

IDENTIFICACIÓN DE *Leishmania chagasi* EN *Canis familiaris* EN UN FOCO  
DE LOS MONTES DE MARÍA

Matilde Elena Rivero Rodríguez

UNIVERSIDAD DE SUCRE  
FACULTAD DE EDUCACIÓN Y CIENCIAS  
PROGRAMA DE BIOLOGIA

2003

**IDENTIFICACIÓN DE *Leishmania Chagasi* EN *Canis familiaris* EN UN FOCO  
DE LOS MONTES DE MARIA**

**Matilde Elena Rivero Rodríguez**

**Director: Pedro José Blanco Tuirán**

**Magíster en Medicina Tropical**

**UNIVERSIDAD DE SUCRE  
FACULTAD DE EDUCACIÓN Y CIENCIAS  
PROGRAMA DE BIOLOGIA**

**2003**

**NOTA DE ACEPTACIÓN**

---

---

---

---

**Presidente jurado**

---

**Jurado**

---

**Jurado**

Ciudad y fecha \_\_\_\_\_

**SOLO EL GRADUANDO ES RESPONSABLE DE LAS IDEAS EXPUESTAS EN  
ESTE TRABAJO**

**(Art. 12, Resolución 023 de 2000)**

## AGRADECIMIENTOS

A Dios por darme la vida y la fortaleza para lograr mis objetivos.

A la Universidad de Sucre por haberme acogido y formado como profesional integral.

A mis padres Cesar y Betty, por todo el esfuerzo para sacarme adelante.

A mi hermano Cesar, por ayudarme y aguantarme.

A Fernando por su apoyo incondicional en todos los aspectos de mi vida.

Al profesor Pedro Blanco por transmitirme parte de su conocimiento y experiencia para la realización de este trabajo y para la vida.

A los habitantes de las veredas El Retiro y Loma de Piedra por conceder el permiso para trabajar con los perros para el estudio y por toda su colaboración.

A la familia Cruz por acogerme y brindarme su amistad.

A Juan Cruz por ser mi compañero en las salidas de campo y por ser un gran amigo.

A los veterinarios Cesar Augusto Negrete y Servio Tulio por su asesoría en la recolección de muestras.

A Suljey por su invaluable ayuda en todo este proceso.

A Arturo Doncel por toda su colaboración.

A mis compañeros de laboratorio: Diargys, Vivian, Nina, Elvis, Jorge y Jahir, por el préstamo de materiales.

A todas las personas que trabajan en el Centro de Diagnóstico Médico de la Universidad de Sucre: Ana Cristina, Mercedes, Vilma, Dra. Graciela Herrera, Carmen, Yamile y demás, por su colaboración y amabilidad.

A María José, Libia, Fredy y Eduardo por ser buenos compañeros y preocuparse por mi trabajo.

A todas las personas que de una u otra manera hicieron posible la realización de este trabajo.

## CONTENIDO

INTRODUCCIÓN .....	20
1 OBJETIVOS .....	24
1.1 Objetivo General .....	24
1.2 Objetivos Específicos .....	24
2 MARCO REFERENCIAL.....	25
2.1 El parásito.....	25
2.2 El vector .....	27
2.3 Ciclo de vida.....	28
2.4 Formas Clínicas.....	30
2.5 Reservorios .....	31
2.6 Leishmaniasis canina.....	33
2.7 Patogenia.....	35
2.8 Respuesta inmunitaria .....	38
2.9 Principales signos encontrados en leishmaniasis canina.....	38
2.10 Diagnóstico Clínico.....	41
2.10.1 Diagnóstico parasitológico.....	41
2.10.2 Diagnóstico Inmunológico.....	41
2.10.3 Diagnóstico molecular.....	42
3 ANTECEDENTES .....	44
4 METODOLOGÍA.....	50
4.1 Área de estudio.....	50

4.2	Información de ejemplares caninos y recolección de muestras.....	50
4.3	Extracción de ADN.....	51
4.4	Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).....	52
4.5	Electroforesis en gel de agarosa.....	55
4.6	Interpretación de los geles de agarosa.....	56
5	RESULTADOS.....	57
5.1	Área de estudio.....	57
5.2	Información de ejemplares caninos y recolección de muestras.....	61
5.3	Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).....	63
6	DISCUSIÓN.....	71
7	CONCLUSIONES.....	76
	RECOMENDACIONES.....	78
	REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	79
	BIBLIOGRAFÍA COMPLEMENTARIA.....	86
	ANEXOS.....	87

### LISTA DE ABREVIATURAS

OMS:	Organización Mundial de la Salud
LC:	Leishmaniasis cutánea
LMC:	Leishmaniasis mucocutánea
LV:	Leishmaniasis visceral
LVA:	Leishmaniasis visceral americana
LVC:	Leishmaniasis visceral canina
PCR:	Reacción en Cadena de la polimerasa
ADN:	Ácido desoxiribonucleico
ADNk:	Ácido desoxiribonucleico del kinetoplasto
ADNm:	Ácido desoxiribonucleico mitocondrial
µm:	Micrómetro
RE:	Reticuloendotelial
SNC:	Sistema nervioso central
CPA:	Células presentadoras de antígeno
CIC:	Complejos inmunes circulantes
Ig:	Inmunoglobulina
Th:	Linfocitos T ayudadores
IFN:	Interferón
IL:	Interleuquina
TNF:	Factor de necrosis tumoral
NO:	Oxido nítrico

IFI: Inmunofluorescencia indirecta  
DAT: Aglutinación directa  
ELISA: Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima

## LISTA DE ANEXOS

- ANEXO A: Distribución geográfica de leishmaniasis cutánea.
- ANEXO B: Distribución geográfica de leishmaniasis visceral.
- ANEXO C: Mapa del Departamento de Sucre (incluyendo área de estudio).
- ANEXO D: Fotografías de pacientes con LV y LC.
- ANEXO E: Información recolectada de los ejemplares caninos.

**LISTA DE CUADROS**

	Página
Cuadro 1. Distribución geográfica y manifestación clínica de <i>Leishmania spp</i> en perros y humanos.	14
Cuadro 2. Mezcla de reacción general para la reacción en cadena de la polimerasa.	33
Cuadro 3. Condiciones específicas del programa Touch-Down realizado con los oligonucleótidos Lir/13Y.	35
Cuadro 4. Condiciones de la reacción de amplificación utilizando los oligonucleótidos SSUF/SSUR.	36
Cuadro 5. Condiciones de la reacción de amplificación utilizando los oligonucleótidos LU-5 A/LC-3L.	36

## LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Formas amastigote y promastigote de <i>Leishmania</i> .	8
Figura 2. Vector de <i>Leishmania</i> (género <i>Lutzomyia</i> ).	8
Figura 3. Ciclo de vida de <i>Leishmania</i>	10
Figura 4. Representación esquemática de las formas de la leishmaniasis canina.	16
Figura 5. Canino con dermatitis alopecica descamativa en la oreja.	20
Figura 6. Perro con dermatitis ulcerativa.	20
Figura 7. Onicogriposis en <i>Canis familiaris</i> con leishmaniasis.	21
Figura 8. Alopecia en la cara de un perro infectado con <i>L. Infantum</i>	21
Figura 9. Porcentaje de signos encontrados en la población canina de la vereda Loma de piedra.	44

## LISTA DE FOTOGRAFÍAS

		Página
Fotografía 1.	Vereda El Retiro.	40
Fotografía 2.	Vereda Loma de Piedra.	40
Fotografía 3.	Ejemplar de <i>Eqqus assinus</i> encontrado en las veredas de estudio.	41
Fotografía 4.	Perezoso encontrado en el área de estudio	41
Fotografía 5.	Cultivo de maíz en la vereda Loma de Piedra.	42
Fotografía 6.	Ejemplares caninos de las veredas de estudio.	43
Fotografía 7.	Amplificación de controles positivos con los oligonucleótidos Lir/13Y.	46
Fotografía 8.	Amplificación de ADN de una muestra con los oligonucleótidos Lir/13Y.	47
Fotografía 9.	Amplificación de ADN de muestras con los oligonucleótidos Lir/13Y.	48
Fotografía 10.	Amplificación de ADN utilizando los oligonucleótidos ssuf./sur	49
Fotografía 11.	Amplificación de ADN utilizando los oligonucleótidos suf./ssur.	50
Fotografía 12.	Amplificación de ADN con los	

oligonucleótidos LU-5A/LC-3L

## 1 RESUMEN

Palabras claves: zoonosis, *Leishmania*, leishmaniasis canina, identificación, ADN, PCR.

La leishmaniasis es una antropozoonosis que resulta del parasitismo de los macrófagos por un protozooario del género *Leishmania*, esta enfermedad es endémica en 88 países alrededor del mundo. La leishmaniasis visceral es la forma clínica más peligrosa, ya que cuando no es tratada tiempo puede ser mortal.

Dentro del ciclo de vida del parásito, los reservorios se constituyen como un eslabón fundamental debido a que son la fuente de parásitos para el insecto vector; *Canis familiaris* está considerado como el principal reservorio de *Leishmania chagasi* (agente causal de leishmaniasis visceral en América) y constituye el animal doméstico más importante en el área rural del Departamento de Sucre, el cual es considerado como una región de alto riesgo para la enfermedad.

Por todo esto, se realizó el presente estudio en las veredas Loma de Piedra y El Retiro, pertenecientes al municipio de Sampues, en donde se evaluaron un total de 39 ejemplares caninos de raza mestiza (sintomáticos y asintomáticos).

Se realizó un protocolo de PCR específico con dos pares de oligonucleótidos específicos para el género *Leishmania* (Lir/13Y y SSUF/SSUR) utilizando muestras de sangre periférica. A través de este protocolo se logró identificar ADN

de *Leishmania* en seis de las muestras de perros obtenidas, correspondiendo a 12.2% de la población total estudiada.

Se confirmó además a través de la utilización de los oligonucleótidos LU-5A/LC-3L que el parásito hallado corresponde a parásitos del complejo donovani, posiblemente *Leishmania chagasi*.

## ABSTRACT

Key Words: zoonosis, *Leishmania*, canine leishmaniasis, identification, DNA, PCR.

The leishmaniasis are zoonoses caused by parasites of the Genus *Leishmania* and they are endemic in 88 countries around the world. The visceral form is the most dangerous clinical manifestation since it is mortal if left untreated.

The reservoirs are important in the life cycle of *Leishmania* because they are sources of parasites for the sand fly vectors.

*Canis familiaris* is considered the main reservoir of *Leishmania chagasi* (causal agent of visceral leishmaniasis in America); it is one of the more important domestic animals in rural areas of the department of Sucre; this region is considered an area of high risk for the disease.

This study was carried out in the villages of Loma de Piedra and El Retiro belonging to the municipality of Sampues. Thirty-nine mixed-breed dogs were screened (symptomatic and asymptomatic) of mestizo breed.

A specific PCR protocol with two pairs of primers for *Leishmania* (Lir/13Y and SSUF/SSUR) was performed using peripheral blood samples. DNA of *Leishmania* parasites was identified in six blood samples from dogs (12.2%) of the total studied population.

Additionally, we confirmed with the primers LU-5A/LC-3L that the parasite found belongs to the donovani complex possibly *Leishmania chagasi*.



## 1.1 LISTA DE TABLAS

### 1.1.1 Página

Tabla 1. Secuencia de los pares de oligonucleótidos utilizados

34

## INTRODUCCIÓN

La leishmaniasis es una antropozoonosis que en el humano afecta la piel, las mucosas o las vísceras; resulta del parasitismo de los macrófagos por un protozooario flagelado del género *Leishmania*, introducido al organismo por la picadura de un insecto flebotomíneo.

Esta enfermedad se presenta en áreas tropicales y subtropicales del mundo y es endémica en 88 países donde continua teniendo un gran impacto en la población; se estima que hay dos millones de casos nuevos cada año y 1/10 de la población mundial está en riesgo de infección (OMS, 2001).

Las manifestaciones patológicas causadas por *Leishmania* difieren mucho tanto en su expresión clínica como en su severidad dependiendo del área geográfica donde ocurre, la especie parasitaria que la causa, el tipo de vector y reservorios involucrados en la transmisión y las condiciones socioeconómicas de las personas afectadas. Existen tres formas clínicas de la enfermedad: cutánea, mucocutánea y visceral, siendo esta última la más peligrosa, ya que cuando no es tratada a tiempo puede ser mortal; se ha estimado que de los dos millones de casos nuevos que ocurren cada año, 1.5 millones son de leishmaniasis cutánea (LC) y 500000 de estos casos corresponden a leishmaniasis visceral (LV) (WALTON, 1996).

Dentro del ciclo de vida del parásito existen tres elementos importantes como son: el vector, el hospedero definitivo y el reservorio; este último constituye la fuente de infección para el insecto vector y para el caso específico de leishmaniasis visceral, el perro está considerado como su principal reservorio doméstico (MINISTERIO DE SALUD, 1995), haciendo parte fundamental de la transmisión de esta forma clínica de la leishmaniasis.

El estudio de la leishmaniasis se dificulta debido a su carácter focal, es decir, hay que determinar un foco y hacer un estudio de la historia natural del parásito, para lo cual se necesita principalmente una concepción integral que considere el estudio de los parásitos, vectores y reservorios involucrados en la transmisión en esa zona específica (MARTÍNEZ et al., 1999).

