados naturalmente donde se encontró que la impronta de bazo fue menos sensible (40 %) que el aspirado de ganglio linfático poplíteo (80 %). En los perros experimentales la máxima sensibilidad del aspirado de ganglio alcanzó el 70 % a los 4 mpi. Es posible que existan variaciones con respecto a la distribución del parásito en relación a la especie afectada (4,33-35).

Alexandre y Dias (9) reportan que IFI mejora la precocidad del diagnóstico en perros asintomáticos situación que se confirmó experimentalmente en perros infectados pero negativos parasitológicamente. De los 10 sueros tomados 2 mpi el 50 % fue positivo por IFI, 20 % por WB y solo el 10 % por ELISA. Los programas de control de LV canina han considerado la prueba de IFI como la técnica de elección para el diagnóstico (9,10,32,36); en este estudio se encontró que el 27,3 % de los perros infectados mostraron títulos negativos (Tabla 1). Bernardina *et al.* (13) y Mancianti *et al.* (6) reportaron positividad para la prueba de IFI entre el 93 % y el 97,8 % en perros confirmados parasitológicamente respectivamente, datos que contrastan con el 72,7 % de positividad obtenido en este estudio. Por IFI solo se detectó al 67,5 % de los perros no infectados como tal, similar a lo descrito por De Paula *et al.* (3).

En los perros se han reportado reacciones cruzadas por IFI con miembros relacionados de la familia *Trypanosomatidae* como *T. cruzi* y algunas especies de *Leishmania* sp. cutánea circulantes en perros (9,32). Vega *et al.* (10) encontraron reacciones cruzadas con *T. evansi* y el presente trabajo evidenció positividad después de los 2 mpi en perros con *T. cruzi*. Por IFI no se encontraron reacciones cruzadas con babesiosis, ehrlichiosis ni dirofilariasis, similar a lo descrito por Mancianti *et al.* (6).

Según Alexandre&Dias (9), Vega *et al.* (10), Travi *et al.* (4) y Mancianti *et al.* (37) la prueba de ELISA ha permitido obtener mayor sensibilidad y especificidad en el diagnóstico de LV canina. Sin embargo, el ELISA no mejoró la precocidad en el diagnóstico con respecto a IFI. Según Nieto *et al.* (22) el tipo de antígeno y la purificación del mismo puede afectar los resultados en fases iniciales de la infección con LV canina. El porcentaje de positividad obtenido en los perros infectados tanto natural como experimentalmente, fue del 51,5 %, el menor para las tres pruebas utilizadas, lo que contrasta con lo descrito por Mancianti *et al.* (37). Por ELISA se obtuvo el mayor porcentaje de falsos positivos y de los perros no infectados el 10 % no mostraron títulos de anticuerpos por IFI pero sí fueron positivos por ELISA; lo que concuerda con lo descrito por Almeida *et al.* (7) quienes encontraron que los valores de especificidad de ELISA disminuyeron debido al uso de antígenos crudos y la presencia de anticuerpos de reacción cruzada. En los sueros de perros inoculados con *T. cruzi* el 81 % fueron positivos por ELISA, reacciones que también han sido reportadas Vercammen *et al.* (12). Se observó reacción cruzada con *Ehrlichia* spp. a diferencia de lo reportado por Mancianti *et al.* (6) quienes encontraron reacciones cruzadas con *Dirofilaria* spp. y *Babesia* spp. Las reacciones inespecíficas pueden darse con antígenos crudos como lo reportan Alexandre&Dias (9) y Mancianti *et al.* (37) o a condiciones nutricionales y exposición a otros patógenos como lo reportan Bernardina *et al.* (13), Abranches *et al.* (18) y Pappas *et al.* (26).

La prueba de WB no incrementó significativamente los niveles de detección obtenidos por las pruebas de IFI o ELISA en los animales infectados. Los resultados de las pruebas de ELISA y WB en animales infectados fueron similares, datos que concuerdan con los reportados por Deplazes *et al.* (38), posiblemente debido a que el antígeno empleado para las dos pruebas fue el mismo y el porcentaje de detección de perros en fases iniciales de la infección experimental fue bajo para las dos pruebas. Teniendo en cuenta que con la prueba de WB fue posible determinar las fracciones antigénicas responsables de algunas de las reacciones cruzadas que probablemente afectaron el desempeño de las pruebas de IFI y ELISA, se logró disminuir el número de falsos positivos por WB.

Se encontró que las fracciones de 13, 57 y 73 kDa se visualizaron en los sueros de perros parasitológicamente comprobados e infectados naturalmente y en los sueros de seguimiento experimental en todas las fases y con todos los inóculos. Datos similares han sido reportados por De Paula *et al.* (3), Aisa *et al.* (16), Mancianti *et al.* (37), Neogy *et al.* (15) y Abranches *et al.* (18).