El parásito causante de la leishmaniasis en América se encuentra distribuido desde el sur de los Estados Unidos hasta el norte de Argentina; en Colombia, la leishmaniasis fue descrita por primera vez en el año de 1872 y posterior a esto el número de casos ha aumentado considerablemente.

El departamento de Sucre es considerado de alto riesgo para la enfermedad ya que se ha comprobado la presencia de esta infección parasitaria en la región de los Montes de María, presentándose las formas cutánea y visceral de la enfermedad (MINISTERIO DE SALUD, 1995; OMS, 1994).

Para el año 2000 en el departamento de Sucre se presentaron según cifras registradas, 253 casos nuevos de leishmaniasis cutánea y 16 casos de leishmaniasis visceral, de estos últimos, 6 casos de leishmaniasis visceral se presentaron en el corregimiento de Loma de Piedra, municipio de Sampués (DASSSALUD, 2000) donde se realiza el presente estudio.

En nuestro departamento se han realizado algunos estudios de esta patología concentrándose en las manifestaciones humanas (LÓPEZ Y BLANCO, 2000) y en los vectores transmisores (COCHERO Y BLANCO, 2003); sin embargo no se han realizado estudios suficientes acerca de los reservorios del parásito en la región, los cuales constituyen un eslabón importante en la cadena de transmisión del parásito.

El perro (*Canis familiaris*) constituye el animal doméstico más importante en las áreas rurales del departamento, donde cumple funciones tales como vigilancia de la propiedad, mascota, caza; este animal está considerado como el principal reservorio de *Leishmania chagasi* (agente causal de LV) y se puede manifestar diversamente (MARTINEZ et al., 1999). Por esta razón se han utilizado varias técnicas para el diagnóstico de esta patología en perros; entre estos tenemos: métodos directos, serológicos y en la última década se han realizado varios estudios tanto en humanos como en perros utilizando técnicas moleculares como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la cual ha demostrado ser una técnica altamente específica y más sensitiva que los métodos tradicionales de diagnóstico (LACHAUD et.al, 2000).

Se propone entonces, la utilización de esta técnica para la identificación de *Leishmania* en *Canis familiaris* en un foco de la enfermedad en el Departamento de Sucre. Con esto se pretende contribuir al conocimiento de la historia natural de la enfermedad en el área de estudio y al entendimiento de su distribución.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo General

Identificar parásitos de *Leishmania chagasi* provenientes de *Canis familiaris*, en un foco en la región de los Montes de María en el Departamento de Sucre.

### 2.2 Objetivos Específicos

Conocer la presencia de *Leishmania* en *Canis familiaris*, para aclarar su papel como reservorio en el ciclo de la leishmaniasis.

Explorar la validez de la técnica reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para detectar parásitos de *Leishmania* en perros asintomáticos.

Conocer el complejo al cual pertenece el parásito encontrado en *Canis familiaris*.

### 3 MARCO REFERENCIAL

#### 3.1 El parásito.

Los agentes etiológicos de la leishmaniasis son protozoarios que se clasifican taxonómicamente así:

Reino	<i>Protista</i> Haeckel (1866)
Subreino	<i>Protozoa</i> Goldfuss (1817), Von siebold (1945)
Phylum	<i>Sarcomastigophora</i> Honigberg y Balamuth (1963)
Subphylum	<i>Mastigophora</i> Diesing (1866)
Clase	<i>Zoomastigophora</i> Calkins (1909)
Orden	<i>Kinetoplastida</i> Honigberg (1963) Vickerman (1976)
Suborden	<i>Trypanosomatina</i> Kent (1880)
Familia	<i>Trypanosomatidae</i> Doflein (1901) Grobber (1905)
Género	<i>Leishmania</i> Ross (1903)

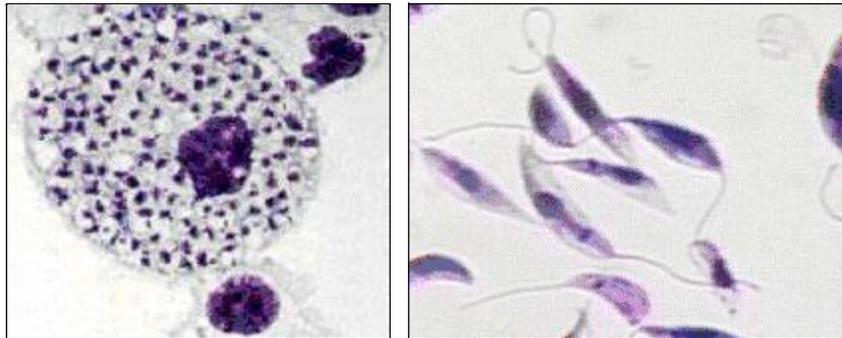
Revisado por LEVINE et.al. (1980)

Una característica distinguible de este grupo es una estructura subcelular conocida como el kinetoplasto, el cual es observado cuando la célula es teñida con Giemsa; es una región de la mitocondria y su tinción se debe al ADN presente. El ADN del kinetoplasto (ADNk) es relativamente abundante y consiste en mini círculos y maxi círculos, los cuales se encuentran como una masa concatenada con la mitocondria. Los maxi círculos codifican varios genes

mitocondriales y son más o menos equivalentes al ADN mitocondrial (ADNm); los mini círculos son heterogéneos, evolucionan rápidamente y su función es codificar ARNs guías, los cuales controlan la especificidad del ARN editado (BLUM, 1990); debido al gran número de copias del ADN de los minicírculos, ellos son a menudo utilizados como blancos de identificación cuando se aplican técnicas basadas en ADN como la PCR (TARASSOFF et al, 1987).

Durante su ciclo de vida *Leishmania* adopta dos formas: amastigote y promastigote (Figura 1). Los amastigotes son formas inmóviles, redondeadas que miden entre 1.5 y 5  $\mu\text{m}$  de diámetro; poseen un flagelo rudimentario y se localizan intracelularmente dentro de los macrófagos de los huéspedes vertebrados (hombre o animales reservorios). Presentan estructuras como núcleos con cariosoma central y kinetoplastos; los amastigotes se dividen por fisión binaria dentro de las células parasitadas llevándolas a la ruptura y liberación de nuevos amastigotes que infectarán a otros macrófagos, repitiendo el proceso. Los amastigotes son la fuente de infección para los vectores transmisores de la enfermedad donde se convierten en promastigotes.

Los promastigotes son fusiformes, poseen un núcleo central, un kinetoplasto terminal o subterminal y un largo flagelo que les permite moverse. Miden de 10 a 12  $\mu\text{m}$  de longitud por 3  $\mu\text{m}$  de ancho; se encuentran en el intestino del vector y también pueden ser observados en cultivos con condiciones específicas.



Fuente: Mike Belosevic

Fuente: P.W. Pappas y S.M. Wardrop

Figura 1. Formas amastigote y promastigote de *Leishmania*

### 3.2 El vector

El vector de *Leishmania* en América es un flebótomo del género *Lutzomyia*, que mide de 2 a 3 mm de largo (Figura 2); de 500 especies conocidas de flebotomíneos, solo 30 de ellas han sido identificadas como vectores de la enfermedad. Son de hábitos generalmente nocturnos y solo las hembras transmiten el parásito.



Figura 2. Vector de *Leishmania* (género *Lutzomyia*)

Las hembras ponen sus huevos en las madrigueras de ciertos roedores, en la corteza de los árboles, en las ruinas de construcción, en las grietas de las paredes de las casas y en los vertederos de basura, porque es en estos ambientes donde

la larva encontrará materia orgánica, calor y humedad, las cuales son necesarias para su desarrollo; es decir, que los flebotomíneos desarrollan todas las fases inmaduras de su ciclo de vida (huevo, larva y pupa) en la tierra hasta llegar a su estado adulto.

En la tarde y noche cuando sale a buscar sangre, cubre un radio de vuelo relativamente corto desplazándose de 200 a 400 metros.

En estudios realizados en la región de los Montes de María se ha demostrado que el vector implicado en la leishmaniasis es *Lutzomyia evansi* (VELEZ et.al, 1995 y COCHERO Y BLANCO, 2003).

### **3.3 Ciclo de vida.**

Los vectores pican a los reservorios, en cuya dermis se encuentran macrófagos infectados con amastigotes (que constituyen la fuente de infección). Los amastigotes llegan al intestino del insecto donde son liberados de los macrófagos parasitados y mediante un proceso de transformación pasan a promastigotes, los cuales tienen un flagelo que les permite movilizarse. Se multiplican por fisión binaria longitudinal en el tracto digestivo del insecto y después de 4 a 7 días migran a la faringe y cavidad bucal del vector desde donde serán transmitidos mediante picaduras a la piel del hombre o de los animales (figura 3).

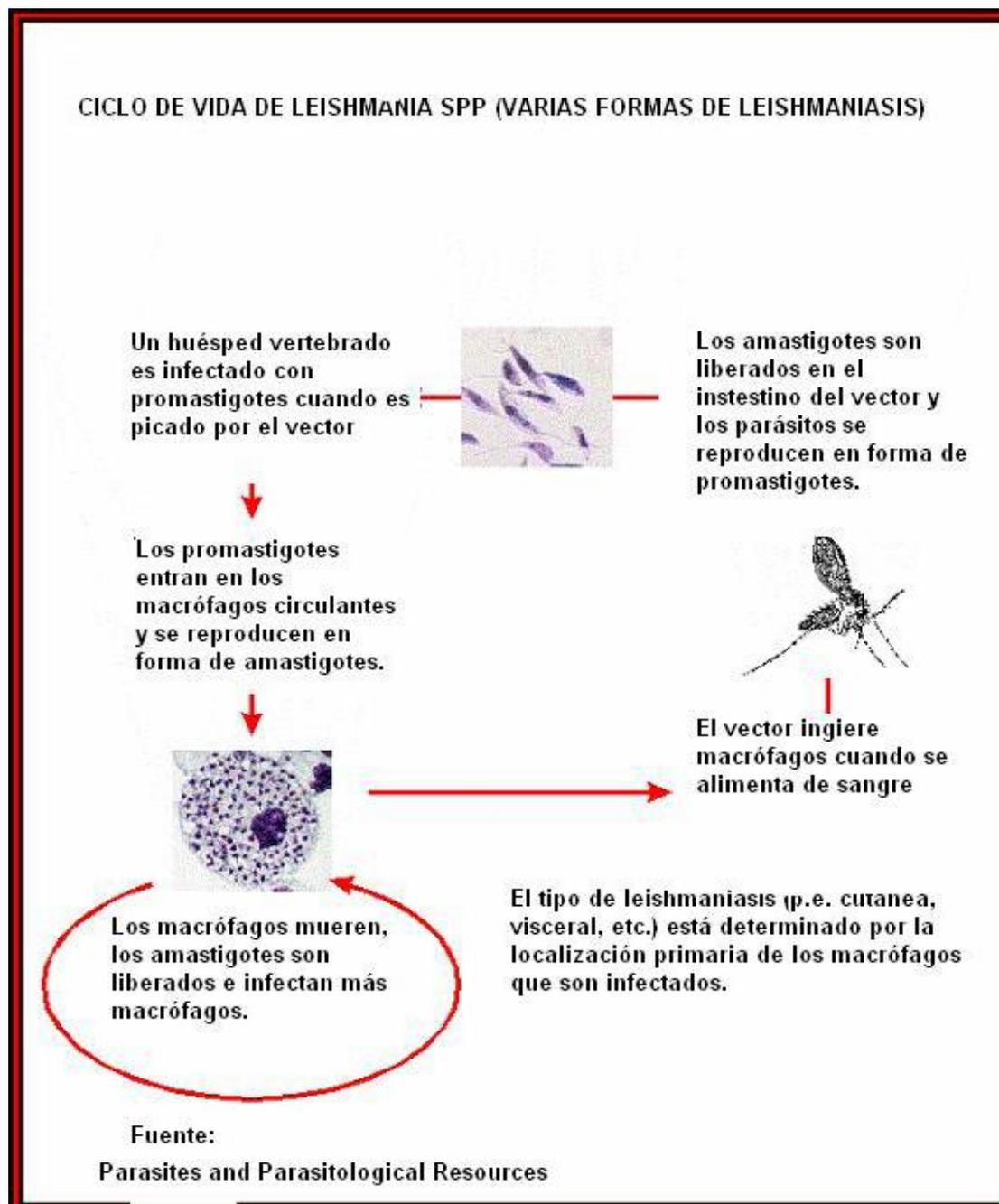


Figura 3. Ciclo de vida de *Leishmania*

### 3.4 Formas Clínicas.

Las formas clínicas varían dependiendo de la especie de *Leishmania* involucrada, la respuesta del huésped y el tiempo de evolución de la enfermedad (AGUDELO Y ROBLEDO, 2000). Aunque hay autores que hablan de una amplia variedad clínica, básicamente existen tres formas clínicamente diferenciables: leishmaniasis cutánea (LC), leishmaniasis mucocutánea (LMC) y leishmaniasis visceral (LV), las cuales se encuentran ampliamente distribuidas en 4 continentes (ver anexo A y B).

**Leishmaniasis cutánea.** Es producida por *L. major* o *L. tropica* en el viejo mundo y por *L. mexicana* y *L. braziliensis*, *L. panamensis* e incluso *L. chagasi* en América.

El período de incubación del parásito fluctúa entre tres semanas y seis meses y las lesiones generalmente se inician en el sitio de inoculación del parásito que generalmente son las partes del cuerpo que están expuestas; crecen en forma de pápulas que aumentan progresivamente y luego se ulceran. La úlcera típica es redondeada de bordes elevados, eritematosos, con centro granulomatoso limpio y base infiltrada; las lesiones pueden ser únicas o múltiples y dejan una cicatriz típica (MINISTERIO DE SALUD, 1995).