Fracciones de bajo peso molecular (13 kDa) han sido reportadas por Mary *et al.* (39) como potencialmente diagnósticas, especialmente en fases tempranas de LV, dato que corresponde a lo observado en este estudio donde esta banda fue reconocida solamente por los perros inoculados experimentalmente con *L. infantum* a partir de los 2 mpi e incluso no fue reconocida por los sueros de perros infectados con *L. (Viannia) spp.* Fernández-Pérez *et al.* (8) reportaron la visualización de la banda de 57 kDa en perros sintomáticos relacionándola con respuesta tipo Th2, por el contrario esta banda fue reconocida en el presente estudio tanto en perros sintomáticos como asintomáticos, posiblemente porque durante el proceso de infección los animales se encontraban en fase prepatente. Con respecto al reconocimiento de la banda de 73 kDa, Mancianti *et al.* (37) reporta la presencia de esta banda en perros infectados, sin embargo Mary *et al.* (32) y Aisa *et al.* (16) describen reacciones inespecíficas con los antígenos ubicados en el rango de 70-75 kDa en perros de zonas libres de LV. La alta frecuencia de reconocimiento y la fuerte intensidad que se presentó con la banda de 69 kDa pudo deberse a que, como lo expone Aisa *et al.* (16), en este rango de pesos moleculares se encuentran péptidos de proteínas de choque térmico, altamente conservados entre los diferentes organismos vivos. En este trabajo se encontraron reacciones cruzadas con antígenos de *Babesia spp.*, específicamente con las fracciones de 50, 69 y 75 kDa, sin embargo las reacciones cruzadas con antígenos de *Ehrlichia spp.* descritas en este mismo trabajo con la prueba de ELISA no fueron confirmadas por prueba de WB.

Con respecto a otras bandas importantes encontradas, la banda de 32 kDa ha sido también descrita por De Paula *et al.* (3) quienes la catalogan como potencialmente diagnóstica en los casos de LV en América asociándola con una banda de 29 kDa, que también fue visualizada en los perros infectados con *L. infantum* en todos los inóculos y durante todo el seguimiento experimental pero de forma similar fue observada en una muestra de suero de uno de los perros inoculados experimentalmente con *T. cruzi* 120 dpi. Por lo tanto, los hallazgos obtenidos indican que en zonas donde circulen de forma concomitante *L. infantum* y *T. cruzi* no debería tenerse en cuenta las bandas de 29, 34, 50, 69, 75, 86, 99 y 123 kDa. El uso de los análisis de WB es útil en la determinación de los perros infectados con LV; sin embargo no existe consenso con respecto al patrón de reconocimiento.

Los estudios realizados en Brasil, muestran a IFI como la prueba de referencia para el control de LV en perros (3,9,40). Los resultados de este trabajo confirmarían la utilidad de la prueba de IFI ya que mostró la mayor sensibilidad y una alta especificidad comparada con las demás pruebas, adicionalmente junto

con la prueba de ELISA fue la que más se acercó a la prevalencia real. La concordancia (κ) más alta a nivel de campo se presentó con las pruebas de IFI y WB, lo que indicaría que al emplearlas concomitantemente sería posible obtener una buena sensibilidad (IFI) y especificidad (WB) en los análisis de campo como lo demostró De Paula *et al.* (3) y las prevalencias aparentes obtenidas no se alejarían significativamente de la prevalencia real.

Teniendo en cuenta que los métodos directos y las pruebas serológicas en zonas endémicas pueden subdiagnosticar la infección por LV es recomendable adaptar nuevas técnicas que permitan un diagnóstico más sensible en las etapas tempranas de la infección y después del tratamiento en los perros afectados; sin embargo, solamente un constructo que combine tanto pruebas directas como indirectas sería la forma más eficiente de diagnóstico. En el caso de WB, el emplear las bandas específicas encontradas en este trabajo como indicadores de infección temprana, especialmente aquellas con pesos moleculares <30 kDa, con preparaciones antigénicas mucho más elaboradas, podría mejorar los valores de sensibilidad y especificidad de la prueba. Debido a que existen otras formas zoonóticas de leishmaniasis circulando en los perros en América, en estudios posteriores deberían emplearse un mayor número de muestras de suero de perros infectados con aislados causantes de leishmaniasis cutánea, ya que los datos obtenidos en este estudio aún son muy reducidos ♣