**Leishmaniasis mucocutánea.** También es llamada espundia; es una consecuencia de LC y puede presentarse muchos años después de la úlcera de la piel; sus lesiones son dolorosas. Esta complicación de la lesión primaria resulta en

desfiguración y ulceración progresivas, que traen muchos perjuicios sociales a las personas que las padecen.

**Leishmaniasis visceral.** Es causada por *L. donovani* (India, Africa), *L. infantum* (zona mediterránea, Asia y Oriente medio) y *L. chagasi* (Sur América). Las formas promastigotes del parásito invaden las células del sistema reticuloendotelial (RE) local, pasan a amastigotes y se diseminan por vía linfática o sanguínea para localizarse entonces en las células RE del bazo, hígado, nódulos linfáticos, médula ósea, mucosa intestinal y otros órganos, los cuales tienden a engrandecerse debido al gran crecimiento de las células RE. El período de incubación va de 1 a 4 meses. La fiebre inicial es intermitente y puede llegar a 40°C; hay una leucopenia marcada con pocos monocitos, anemia y trombocitopenia.

### 3.5 Reservorios

No existe un criterio único para definir a un reservorio, sin embargo, se puede decir que este animal debe garantizar la existencia del agente etiológico y debe facilitar su posterior transmisión (OMS, 1984). Para que pueda ser considerado reservorio principal debe reunir las siguientes condiciones:

- a. El animal, debe estar representado en número suficiente en el nicho ecológico donde aparece la enfermedad y tener un promedio de vida largo para asegurar que es fuente de alimentación para el insecto vector. La relación entre el animal y el flebótomo tiene que ser estrecha.

- b. El curso de la infección en el animal tiene que ser crónico para que los parásitos estén presentes en cantidad y tiempo suficientes para asegurar la infección de los flebótomos.
- c. Se requiere que esa enzootia sea lo suficientemente abundante para justificar los casos humanos. El contacto entre el insecto y el humano tiene que estar garantizado.
- d. Los aislados de *Leishmania* obtenidos del reservorio, deben ser los mismos que los de humano y vector del mismo nicho ecológico.

Cuando estas características se cumplen de manera parcial, se tiene un reservorio secundario, lo cual indica que la relación entre el animal y el parásito es reciente en términos evolutivos y por tanto inestable; como es de esperar hay muchos reservorios secundarios y pocos principales.

Por regla general existe un ciclo selvático de la leishmaniasis mantenido entre un reservorio salvaje y los flebótomos del entorno. Por sinantropía, bien del reservorio o del vector, el ciclo se aproxima al ámbito peridoméstico para finalmente arraigarse entre los animales y vectores domésticos. El humano se infecta de manera accidental, ya sea al penetrar en el ciclo selvático por condiciones de vivienda o de actividad, o bien al implantarse un ciclo peridoméstico o doméstico. Se han descrito reservorios accidentales que no son importantes en el ciclo de transmisión del parásito y por lo tanto carecen de significación epidemiológica (MARTINEZ et.al, 1999).

### 3.6 Leishmaniasis canina.

Al contrario de lo que sucede en la leishmaniasis cutánea, el perro es considerado como el principal reservorio doméstico de leishmaniasis visceral; los parásitos de *Leishmania* causan manifestaciones clínicas en los perros, especialmente en áreas tropicales y subtropicales (cuadro 1). De acuerdo al criterio clínico la leishmaniasis canina es de tipo visceral, aunque puede ser más apropiado el término “leishmaniasis canina generalizada” porque involucra tejidos cutáneos y visceral (STRAUSS-AYALI Y BANETH, 2001). El perro puede sufrir la enfermedad y la muerte por invasión de sus vísceras entre 6 meses y 2 años después de la infección (MINISTERIO DE SALUD, 1995).

Cuadro 1. Distribución geográfica y manifestación clínica de *Leishmania sp* en perros y humanos.

Ubicación geográfica	Parásito	Manifestación clínica	
		Perros	Humanos
Viejo mundo	<i>L. tropica</i>	LC y LV	LC (LV)*
	<i>L. donovani</i>		LV
	<i>L. infantum</i>	LV	LV (LC)*
Nuevo mundo	<i>L. braziliensis</i>	LC, LMC	LC, LMC
	<i>L. chagasi</i>	LV	LV (LC)*
	<i>L. mexicana</i>		LC, LMC

\*Nota: los paréntesis indican una manifestación clínica menos común de la enfermedad

En la leishmaniasis canina se describen tres tipos de ciclos: selvático, peridoméstico o rural, y doméstico o urbano. Los dos últimos ciclos tienen como principal reservorio al perro y la transmisión zoonótica se realiza generalmente de manera peridoméstica o doméstica (CORDERO Y ROJO, 1999).

Esta parasitosis canina es muy importante porque tiene una doble repercusión: en salud pública, debido al papel del perro como reservorio y por otro en medicina veterinaria, en la que por su gran incidencia, dificultad del diagnóstico precoz y relativa falta de eficacia del tratamiento, constituye una enfermedad altamente problemática.

La capacidad infectante para los vectores no es igual en todos los perros infectados, entre estos se han diferenciado dos poblaciones: los infectivos y los no infectivos. Los no infectivos, son perros asintomáticos y seronegativos en los cuales la infección se resolvería; mientras que los perros infectivos, ya sean sintomáticos o asintomáticos (en período de prepatencia de la enfermedad), tienen la capacidad de infectar a los vectores (Figura 4).

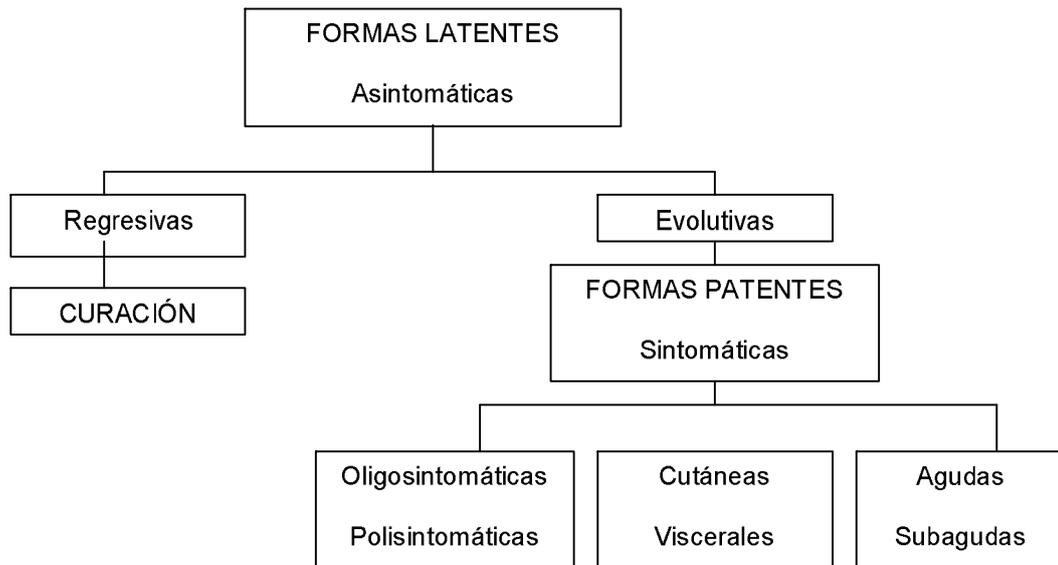


Figura 4. Representación esquemática de las formas de la leishmaniasis canina

### 3.7 Patogenia.

La relación parásito-hospedero que se establece entre las leishmanias y el perro está condicionada por muchos factores que hace que la evolución sea variada, sin embargo este espectro puede ajustarse a un modelo básico de respuesta dicotómica en el que se contemplan dos posibilidades excluyentes: el desarrollo progresivo de la enfermedad que en la mayoría de los casos conduce a la muerte, o al desarrollo de resistencia que lleva al control y resolución de la infección (MARTINEZ et al., 1999). Se pueden distinguir factores dependientes del parásito y del hospedador; entre los factores dependientes del parásito el más importante es la especie y dentro de esta el del zimodema, ya que se considera que distintos zimodemas pueden tener diferente virulencia y antigenicidad que provoca diversas respuestas en el hospedador y por tanto, procesos patológicos variados.

Entre los factores dependientes del hospedador se consideran: la constitución genética y directamente relacionado con esta, la capacidad de respuesta inmunitaria, que condiciona la resistencia o receptividad a la infección así como la predisposición para desarrollar un tipo u otro de enfermedad (ALVAR et al., 1995).

Factores secundarios no menos importantes son el estado sanitario (coinfecciones, estados de inmunodepresión, etc.) y nutricional que en gran medida son difícilmente separables de la capacidad inmunitaria, al condicionar la fisiología y capacidad de respuesta general del organismo.

El establecimiento de la infección es el primer elemento para el desarrollo de la enfermedad, lo que implica que el parásito tiene que penetrar en la célula fagocítica y una vez en su interior, resistir a su acción microbicida (PINELLI et al., 1994)

A partir del punto de inoculación, en el que puede originarse una lesión cutánea característica, el parásito, en el interior de los macrófagos se disemina rápidamente por todo el organismo, por vía hemática o linfática (HERNÁNDEZ Y MARTINEZ, 1992). Un rasgo característico de la leishmaniasis canina es la distribución generalizada del parásito por todo el organismo, señalándose como localizaciones más importantes el bazo, los ganglios linfáticos, la médula ósea, el hígado, los riñones y la piel; aunque también pueden encontrarse en prácticamente todos los tejidos y órganos (testículos, próstata, vejiga de la orina, pulmón, intestino, SNC, ojo, cartílagos, articulaciones, etc.).

El elemento patogénico primario en la leishmaniasis canina es la infección, supervivencia y multiplicación del parásito en las células del sistema fagocítico mononuclear. Esta parasitación intracelular condiciona, en primer lugar, una alteración funcional, con disminución de la capacidad fagocítica y de la actividad como células presentadoras de antígeno, y finalmente conduce a la destrucción de la célula parasitada. Existe un segundo elemento patogénico, que es una reacción parcialmente inmunomediada, resultado de una respuesta inmunitaria ineficaz, en la que los mecanismos celulares y humorales se constituyen en elementos inmunopatológicos (MARTINEZ et al., 1995).

Los mecanismos inmunitarios celulares dan lugar a un proceso reactivo tisular, más o menos generalizado, cuyo componente fundamental es una reacción inflamatoria de tipo proliferativo.

El componente inmunopatogénico más importante de la respuesta humoral es la formación y depósito de complejos inmunes circulantes (CIC), que se forman por la unión de un antígeno leishmanico, una IgG o IgM específica y fracciones del complemento (sobre todo C3). Los CIC alteran la capacidad fagocítica de monocitos y neutrófilos circulantes, interfieren los mecanismos de agregación plaquetaria y estimulan la liberación de aminas vasoactivas (MARTINEZ et al., 1999).

### **3.8 Respuesta inmunitaria**

La inmunidad protectora está relacionada con la expansión de la subpoblación Th1, productora principalmente de IFN $\gamma$ , IL-2 y TNF, que inducen la activación de macrófagos y la destrucción intracelular del parásito por acción del óxido nítrico (NO), las respuestas linfoproliferativas y las reacciones de hipersensibilidad de tipo retardado. Por el contrario, la progresión de la enfermedad se asocia a la expansión de la subpoblación Th2, productora de IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10, que inhiben la activación macrofágica y las repuestas linfoproliferativas y que, en cambio, promueven la proliferación de los linfocitos B y la producción de inmunoglobulinas, condicionando por tanto, una respuesta básicamente humoral (MARTINEZ et al., 1995).

### **3.9 Principales signos encontrados en leishmaniasis canina.**

El cuadro de lesiones cutánea es muy amplio, tanto por la intensidad como por la variedad de las alteraciones encontradas. La lesión básica es una dermatitis crónica proliferativa, que puede caracterizarse como dermatitis descamativa, pustular, ulcerativa o nodular; igualmente son notables los procesos degenerativos de la epidermis que aparecen como consecuencia de proceso dérmico y se manifiestan como hiperplasia epitelial e hiperqueratosis (dermatitis alopécica descamativa) y necrosis (dermatitis ulcerativa) (figuras 5 y 6). Otros signos encontrados son: onicogriposis (uñas excesivamente largas) como muestra la figura 7 y alopecia en diferentes partes de cuerpo (figura 8), poliartritis, cistitis y orquitis



Figura 5. Canino con dermatitis alopecica descamativa en la oreja



Figura 6. perro con dermatitis ulcerativa



Figura 7. Onicogriposis en *Canis familiaris* con leishmaniasis.



Figura 8. Alopecia en la cara de un perro infectado con *L. infantum*

### 3.10 Diagnóstico Clínico.

#### 3.10.1 Diagnóstico parasitológico.

- Biopsia. Se hace biopsia por aspiración de tejido de ganglios linfáticos o médula ósea. La punción ganglionar se realiza sobre todo en ganglios poplíteos o preescapulares, en los que se recoge tejido y se extiende sobre un portaobjetos, para luego teñir con Giemsa.
- Aislamiento en medio de cultivo. Aquí, el parásito se multiplica en un medio apropiado, hasta hacerse detectable por observación microscópica en la forma de promastigote. Los parásitos de *Leishmania* tardan entre 6 y 15 días para crecer.
- Inoculación en animales de experimentación. Una muestra de tejido del animal estudiado se inocula a un animal de laboratorio donde el parásito se multiplica y a las 3 o 4 semanas se pueden observar los amastigotes en los macrófagos.

#### 3.10.2 Diagnóstico Inmunológico.

Es determinante cuando los métodos parasitológicos han arrojado un resultado negativo; son métodos que exploran las modificaciones del sistema inmunitario producidas específicamente por parásitos e indirectamente permiten el diagnóstico (MARTINEZ, 1999). Busca anticuerpos específicos antileishmania, generalmente del tipo IgG. Algunas de las técnicas utilizadas son: Inmunofluorescencia indirecta

(IFI), Aglutinación directa (DAT), Inmunoblot y el método inmunoenzimático (ELISA).

### 3.10.3 Diagnóstico molecular.

Se detecta el ADN del parásito en los tejidos del hospedador y tienen resultados excelentes tanto en sensibilidad como en especificidad. La técnica más utilizada es la reacción en cadena de la polimerasa, esta es una técnica para la amplificación in vitro de secuencias específicas de ADN por la extensión simultánea de las hebras complementarias de ADN (SAIKI et.al , 1985).

Se ha convertido rápidamente en una de las técnicas más usadas de biología molecular y con buena razón; es rápida, barata y simple; además a partir de cantidades mínimas de ADN se puede producir grandes cantidades de este ácido nucleico (McPHERSON et al., 1993).

El ADN blanco se amplifica a través de ciclos repetidos, así:

Desnaturalización del ADN por calor; se realiza entre 93 y 95°C

Etapas de alineamiento, es donde se fijan los oligonucleótidos o primers, los cuales se unen a cada hebra complementaria del ADN, enmarcando la secuencia a copiar. Este paso se realiza a temperaturas de 45 a 65°C.

Extensión o polimerización, en donde la enzima produce la replicación del molde de ADN a partir del extremo 3' de cada indicador en las dos hebras, simultáneamente. Este paso se realiza a temperaturas de 70-74°C.

La concentración de ADN se aumenta de modo exponencial y después de 30 ciclos se produce más de un billón de copias.

## 4 ANTECEDENTES

La leishmaniasis, causada por protozoos del género *Leishmania*, afecta fundamentalmente al hombre y al perro, y engloba un amplio espectro de procesos patológicos que pueden ir desde cuadros clínicos cutáneos auto resolutivos a procesos viscerales de terminación fatal (MARTINEZ et al, 1999).

Fue declarada como enfermedad prioritaria para la investigación por la Organización Mundial de la Salud en 1990, debido al gran problema de salud pública que desencadena.

En Colombia, la leishmaniasis es conocida desde 1872 y cada vez se reportan nuevos focos, principalmente en el sur hasta el Departamento de Huila y hacia el norte en toda la Costa Caribe. En el caso específico del Departamento de Sucre, CAMACHO et al. reportó los primeros casos en 1977.

La leishmaniasis tiene un carácter focal, ya que se presenta en focos ecológicos bien delimitados tanto geográfica como biológicamente; y en un determinado hábitat se mantiene un ciclo único de transmisión del parásito (MARTINEZ et al., 1999).

Dentro del ciclo de vida de un parásito, los reservorios constituyen la fuente de infección para los vectores del foco endémico (BOTERO Y RESTREPO, 1998).

Se han encontrado altas tasas de prevalencias de estos parásitos en perros, lo cual constituye una evidencia para la incriminación de este animal como verdadero reservorio de *Leishmania* (BARKER et al., 2000).

Son muchos los estudios encaminados a determinar el papel de esta especie como reservorios de *Leishmania*. Se han utilizado métodos serológicos, los cuales, a pesar de ser altamente sensibles, poseen una especificidad baja, pudiendo dar reacciones cruzadas con la enfermedad de Chagas (CANESE et al., 1998); éstas investigaciones utilizaron inmunofluorescencia indirecta encontrando una prevalencia del 28%, en perros con edades entre 4 y 6 años; los principales signos encontrados en la población canina infectada con leishmaniasis visceral son: sobrecrecimiento de las uñas (86%), adelgazamiento (57%) y alopecia (57%).

Actualmente se están utilizando técnicas moleculares, especialmente PCR para detectar la presencia del parásito en perros, incriminados como principal reservorio de *Leishmania infantum* (agente causal de leishmaniasis visceral en el Viejo Mundo) en Europa; con estas técnicas se pudo establecer que la prevalencia media de leishmaniasis canina en toda Europa es del 5-10% de la población canina, pero en algunas zonas puede estar entre el 25 y el 30% (MARTINEZ et al, 1999).

La técnica PCR y sus modificaciones ofrece una alternativa rápida, sensitiva y específica para la detección y caracterización de *Leishmania*. Un ejemplo de lo anterior lo constituye un ensayo de Multiplex PCR con el que se detectaron infecciones mezcladas de los 3 complejos de *Leishmania* del Nuevo Mundo, pudiendo evaluar la incidencia real de estas infecciones (HARRIS et al., 1998).

Igualmente se ha aplicado PCR anidado alcanzándose una detección de cantidades extremadamente pequeñas de ADNk de *L. Infantum* (0.1fg) (NOYES, 1998).

REITHINGER et al, (2000) encontraron una alta prevalencia de *Leishmania* en perros asintomáticos (7.6%) y sintomáticos (18%), lo cual indicaría que la diseminación hematogena de parásitos puede ser un fenómeno patológico más común de lo que se cree; a través de este trabajo se demostró que la sensibilidad de PCR depende en gran medida del protocolo de extracción de ADN y los primers usados.

Algunos autores reportan un aumento en la sensibilidad del PCR, si se usa en combinación con la hibridización y comparándola con la electroforesis en gel; es así como REALE et al., 1999 demostraron que PCR puede ser usada en estudios epidemiológicos para ayudar a determinar la prevalencia en áreas donde la enfermedad no ha sido controlada, revelando casos de infección en perros tanto sintomáticos como asintomáticos en muestras de sangre y nódulos linfáticos.

Se ha comparado la sensibilidad de diferentes métodos de PCR para el diagnóstico y estudio epidemiológico de leishmaniasis visceral canina utilizando sangre periférica, que es una muestra menos invasiva y fácil de repetir. LACHAUD et al (2002) compararon seis métodos de PCR: tres utilizando primers cuyo blanco era ADN genómico y los otros tres teniendo como blanco el ADNk. Los cuatro seleccionados fueron aplicados en perros que vivían en un área endémica y agrupados de acuerdo al estado clínico y serología específica, encontrándose que los dos métodos de ADNk podían detectar el parásito en 100% de perros infectados sintomáticos. Igualmente todos los perros seropositivos fueron encontrados positivos por PCR con estos métodos contra un 62% por los métodos basados en ADN genómico; estos métodos basados en ADNk probaron ser mejores a otros en la detección de *Leishmania* en perros asintomáticos, debido a su alta sensibilidad. Además, según estos autores la hibridización de ADN no mejoró la sensibilidad comparada con la visualización directa de los geles sobre luz ultravioleta.

En 1995 fue presentado el informe sobre evaluación ecoepidemiológica de leishmaniasis visceral en San Andrés de Sotavento, encontrándose que el vector implicado en esta zona es *Lu. evansi*; además se evaluó la población canina identificándose a una de las cepas de parásitos como *Leishmania chagasi* a través de electroforesis de isoenzimas y anticuerpos monoclonales; demostrándose además que *Lu. for.gipais* colonizadas (criadas en laboratorio) puede infectarse de este huésped (VELEZ et al., 1995).

En el caso de reservorios silvestres, los estudios son escasos. En Brasil se han encontrado infectados con *Leishmania chagasi* los zorros *Ceiodocyon thous* y *Licalcpx vetulus* (LAINSON, 1990) y en Colombia, la zarigüeya (*Didelphis marsupialis*).

En Colombia, se ha aislado también *Leishmania braziliensis* de animales domésticos como perros (*Canis familiaris*) y burros (*Equus asinus*) (BOTERO Y RESTREPO, 1998).

En un estudio comparativo entre un área conservada (reserva Primate en Colosó, Sucre) y una zona muy intervenida por el hombre (San Andrés de Sotavento, Córdoba), se encontró que *Didelphis marsupialis* y *Proechimys canicollis* fueron comunes en las dos áreas de estudio, además no hubo diferencias en la tasa de infección entre las dos áreas de estudio cuando las especies de mamíferos fueron consideradas juntas. *D. Marsupialis* fue el mamífero más comúnmente infectado tanto en Colosó (14.3%) como en San Andrés de Sotavento (9.5%). En este estudio se encontró que PCR más hibridización es un buen método para la detección de *Leishmania chagasi* en muestras obtenidas en condiciones de campo. Además se sugiere que la infección subclínica es muy común en los huéspedes reservorios (TRAVI et al., 1998).

En otra investigación donde se evaluó la capacidad de infección de un perro oligosintomático y uno polisintomático para vectores “no-naturales” como *Lu.*

*Shanoni* y *Lu. Youngi* se encontró que *Lu. Shanoni* tiene más capacidad permisiva para ser infectado; concluyéndose además que la presencia de perros con infección subclínica en áreas no endémicas donde existen vectores como estos puede dar origen a un ciclo de transmisión de leishmaniasis (TRAVI et al, 2002).

## 5 METODOLOGÍA

### 5.1 Área de estudio

El lugar donde se realizó el estudio se escogió porque en los últimos años se han presentado casos de leishmaniasis en esta zona, todas corresponden a veredas del municipio de Sampuès, éstas son: Loma de piedra y El Retiro (ver anexo C).

### 5.2 Información de ejemplares caninos y recolección de muestras.

Las muestras provienen de perros, los cuales vivían en la zona endémica o de alto riesgo escogida, sin tener en cuenta la presencia o ausencia de signos claros de leishmaniasis.

El muestreo se realizó visitando cada una de las casas de las veredas donde se llevó a cabo el estudio; se indagó sobre la presencia de perros, se solicitó el permiso a los dueños por consentimiento informado y si era concedido se procedía a la toma de la muestra.

Para recolectar la muestra se sujetó firmemente a el perro. Se cortó el pelo y se rasuró el área por encima de la zona de la vena radial (de donde se obtuvo la

muestra); se limpió con alcohol al 70%; se introdujo una aguja N° 19 de 50mm de largo, colocada en una jeringa de 2 ml.

Los 2 ml de sangre tomada se pasaron a un tubo de ensayo que contenía 3 gotas de anticoagulante (EDTA- k3). La muestra se utilizó para la extracción de ADN y posteriormente realizar las pruebas moleculares.

A los perros sujetos al estudio se les tomaron datos con el fin de realizar la parte estadística de prevalencia de la parasitosis (Ver Anexo E).

### **5.3 Extracción de ADN**

El método empleado para la extracción de ADN es el de altas concentraciones de sales , descrito a continuación.

La muestra se centrifugó a 12000 r.p.m. por 5 minutos, el plasma sobrenadante se almacenó, y se trabajó con el pellet, al cual luego se le adicionaron 495µl de buffer de extracción (Tris 10mM, EDTA 1 mM, SDS 1%) y 5 µl de proteinasa k (200µg/ml); se incubó 1h a 55°C. Se inactiva la proteinasa k por 3 minutos a 95°C.

Se centrifugó a 12000 r.p.m. durante 10 minutos, se recolectó el sobrenadante; se agregaron 500 µl de Acetato de Potasio 5M, se mezcló por inversión durante 15 minutos en hielo. Luego, centrifugación a 12000 rpm durante 5 minutos y se pasó el sobrenadante a otro tubo. Luego se adicionaron 0.6 volúmenes de isopropanol; se mezcló invertido en hielo durante 5 minutos. Se centrifugó a 12000 r.p.m. por 3 minutos y se descartó el sobrenadante. Se agregó 1 ml de etanol al 70%; se centrifugó a 12000 r.p.m. durante 3 minutos, se descartó el sobrenadante; el pellet

se deja secar durante 15 minutos y fue resuspendido en buffer TE para realizar posteriormente el PCR.

#### 5.4 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

\*Preparación de la mezcla de Reacción

Esta mezcla contenía agua desionizada, buffer de PCR,  $MgCl_2$ , dNTPs, primers, Taq ADN polimerasa y ADN blanco. Todos estos reactivos se adicionaron en un tubo de la siguiente manera:

Cuadro 2. Mezcla de reacción general para la reacción en cadena de la polimerasa.

Reactivo	Concentración final	Cantidad para 25µl de Reacción
Agua desionizada estéril		Variable
Buffer PCR 10X	1X	2.5 µl
$MgCl_2$	2.5Mm	variable
DNTPs	0.2mM c/uno	2.5 µl
Primer 1	20pmol	2.5 µl
Primer 2	20 pmol	2.5 µl
Taq ADN polimerasa	2 unidades	variable
ADN Blanco		variable

Luego de que la mezcla estuvo lista, se realizó una centrifugación rápida y leve con el fin de recolectar todas las gotas de las paredes del tubo y llevarlas al fondo.

Se realizaron varios protocolos de PCR con diferentes pares de oligonucleótidos, cuyas secuencias se encuentran en la tabla 1.