REFERENCIAS

1. Desjeux P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 2004; 27:305-318.
2. Tesh R. Control of zoonotic visceral leishmaniasis: Is it time to change strategies? *Am J Trop Med Hyg* 1995; 52: 287-292.
3. De Paula A, Da Silva A, Fernandes O, Jansen A. The use of immunoblot analysis in the diagnosis of canine visceral leishmaniasis in an endemic area of Rio de Janeiro. *J Parasitol* 2003; 89: 832-836.
4. Ciaramella P & Corona M. Canine leishmaniasis: Clinical and diagnostic aspects. *Comp Cont Educ Pract Vet* 2003; 25:358-369.
5. Travi B, Tabares C, Cadena H, Ferro C, Osorio Y. Canine visceral leishmaniasis in Colombia. Relationship between clinical and parasitological status and infectivity for sand flies. *Am J Trop Med Hyg* 2001; 64:119-124.
6. Mancianti F, Pedonese F, Poli A. Evaluation of dot-enzyme linked immunoabsorbent assay (dot-ELISA) for the serodiagnosis of canine leishmaniasis as compared with indirect immunofluorescence assay. *Vet Parasitol* 1996; 65:1-9.
7. Almeida M, Jesus E, Sousa-Atta M, Alves L, Berne M, Atta A. Antileishmanial antibody profile in dogs naturally infected with *Leishmania chagasi*. *Vet Immunol Immunopatol* 2005; 106:151-158.
8. Fernandez-Perez F, Gómez-Muñoz S, Mendez J. *Leishmania*-specific lymphoproliferative responses and Ig G1/Ig G2 immunodetection patterns by Western blot in asymptomatic, symptomatic and treated dogs. *Acta Trop.* 2003; 86:83-91.

9. Alexandre W & Dias P. Reflexões sobre a qualidade do diagnóstico da leishmaniose visceral canina em inquéritos epidemiológicos: o caso da epidemia de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, 1993-1997. *Cad Saúde Pública*, Rio de Janeiro 2004; 20:259-265.
10. Vega J, López C, Vargas J, Ayala M, Nicholls S, Bello F, *et al*. Estandarización de la prueba de ELISA para el inmunodiagnóstico de la Leishmaniasis visceral canina. In: Agudelo C. eds. I Encuentro de Investigadores en Salud Pública de la Universidad Nacional de Colombia. Bogotá: Instituto de Salud Pública; 2003.
11. Riera C, Valladares J, Gallego M, Aisa M, Castillejo S, Fisa R, *et al*. Serological and parasitological follow-up in dogs experimentally infected with *Leishmania infantum* and treated with meglumine antimoniate. *Vet Parasitol* 1999; 84:33-47.
12. Vercammen F, Berkvens D, Le Ray D, Jacquet D, Vervoort T. Development of a slide ELISA for canine leishmaniasis and comparison with four serological tests. *Vet Record* 1997; 141: 328-330.
13. Bernadina W, De Luna R, Oliva G, Ciaramella P. An immunodiffusion assay for the detection of canine leishmaniasis due to infection with *Leishmania infantum*. *Vet Parasitol* 1997; 73:207-213.
14. Harith A, Slappendel R, Reiter I, Van Knipen F, De Korte P, Huigen E, Kolk A. Application of a direct agglutination test for the detection of specific anti- *Leishmania* antibodies in the canine reservoir. *J Clin Microbiol* 1989; 27:2252-2257.
15. Neogy A, Vouldoukis I, Silva O, Tselentis Y, Lascombe J, Segalen T, *et al*. Serodiagnosis and screening of canine visceral leishmaniasis in an endemic area of Corsica: Applicability of a direct agglutination test and immunoblot analysis. *Am J Trop Med Hyg* 1992; 47:772-777.
16. Aisa M, Castillejo S, Gallego M, Fisa R, Riera M, Colmenares M *et al*. Diagnostic potential of western blot analysis of sera from dogs with Leishmaniasis in endemic areas and significance of the pattern. *Am J Trop Med Hyg* 1998; 58:154-159.
17. Iniesta L, Fernandez-Barredo S, Bulle B, Gomez M, Piarrous R, Gallego M, *et al*. Diagnostic techniques to detect cryptic leishmaniasis in dogs. *Clin Diagn Lab Immunol* 2002; 9:1137-1141.
18. Abranches P, Santos-Gómes G, Rachamim N, Campino L, Schnur L, Jaffe C. An experimental model for canine visceral leishmaniasis. *Parasite Immunol* 1991; 13:537-550.
19. Rolland L, Monjour M, Danis M, Gentilini M. Leishmanioses viscérale. Diagnostic par immunoeempreinte. *Presse Médicale* 1992; 21 :971-973.
20. Carrera L, Fermin L, Tesouro M, García P, Rolla E, Gonzalez J, *et al*. Antibody response in dogs experimentally infected with *Leishmania infantum*: Infection course antigen markers. *Experimental Parasitol* 1996; 82:139-146.
21. Correira Da Costa J, Asit B, Vouldoukis I., Sampaio M, Gentilini M, Monjour L. Antigenic components of partially purified antigens of *Leishmania donovani infantum* recognized by sera from dogs with asymptomatic or active visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* 1996; 55:511-515.
22. Nieto CG, Garcia-Alonso M, Requena J, Miron C, Soto M, Alonso C, Navarrete I. Analysis of the humoral immune response against total and recombinant antigens of *Leishmania infantum* correlation with disease progression in canine experimental leishmaniasis. *Vet Immunol Immunopathol* 1999; 67:117-130.
23. Lasri S, Sahibi H, Natami A, Rhalem A. Western blot analysis of *Leishmania infantum* antigens using sera from pentamidine-treated dogs. *Vet Immunol Immunopathol* 2003; 91:13-18.
24. Iniesta L, Gallego M, Portus M. Immunoglobulin G and responses in various stages of canine leishmaniasis. *Vet Immunol Immunopathol* 2005; 103:77-81.
25. Corredor A, Alvarez C, Agudelo C, López C, Cáceres M, Reyes P, *et al*. Prevalence of *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania chagasi* infections risk factors in Colombian indigenous population. *Rev Inst Med Trop S Paulo* 1999; 41:229-234.
26. Pappas M, Hajkowski R, Hockmeyer T. Standardization of the Dot-Enzyme-Linked immunosorbent Assay (Dot-ELISA) for human visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* 1984; 33:1105-1111.