En primer lugar se realizó una reacción con oligonucleótidos Lir/13Y que identifican parásitos del género *Leishmania* amplificando una región del minicirculo; igualmente se realizó una amplificación de la región 16s del ARN de la pequeña subunidad ribosomal con los oligonucleótidos ssuf/ssur, y finalmente se realizó una amplificación para discriminar el parásito por complejo (complejo *L. donovani*,) con los oligonucleótidos LU-5A, LC-3L. Cada una de estas amplificaciones se realizó con condiciones específicas, las cuales están detalladas en el cuadro 3, 4 y 5.

Tabla 1. Secuencia de los pares de oligonucleótidos utilizados.

<b>Código</b>	<b>Secuencia</b>
Lir	TCG CAG AAC GCC CCT
13Y	CGC CCC TCC CCC ACG GG
SSUF	TGG GAT AAC AAA GGA GCA
SSUR	CTG AGA CTG TAA CCT CAA AGC
LU-5A	TTT ATT GGT ATG CGA AAC TTC
LC-3L	GCC CGC G <u>Y</u> G TCA CCA CCA T

Cuadro 3. Condiciones específicas del programa Touch-Down realizado con los Primers Lir/13Y

<b>Etapa</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Tiempo (minutos)</b>	<b>Número de ciclos</b>
Desnaturalización inicial	94	2	1
Desnaturalización	94	1	2
Alineamiento	60	1:30	
Extensión	72	1	
Desnaturalización	94	1	2
Alineamiento	59	1:30	
Extensión	72	1	
Desnaturalización	94	1	2
Alineamiento	58	1:30	
Extensión	72	1	
Desnaturalización	94	1	2
Alineamiento	57	1:30	
Extensión	72	1	
Desnaturalización	94	1	2
Alineamiento	56	1:30	
Extensión	72	1	
Desnaturalización	94	1	22
Alineamiento	55	1:30	
Extensión	72	1	
Extensión final	72	5	1

Cuadro 4. Condiciones de la reacción de amplificación utilizando los oligonucleótidos SSUF/SSUR.

<b>Etapa</b>	<b>T(°C)</b>	<b>Tiempo</b>	<b>#ciclos</b>
Desnaturalización inicial	94	2 min	1
Desnaturalización	94	30 seg	30
Alineamiento	55	1 min	
Extensión	72	1 min	
Extensión final	72	5 min	1

Cuadro 5. Condiciones de la reacción de amplificación utilizando los oligonucleótidos LU-5 A, LB-3C, LM-3A, LC-3L.

<b>Etapa</b>	<b>T (°C)</b>	<b>Tiempo</b>	<b># Ciclos</b>
Desnaturalización inicial	95	5min	1
Desnaturalización	95	30seg	30
Alineamiento	54	45seg	
Extensión	72	30seg	
Extensión final	72	5 min	1

### 5.5 Electroforesis en gel de agarosa

Se prepararon 750 ml de buffer de TBE (40mM TRIS - Borato; 1mM EDTA, PH 8.0) a partir de uno 5X; en 100 ml de este se disolvió 0.5 g de agarosa, se deja gelificar aproximadamente durante 45 minutos. Se sumergió en el tanque que contiene 650 ml de buffer y bromuro de etidio (0.5µg/ml).

Se sirvieron las muestras, previamente preparadas con 1/5 de volumen tampón de carga (orange G, glicerol, sucrosa) y 4/5 de ADN problema.

Se conectó con la fuente de poder a 90 voltios y 0.07 amperios; en aproximadamente una hora había terminado el recorrido.

### **5.6 Interpretación de los geles de agarosa**

Una vez terminada la migración, se pasó el gel a un transiluminador con luz ultravioleta 254/352nm para visualizar las bandas.

Se midió la distancia de migración y se comparó con la del marcador (referencia), a través del cual se pudo calcular la longitud de cada una de las bandas del ADN problema a partir de los valores de este marcador de bajo peso molecular de 100pb (Gibco), y se realizó la gráfica distancia de migración de las bandas en cm Vs Logaritmo de la longitud en pares de bases.

## 6 RESULTADOS

### 6.1 Área de estudio.

La vereda El Retiro está ubicada en el corregimiento Escobar Arriba; es una población perteneciente al cabildo indígena Zenú que cuenta con un número de 315 habitantes.

Dentro de esta población se han presentado 2 casos de leishmaniasis visceral en los últimos dos años; en cuanto a las condiciones ecológicas cumple con todas las condiciones necesarias para el asentamiento del vector (casa con techo de palma y paredes de bahareque, vegetación abundante, estercoleros, etc.) (fotografía 1)

Se presenta una vegetación prevaleciente de arbustos y árboles frutales: Matarratón, Dormidera, Mamón, Guayaba, Tamarindo, Limón, Mango, Níspero, etc. Diferentes clases de palmas, especialmente palma amarga y árboles maderables entre los que se encuentran: Campano (*Samanea saman*), Roble, Ceiba (*Bombacopsis quinata*) y Guásimo (*Guazuma ulmifolia*)

En cuanto a los animales más encontrados tenemos ganado vacuno, aves de corral y algunos otros como: Perro (*Canis familiaris*), Burro (*Equus asinus*) y Rata (*Rattus rattus*).

La vereda Loma de piedra está constituida por cinco comunidades: El Hobo, La Zona Caré, Nueva Estrella, Terminal y El Tamarindo; al igual que la anterior, cuenta con todas las condiciones necesarias para el asentamiento del vector y por tanto de la enfermedad (fotografía 2), tiene una población de aproximadamente 629 personas(306 niños y 323 adultos) de los cuales el 52% son mujeres y un 48% son hombres; 17 personas han sufrido de leishmaniasis en algún momento (10 casos de leishmaniasis visceral y 7 casos de leishmaniasis cutánea).

Además, se da la presencia de animales silvestres que podrían actuar como reservorios de *Leishmania*, entre los cuales tenemos: burro (*Equus asinus*), perezoso (*Bradypus Sp*), rata (*Rattus rattus*), entre otros (fotografía 3 y 4).

La actividad económica predominante en estas poblaciones es la agricultura principalmente de ñame, yuca y maíz; el bosque seco tropical ha sido perturbado para dar paso a estos cultivos (fotografía 5).



Fotografía 1. Vereda El Retiro



Fotografía 2. Vereda Loma de Piedra.



Fotografía 3. Ejemplar de *Eqqus assinus* encontrado en las veredas de estudio



Fotografía 4. Perezoso encontrado en el área de estudio



Fotografía 5. Cultivo de maíz en la vereda Loma de Piedra.

## **6.2 Información de ejemplares caninos y recolección de muestras.**

El censo de perros realizado en la vereda El Retiro arrojó como dato de población, un total de 24 de estos animales; de los cuales se recogieron muestras de 10 de ellos, correspondiendo a un 41.6% del total de la población canina.

Todos los perros pertenecían a la raza mestiza, el 50% eran machos y el 50% eran hembras, con un rango de edad entre 4 meses y 5 años y un promedio de 19.2 meses, ninguno presentaba signos de la enfermedad.

En la vereda Loma de Piedra se encontró una población total de 106 ejemplares, de los cuales se recolectó muestras de 29 de ellos, correspondiendo a un 27.35% de la población total canina de dicha vereda.

Todos los perros pertenecen a la raza mestiza, 55.17% machos y 45.83% hembras, con una edad que oscilaba entre 4 meses y 6 años. Un gran porcentaje de esta población no presentaba signos visibles de esta enfermedad (figura 9). En la fotografía 6 se pueden observar los perros en su ambiente natural.



Fotografía 6. Ejemplares caninos de la Vereda Loma de Piedra.

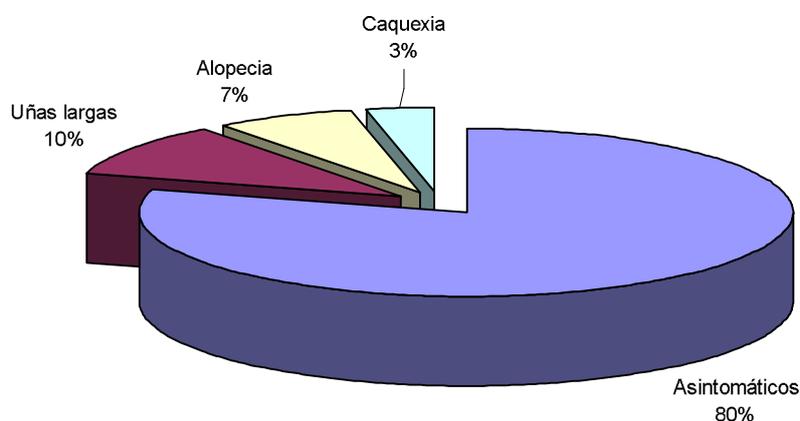
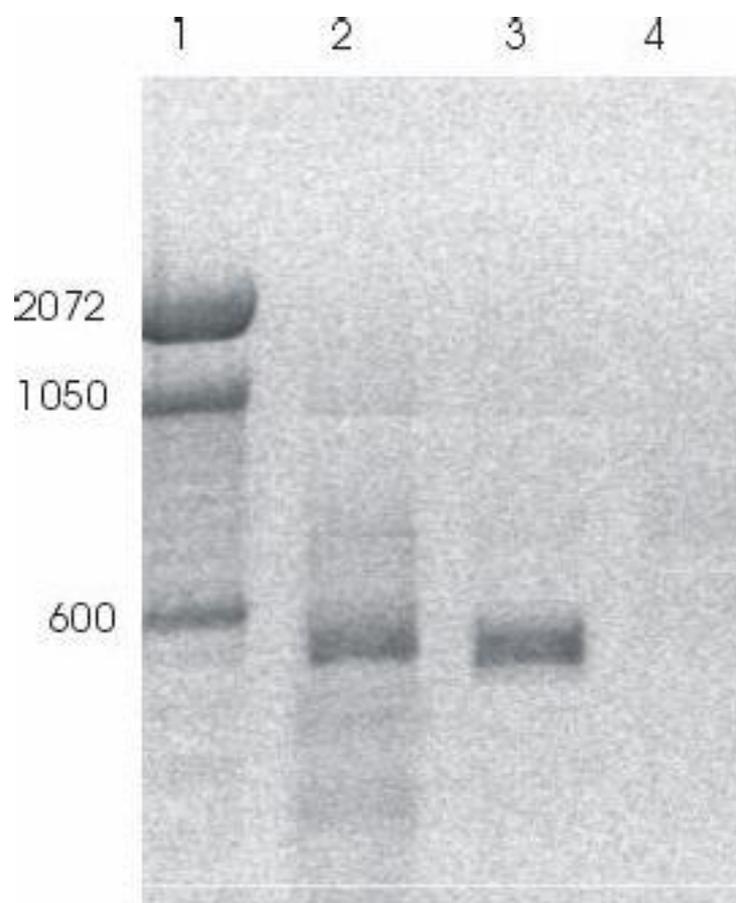


Figura 9. Porcentaje de signos encontrados en la población canina de la vereda Loma de Piedra

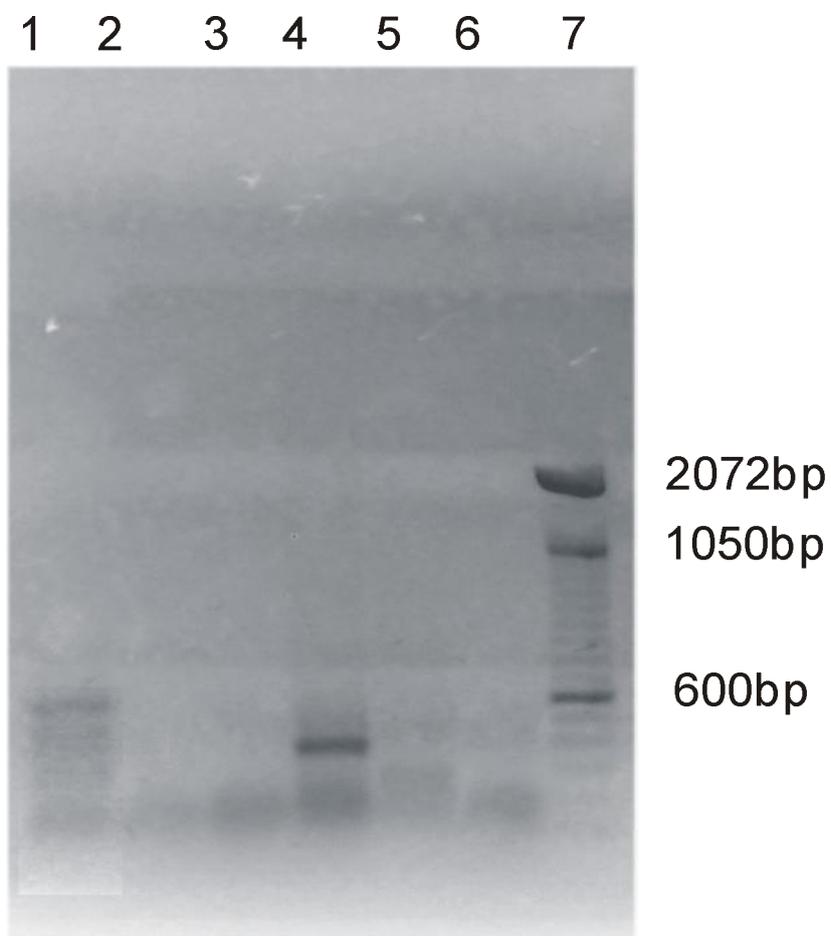
### 6.3 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Después de extraer el ADN, se procedió a realizar una amplificación de este, utilizando primero el par de oligonucleótidos Lir/13Y que amplifican la región variable del kinetoplasto de los parásitos del género *Leishmania*, se realizó un PCR con estos oligonucleótidos bajo las siguientes condiciones: 1 ciclo de 94°C por 1 min; 30 ciclos de 94°C por 30 seg, 55°C por 1min, 72°C por 1 min y un ciclo de 72°C por 5 min., con estas condiciones de temperatura y tiempo se obtuvo amplificación de fragmentos inespecíficos (resultado no mostrado), por lo cual fue necesario realizar una modificación de PCR denominado PCR-touch down con el fin de eliminar dichos fragmentos amplificados; al optimizar las condiciones para esta reacción, se estableció que con 20pmol de oligonucleótidos y 1.5 Unidades de Taq Polimerasa se obtenía una amplificación consistente, reproducible y nítida de los controles

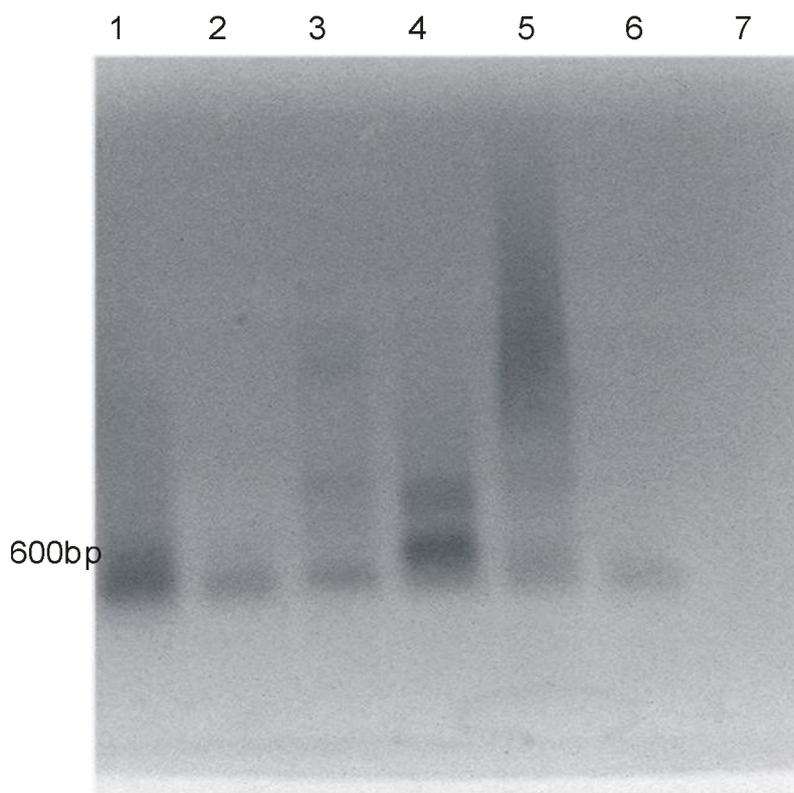
positivos (banda de 600bp) (fotografía 7), mientras que utilizando mayor concentración de oligonucleótidos se notaba un barrido en el corrido electroforético. Igualmente si se utilizaba una concentración de la enzima menor de 1.5 unidades, no se obtenía amplificación de ADN. Con estas condiciones se pudo determinar que 5 de los 29 ejemplares estudiados en Loma de Piedra presentaban infecciones naturales con *Leishmania* demostrado por el hallazgo de su ADN en sangre periférica (fotografías 8 y 9); este número de ejemplares corresponde a un porcentaje de 17.24% de la población total; en un ejemplar de la vereda El Retiro se encontró amplificación de ADN del parásito correspondiendo a un 10% del total de la población canina estudiada en esta vereda.



Fotografía 7. Amplificación de controles positivos con los oligonucleótidos Lir/13Y. Línea 1: Marcador de peso molecular de 100 bp (Gibco); línea 2: ADN de *Leishmania infantum*; línea 3: ADN de *Leishmania braziliensis*; línea 4: control negativo.

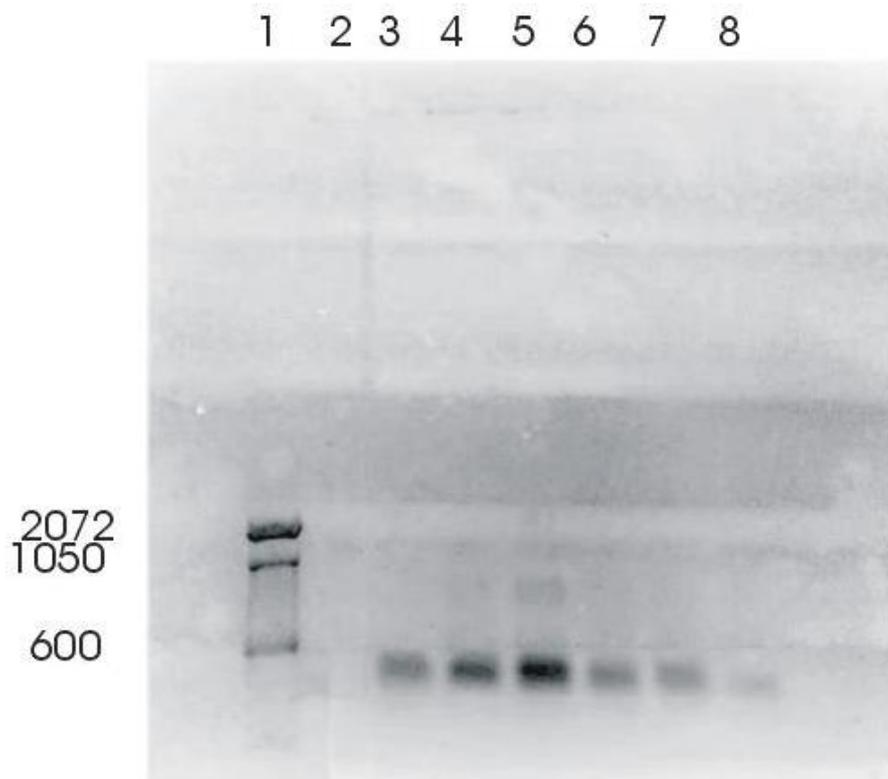


Fotografía 8. Amplificación de ADN de muestras. Línea 1: ADN *Leishmania infantum* como control positivo; líneas 2 a 5 ADN de muestras de perro en su orden así: perro 21, 22, 24 (banda), 23; línea 6: control negativo; línea 7: marcador de peso molecular de 100 bp (Gibco).

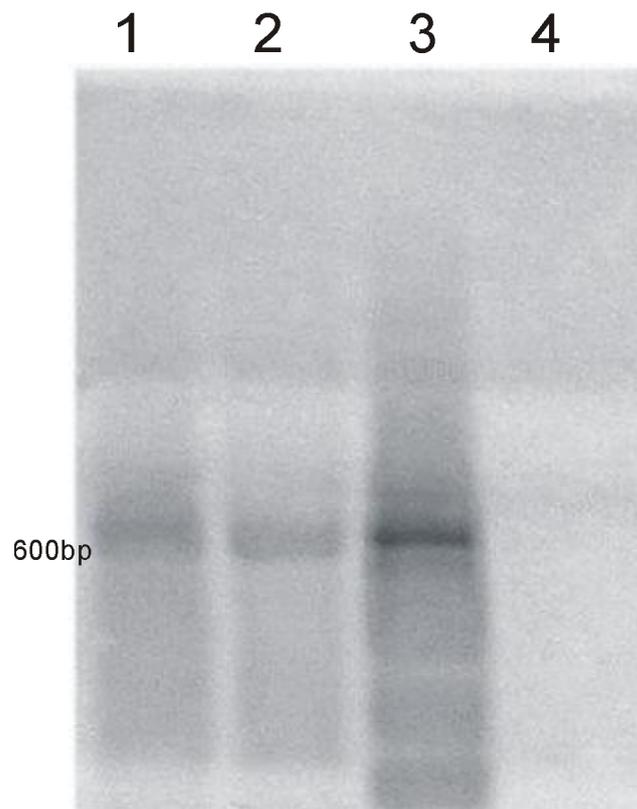


Fotografía 9. Amplificación de muestras con los oligonucleótidos Lir/13Y. Línea 1: ADN de *Leishmania infantum*; línea 2: ADN muestra perro 1; línea 3: ADN muestra de perro 3; línea 4: ADN muestra de perro 26; línea 5: ADN muestra de perro 27; línea 6: ADN muestra de perro 39; línea 7: control negativo.

Igualmente se realizó un PCR con los cebadores SSUF./SSUR, los cuales amplifican la subunidad 16 s ribosomal de los parásitos de *Leishmania*. La amplificación se llevó a cabo con las siguientes condiciones: 2.5mM de MgCl<sub>2</sub>, 0.2mM de dNTPs, 20 pmol de cada uno de lo oligonucleótidos y 1.5 Unidades de Taq Polimerasa. Empleando estos oligonucleótidos se obtuvo amplificación de ADN de *Leishmania* en un total de 6 perros (fotografía 9), corroborando el resultado obtenido con los oligonucleótidos Lir/13Y.

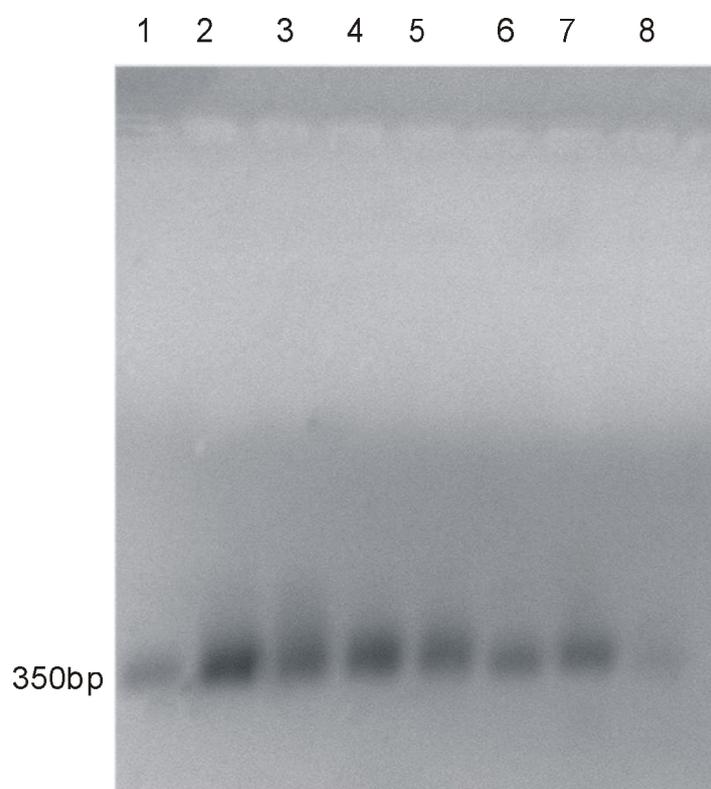


Fotografía 10. Amplificación de ADN utilizando los oligonucleótidos SUF./SSUR. Línea 1: marcador de peso molecular de 100bp (Gibco) Línea 2: control negativo; línea 3: ADN de *Leishmania infantum*; línea 4: ADN de perro 1; línea 5: ADN de perro 3; línea 6: ADN de perro 24; línea 7: ADN de perro 26; línea 8: ADN de perro 27.



Fotografía 11. Amplificación de ADN con los oligonucleótidos ssuf/ssur. Línea 1: ADN perro 27; línea 2: ADN perro 39; línea 3: ADN *Leishmania infantum*; línea 4: control negativo

Las muestras positivas en el PCR anterior, fueron sometidas a una nueva reacción con oligonucleótidos específicos para el complejo *Leishmania donovani*. En cuanto a la concentración de primers se probó la reacción con 20, 30 40 y 50 pmol (datos no mostrados), obteniéndose una mejor amplificación al utilizar 20pmol de primers y 4  $\mu$ l de muestra a un volumen final de 25  $\mu$ l (fotografía 11), en donde se obtuvo la banda de aproximadamente 350 pb en los 6 perros encontrados positivos anteriormente, confirmando que estos ejemplares estaban infectados con parásitos de *Leishmania chagasi*.



Fotografía 12. Amplificación de ADN con los oligonucleótidos Lu-5A/LC-3L. Línea 1: ADN de muestra perro 1; línea 2: ADN muestra de perro 3; línea 3: ADN muestra de perro 24; línea 4: ADN muestra de perro 26; línea 5: ADN muestra de perro 27; línea 6: ADN muestra de perro 39; línea 7: ADN *Leishmania infantum* como control positivo; línea 8: mezcla de reacción como control negativo.

## 7 DISCUSIÓN

La zona estudiada cumple con todas las condiciones requeridas para que se produzca la transmisión de la enfermedad: casas de palma, bahareque y caney; cultivos de ñame, yuca, maíz, etc, ubicados cerca de las viviendas y la presencia de perros, los cuales son parte de la forma de vida que llevan los habitantes de la región. Lo anterior se corrobora con los hallazgos encontrados en la encuesta realizada, que mostró que en el 70% de las casas existe al menos un perro; este cumple funciones como: vigilancia, compañía y caza dentro de la comunidad. Los perros muchas veces son vagabundos y de un día a otro comienzan a habitar en alguna vivienda de la comunidad en forma permanente.

El contacto del perro con el flebótomo no se dá solamente en el peridomicilio, también cuando el perro se interna en el bosque o en los cultivos; lo que significa que existe un contacto permanente y apropiado entre vector y reservorio, lo que a su vez asegura la permanencia y transmisión del parásito causante de la enfermedad dentro del foco.