27. Laemmli U. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227:680-685.
28. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrilamide gels to nitrocellulose sheets: procedures and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1979; 76:4350-4354.
29. Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72:248-254.
30. Congreso de la República de Colombia. Ley 084 de 1989. Estatuto Nacional de Protección de los animales. *Diario Oficial*, Año CXXVI. N.39120.27,1989:1-14.
31. Ministerio de Salud, República de Colombia. Resolución No. 008430 de 1993. *Investigación en Salud*. 1993:1-20.
32. Cabrera M, Paula A, Camacho L, Marzochi M, Navier S, Da Silva A, *et al*. Canine visceral leishmaniasis in Barra de Guarativa, Rio de Janeiro, Brazil: Assessment of risk factors. *Rev Inst Med Trop S Paulo* 2003; 45:79-83.
33. Ashford R. The leishmaniasis as model zoonoses. *Ann Trop Med Parasitol* 1997; 91:693-701.
34. Miles M, Vexanat J, Furtado Campos H, Fonseca de Castro J. Canine leishmaniasis in Latin America: Control strategies for visceral leishmaniasis. In: Hoechst Roussel Vet. *Canine Leishmaniasis: An update. Proceedings of the Internacional Canine Leishmaniasis forum*. Barcelona Hoechst Roussel Vet; 1999.
35. Molina R, San Andres M, Tesouro M, Nieto J, Vitututia M, Gonzalez F, *et al*. Canine leishmaniasis: clinical, parasitological and entomological follow up after chemotherapy. *Ann Trop Med Parasitol* 1994; 88: 371-378.
36. Fernandez J, Charry T, Lozano C, Rojas C, Mazabel C, Bello F, *et al*. Prevalencia de Leishmaniasis Visceral Canina en Municipios de Huila-Colombia. *Rev Salud Pública* 2003; 4:278-285.
37. Mancianti F, Falcone M, Giannelli C, Poli A. Comparison between an enzyme linked immunosorbent assay using a detergent soluble *Leishmania infantum* antigen and indirect immunofluorescence for the diagnosis of canine leishmaniasis. *Vet Parasitol* 1995; 59:13-21.
38. Deplazes P, Smith N, Arnold P, Lutz H, Eckert J. Specific Ig G1 and Ig G2 antibody responses of dogs to *Leishmania infantum* and others parasites. *Parasite immunol* 1995; 17: 451-458.
39. Mary C, Lamouroux D, Dunan S, Quilici M. Western blot analysis of antibodies to *Leishmania infantum* antigens: potential of the 14-Kd and 16-Kd antigens for diagnosis and epidemiological purposes. *Am J Trop Med Hyg* 1992; 47:764-771.
40. De Oliveira S, Araujo M. Avaliação das ações de controle da leishmaniose visceral (calazar) em uma área endêmica do Estado da Bahia, Brasil (1995-2000). *Cad. Saúde Pública*, Rio de Janeiro 2003; 51:1681-1690.