En cuanto a la presencia de otros posibles reservorios, se pudo observar la poca presencia de perezosos (solo 2 ejemplares vistos durante el período de estudio) y zorros. En contraste, el número de burros (*Eqqus assinus*) es significativo, lo cual se debe a la utilización de este animal como medio de transporte y de carga; y por

lo tanto sería pertinente evaluar el papel que pueda estar desempeñando esta especie animal dentro del ciclo de vida del parásito en el foco.

Teniendo en cuenta la evaluación de signos realizada a los ejemplares caninos, el estado general de los perros era bueno, presentándose un gran porcentaje de perros sin signos, 100% en El Retiro y 80% en Loma de piedra; esto se puede deber a un curso crónico de la infección en estos animales, lo que a su vez nos haría pensar en una relación evolutiva no tan reciente entre el parásito y el perro dentro de este foco.

En la vereda El Retiro se recolectó el 41.6% del total de la población canina y en Loma de Piedra el 27.3%; las razones por las cuales no se pudo recolectar el 100% de las muestras fueron:

- Muchos perros eran recién nacidos, no aptos para la toma de la muestra.
- Algunos ejemplares eran inmanejables.
- En algunas ocasiones no se obtuvo el permiso correspondiente de los dueños.

La muestra de sangre periférica, constituye una ventaja en este tipo de estudio si se tiene en cuenta que es fácil de tomar, de procesar y por tanto de repetir (SOLANO-GALLEGO et.al, 2001), así mismo ahorra tiempo y facilita el trabajo de campo. Igualmente en el presente trabajo se comportó como una muestra que mostró buenos resultados, al igual que los obtenidos por otros autores, por ejemplo Reale et. al 1999 consideran que la muestra de sangre periférica al igual

que la muestra de aspirado de nódulo linfático combinadas con PCR tienen más precisión que IFAT en la detección de leishmaniasis en perros.

Por otra parte, el método de extracción utilizado (alta concentraciones de sales) es más rápido, menos laborioso y evita el uso de reactivos peligrosos y que para los objetivos planteados en este trabajo arrojó muy buenos resultados, pudiéndose obtener un ADN que se comportó como un buen molde en el proceso de amplificación.

La técnica de PCR tiene ventaja sobre métodos serológicos y clínicos debido a que es independiente del estado inmune al ser una prueba directa que detecta la presencia del ADN del parásito en la muestra (REALE et al., 1999). Además la utilización de oligonucleótidos que tiene como blanco el ADNk es una ventaja adicional si se tiene en cuenta la abundancia de esta molécula dentro del parásito (ASHFORD et al, 1995).

El PCR realizado con los primers Lir/13Y no arrojó ningún resultado cuando se utilizaron ciclos normales, lo cual puede deberse al alto contenido de GC de estos primers y a sus diferentes temperaturas de alineamiento. Con la variante Touch Down PCR y utilizando 1.5 unidades de Taq y 3 µl de ADN blanco se obtuvieron buenos productos. Esta variante reduce el riesgo de amplificaciones inespecíficas debido a los cambios en la temperatura de alineamiento, por lo cual es una buena opción cuando se desea identificar *Leishmania* en reservorios utilizando muestra de sangre periférica.

En cuanto a los oligonucleótidos SSUF/SSUR, mostraron un buen producto con un PCR normal por lo que son recomendable para estudios similares.

La discriminación del parásito por complejo es muy importante si se quiere incriminar a *Canis familiaris* como reservorio en el ciclo de transmisión de la leishmaniasis visceral en el foco de estudio, debido a que *Leishmania chagasi* es la responsable de esta patología; al demostrar a través de los primers LU-5A/LC-3L que efectivamente el parásito encontrado en los perros pertenece al complejo donovani, es factible pensar entonces, que el perro está desempeñando un papel como reservorio de *Leishmania chagasi* dentro del foco estudiado.

Debe tenerse en cuenta que algunos de estos animales no presentan signos de la enfermedad, lo que hace aún más difícil el control de los ejemplares que puedan estar infectados. Aunque es necesario realizar estudios que lo corroboren, por ejemplo un xenodiagnóstico, se sugiere que los perros asintomáticos encontrados positivos por PCR deben ser valorados como portadores asintomáticos de *Leishmania*, ya que se ha demostrado en otros estudios que estos son fuente de parásitos para el vector y como consecuencia juegan un papel importante en la transmisión de leishmanias (SOLANO-GALLEGO et al, 2001).

Este estudio pone en evidencia el gran número infecciones por *Leishmania* en perros dentro del foco (10% en El Retiro y 17.24% en Loma de Piedra), lo cual

debe tenerse en cuenta al momento de establecer medidas de control para la erradicación de la leishmaniasis en la región.

## 8 CONCLUSIONES

- La muestra de sangre periférica demostró ser útil para la obtención de ADN del parásito en perros, puesto que a través de ella se pudo obtener buen molde para la reacción de amplificación.
- El porcentaje de perros que fueron encontrados infectados con *Leishmania* (10% en El Retiro y 17.24% en Loma de Piedra) corroboran la importancia de este animal en el ciclo de transmisión del parásito en el foco estudiado.
- Los factores más importantes en el presente estudio para obtener buenos resultados fueron, la concentración de primers y Taq Polimerasa, al igual que la cantidad de muestra utilizadas en la reacción de amplificación, de los cuales dependió todo el proceso de identificación y detección del parásito.
- La reacción en cadena de la polimerasa demostró ser una excelente herramienta para la identificación de *Leishmania* en reservorios, ya que permitió la detección de estos inclusive en perros asintomáticos.
- De un total de 6 perros encontrados positivos en el estudio, solo 3 presentaban signos, lo cual se puede deber a una prepatencia de esta enfermedad, o el curso crónico y silencioso de esta infección en los perros, lo cual supone que en términos evolutivos la relación *Leishmania*-perro en el foco no es tan reciente.
- Se demuestra con el presente estudio el papel de *Canis familiaris* como reservorio de leishmaniasis visceral en el foco al encontrarse infectado con

*Leishmania* perteneciente al complejo donovani, siendo esto evidente con la utilización de PCR con los primers LU-5A/LC-3L específicos para este complejo.

## RECOMENDACIONES

Se recomienda realizar pruebas serológicas a la población canina para conocer la seroprevalencia de los antígenos anti-leishmania y comparar estos resultados con los encontrados en el presente estudio.

Igualmente se recomienda la utilización de otro tipo de muestra como médula ósea, aspirado de bazo, ganglio poplíteo, etc. para comparar resultados

Es importante también la realización de estudios similares en otras especies que actuarían como reservorios silvestres en el foco, tales como rata (*Rattus rattus*), burro (*Equus assinus*), perezoso, etc.

Los resultados del presente estudio conllevan a la necesidad de evaluar los programas de control teniendo en cuenta a los reservorios como elementos importantes dentro del ciclo de transmisión y teniendo en cuenta que algunos son asintomáticos.

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

AGUDELO, S y ROBLEDO, S. Revisión de tema: respuesta inmune en infecciones humanas por *Leishmania*. Iatreia.. 2000. Vol 13 Nº 3.

ALVAR J et al. El perro como reservorio de la leishmaniosis. Medicine Veterinary Vol 12.1995. p 431-438.

ASHFORD D, et al. Comparison of the Polymerase Chain Reaction and Serology for the Detection of Canine Visceral Leishmaniasis. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. 1995. 53:251-255.

BARKER, Douglas C. et al. Use of PCR to Detect *Leishmania* (*Viannia*) spp. in Dog Blood and Bone Marrow. Journal of Clinical Microbiology. Vol. 38, Nº 2. 2000, p. 748-751.

BLUM, J. A model for RNA Editing in Kinetoplastid Mitochondria: "guide" RNA Molecules Transcribed from Maxicircle ADN Provide the Edited Information. CELL. Vol 60. 1990. p.189-198.

BOTERO, D y RESTREPO, M. Parasitosis Humanas. 3 ed. Corporación para Investigaciones Biológicas. 1998. 457 p.

CAMACHO, M. The Distribution of Kala-azar in Colombia, South America. Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. Vol. 72. 1978. p. 544-545.

CANESE, A et al. Focos de leishmaniasis visceral canina en las ciudades de Lambaré y Villa Elisa, Paraguay. 1998.

COCHERO, S. y BLANCO P. Papel de *Lutzomyia evansi* como vector de leishmaniasis visceral en un foco en los Montes de María. Sincelejo. 2003. 110 p. Trabajo de grado (Biólogo con énfasis en Biotecnología). Universidad de Sucre. Facultad de Educación y Ciencias. Departamento de Biología.

CORDERO DEL CAMPILLO M y ROJO VASQUEZ F. Parasitología Veterinaria. España: McGraw-Hill Interamericana. 1999. 968 p.

DASSSALUD. Informe de casos de Leishmaniasis en el Departamento de Sucre. 2000.

HARRIS, E et al. Single-Step Multiplex PCR Assay for Characterization of New World *Leishmania* Complexes. Journal of Clinical Microbiology. Vol 36, N° 7. 1998. p 1989-1995.

HERNÁNDEZ, S. y MARTÍNEZ, A. Leishmaniosis Canina. En: Avances en Parasitología : Protozoología. M Sanmartín. Universidad de Santiago de Compostela. 1992.

LACHAUD, L et al. Comparison of Six PCR methods using Peripheral Blood for Detection of Canine Visceral Leishmaniasis. Journal of Clinical Microbiology Vol. 40 N° 1. 2002 p 210-215.

\_\_\_\_\_. Comparison of Various Sample Preparation Methods for PCR Diagnosis of Visceral Leishmaniasis Using Peripheral Blood. Journal of Clinical Microbiology Vol. 39, N° 2. 2001 p 613-617.

\_\_\_\_\_. Optimized PCR using Patient Blood Samples for Diagnosis and Follow-up of Visceral Leishmaniasis, with Special Reference to AIDS patients. Journal of Clinical Microbiology Vol 38 N° 1. 2000 p 236-240.

LAINSON et al. Memorias del Instituto Oswaldo Cruz. Vol. 85. 1990. p 135-137.

LEVINE, N. et al. A Newly Revised Classification of the Protozoology. Vol. 27.1980. p.37-58.

LÓPEZ, M. Y BLANCO, P. Caracterización de Parásitos de un Foco Mixto de Leishmaniasis en los Montes de María-Sucre 1998 usando PCR y RAPD-PCR. Sincelejo, 2000. 100 p. Trabajo de grado (Biólogo con énfasis en Biotecnología).

Universidad de Sucre. Facultad de Educación y Ciencias. Departamento de Biología.

MARTÍNEZ MORENO A et al. Humoral and Cell-Mediated-Immunity in Natural and Experimental Canine Leishmaniasis. *Veterinary Immunology* Vol 48. 1995. 209-220.

MARTÍNEZ FERNÁNDEZ, A. et al. Diagnóstico de las Parasitosis En: *Parasitología Veterinaria*. España : McGraw-Hill Interamericana. 1999. 158-177.

MARTÍNEZ MORENO, A. et.al. Leishmaniasis canina En: *Parasitología Veterinaria*. España : McGraw-Hill Interamericana. 1999. 652-665.

McPHERSON J; QUIRKE P y TAYLOR G.R. PCR : A practical Approach. New York IRL Press.. 1993.

MINISTERIO DE SALUD, COLOMBIA.. *Leishmaniasis*. Guía integral de Manejo. 1995. 296p.

NOYES, H. et al. A Nested-PCR-Based Schizodeme Method for Identifying *Leishmania* Kinetoplast Minicircle Classes Directly from Clinical Samples and Its Application to the study of the Epidemiology of *Leishmania tropica* in Pakistan. *Journal of Clinical Microbiology*. Vol. 36 N° 10. 1998. p 2877-2881.

ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD. En: *The leishmaniasis*. Technical report series 701. World Health Organization (edit.), Ginebra. 1984. 140 p.

ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD. Epidemiología Diagnóstico, Tratamiento y Control de la *Leishmaniasis* en América Latina. Organización Panamericana de la Salud. 1994.280p.

ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD, 2001. Leishmaniasis Control home page en línea: <http://www.who.int/ctd/html/leis.html>

PINELLI E et al. Cellular and Humoral Immune-Responses in Dogs Experimentally and Naturally Infected with *Leishmania infantum*. Infection Immunology. Vol 62. 1994. 229-235.

REALE, S. et al. Detection of *Leishmania Infantum* in Dogs by PCR with Lymph Node Aspirates and Blood. Journal of Clinical Microbiology. Vol 37, Nº 9. 1999, p. 2931-2935.

REITHINGER, R. et al. Use of PCR to Detect *Leishmania (Viannia)* spp. In Dog Blood and Bone Marrow. Journal of Clinical Microbiology. Vol. 38 Nº 2. 2000 p 748-751.

SAIKI, R. et al. Enzymatic Amplification of  $\beta$ -globin Genomic Sequences and Restriction Site Analysis for Diagnosis of Sickle Cell Anemia. *Science*. Vol.230. 1985. p.1350-1354

SOLANO GALLEGO, L. et. al. Prevalence of *Leishmania infantum* Infection in Dogs Living in an Area of Canine Leishmaniasis Endemicity Using PCR on Several Tissues and Serology. *Journal of Clinical Microbiology*. Vol 39, N° 2. 2001, p 560-563.

STRAUSS-AYALI D, y BANETH, G. Canine Visceral Leishmaniasis. En: Recent Advances in Canine Infectious Diseases, Carmichael L. Ithaca : International Veterinary Information Service, 2001; A0107.0300. Disponible en [www. ivis.org](http://www.ivis.org).

TARASSOFF, I., Leuchenko, I., Zaitseve, G. Transcripts of the Maxicircle Kinetoplast ADN of *crithidia oncopelti*. *Molecular and Biochemical Parasitology*. Vol 26. 1987. p.235-245.

TRAVI, B et al. Canine Visceral Leishmaniasis : Dog Infectivity to Sand Flies from Non-Endemic Areas. *Research in Veterinary Science*. Vol 72. 2002. p 83-86.

TRAVI, B et al. Dynamics of *Leishmania chagasi* infection in Small Mammals of the Undisturbed and Degraded Tropical dry Forests of Northern Colombia. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. Vol 92. 1998. p 275-278.

VELEZ, I. et al. Evaluación ecoepidemiológica de la Leishmaniosis visceral en la comunidad indígena Zenú de San Andrés de Sotavento ,Córdoba: Primer paso para su control. Revista Colombiana de Entomología. Vol.21 N°3. 1995. p.111-122.

WALTON, B. Leishmaniasis en las Américas, Situación Actual y Alternativas para su Control OPS/HCP/HCT/82/96. Organización Panamericana de la Salud. 1996.

## BIBLIOGRAFÍA COMPLEMENTARIA

ATIAS, A. Parasitología Clínica. 3ª ed. Santiago de Chile : Mediterráneo. 1991. 618p.

GETTY, Robert. Anatomía de los Animales Domésticos. 5ª. Ed Tomo II. Barcelona : Salvat editores, S.A: 1982. 2302 p..

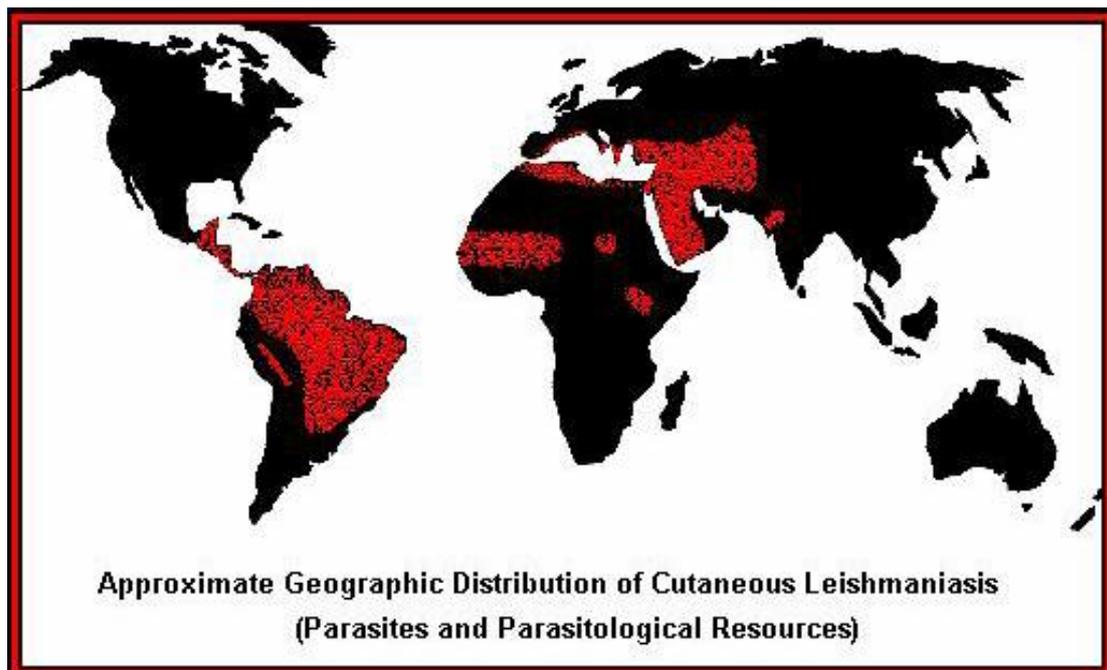
LE PAPE, P. Estudio Ecoepidemiológico de la Leishmaniasis Visceral en el Departamento de Sucre: Pautas para su Control. Biomédica, II, supplement I, Julio 1991.p.29-30

ROBBINS. Patología Estructural y Funcional. 6ª ed. Estados Unidos: McGraw-Hill Interamericana. 1999. 1473p.

# ANEXOS

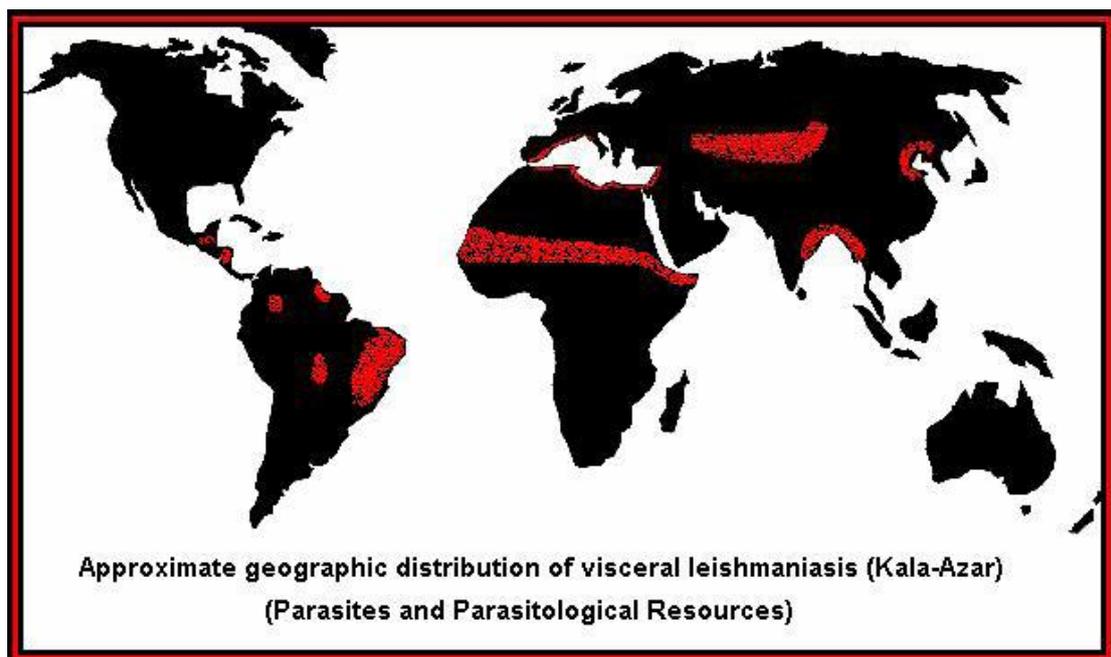
## ANEXO A

Distribución geográfica de leishmaniasis cutánea



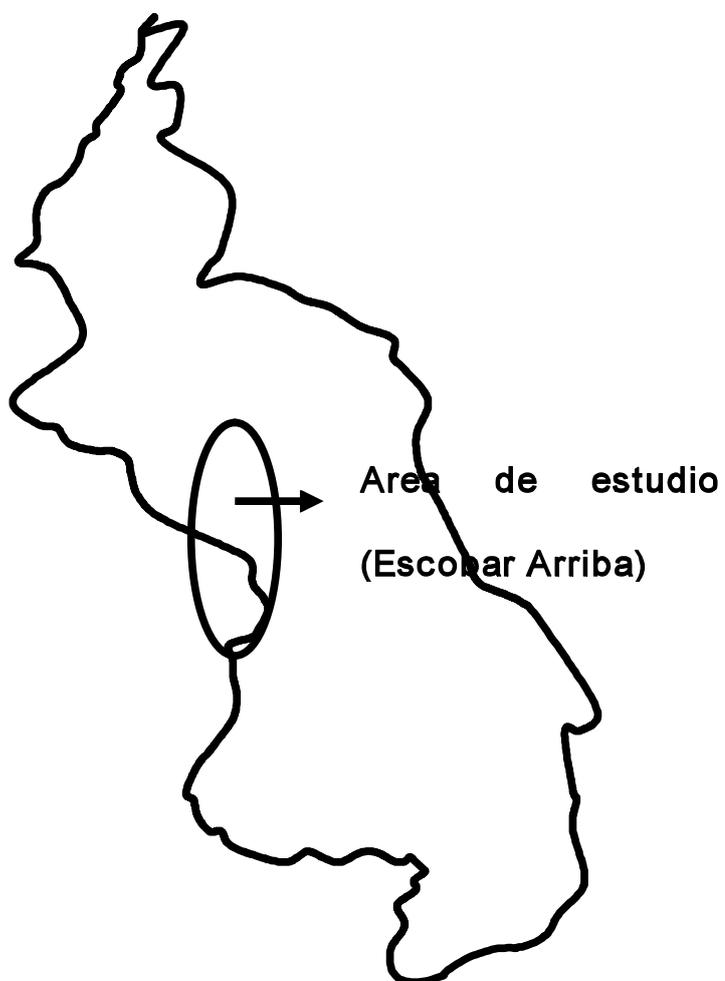
## ANEXO B

## Distribución geográfica de leishmaniasis visceral



ANEXO C

Mapa del Departamento de Sucre



ANEXO D

Formas clínicas de leishmaniasis: cutánea y visceral



## ANEXO E

## Información de ejemplares caninos

PERROS	SEXO	EDAD	SIGNOS	VEREDA	DUEÑO	RESULTADO
Laica	F	2 años	No tiene	Sincelejo	Servio Tulio	Negativo
Guardián	M	4 años	No tiene	Loma de piedra	Marcos Suárez	Positivo
Tarzán (p2)	M	1 1/2 años	Uñas largas	Loma de piedra	Marcos Suárez	Negativo
La mocha	F	5 años	No tiene	Loma de piedra	Miriam Montes	Positivo
Aparecido	M	no sabe	No tiene	Loma de piedra	Sra. Santana	Negativo
Sin Nombre	M	no sabe	No tiene	Loma de piedra	Gregorio	Negativo
peluche (p6)	M	9 meses	No tiene	Loma de piedra	Juliana	Negativo
Solita (p7)	F	2 años	No tiene	El retiro	Silvio Bustamante	Negativo
Luqui (p8)	M	4 meses	No tiene	El retiro	Silvio Bustamante	Negativo
Solita (p9)	F	3 años	No tiene	La Zona Caré	Jasmina	Negativo
Chile (p10)	M	1 año	No tiene	La Zona Caré	Ebaristo	Negativo
Collalito	F	3 años	No tiene	La Zona Caré	Beatriz	Negativo
Soraya (p12)	F	3 años	No tiene	Loma de piedra	Dairo	Negativo
La	F	4 años	No tiene	Loma de piedra	José Murillo	Negativo
La negrita	F	1 año	No tiene	Loma de piedra	Luis Luzperuza	Negativo
La Cariño	F	2 años	No tiene	Loma de piedra	Vicente	Negativo
El carnivero	M	1 1/2 años	No tiene	Loma de piedra	Dairo	Negativo
Lucero (p17)	F		No tiene	La Zona Caré		Negativo
Farol (p18)	M	7 meses	No tiene	El retiro	Guillermina Herrera	Negativo
Pinzona	F	2 años	No tiene	El retiro	Gregorio Rodriguez	Negativo
Viagra (p20)	F	1 1/2 año	No tiene	El retiro	Gregorio Rodriguez	Negativo
Chocolate	M	5 años	No tiene	El retiro	Uriel Cantero	Negativo
Yupi (p22)	F	2 años	No tiene	El retiro	Eleodoro Carés	Negativo
Tarzán (p23)	M	1 año	No tiene	El retiro	Atilano Rodríguez	Negativo
Terror (p24)	M	7 meses	No tiene	El retiro	Faustino Rodríguez	Positivo

La conquista	F	1 año	No tiene	El retiro	Angela Rodríguez	Negativo
Rinti (p26)	M	6 meses	Alopecia	Nueva Estrella	Germán Márquez	Positivo
La Negra	F	2 años	Caquexia	Nueva Estrella	Germán Márquez	Positivo
Amada (p28)	F	4 meses	No tiene	Terminal I	Casildo Nisperuza	Negativo
Nerón (p29)	M	2 años	No tiene	Terminal I	Lila Nisperuza	Negativo
Washintong	M	2 años	No tiene	Terminal I	Juan Nisperuza	Negativo
Rambo (p31)	M	1 1/2 año	No tiene	Tamarindo	Cesar Pérez	Negativo
El Negro (p)	M	11/2 año	No tiene	Tamarindo	Hilda Márquez	Negativo
Pekin (p33)	M	4 años	No tiene	Tamarindo	Antonio Osorio	Negativo
Chayane	M	2 años	Uñas largas	Tamarindo	Argemiro Zabala	Negativo
Lasi (p35)	F		Uñas largas	Tamarindo		Negativo
Juanchito	M	6 años	No tiene	Tamarindo	Omar Gonzalez	Negativo
Gaviota (p37)	F	4 meses	No tiene	El Hobo (Loma)	Uribe Nisperuza	Negativo
Pilín (p38)	M	13 meses	No tiene	El Hobo (Loma)	Yolanda Nisperuza	Negativo
Chocolate	F	2 años	Alopecia	El Hobo (Loma)	Humberto Herrera	Positivo