

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
ESCUELA DE MEDICINA VETERINARIA



“DETERMINACIÓN DE ANTICUERPOS CONTRA *Leishmania braziliensis* POR MEDIO DE ELISA Y PRESENCIA DE AMASTIGOTES EN PERROS EN EL MUNICIPIO DE DOLORES, PETÉN”

SILVIA MARÍA RODRÍGUEZ PINEDA

MÉDICA VETERINARIA

GUATEMALA, FEBRERO 2011

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
ESCUELA DE MEDICINA VETERINARIA

**“DETERMINACIÓN DE ANTICUERPOS CONTRA *Leishmania braziliensis* POR
MEDIO DE ELISA Y PRESENCIA DE AMASTIGOTES EN PERROS EN EL
MUNICIPIO DE DOLORES, PETÉN”**

TESIS

PRESENTADA A LA HONORABLE JUNTA DIRECTIVA DE LA FACULTAD DE MEDICINA
VETERINARIA Y ZOOTECNIA DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA

POR

SILVIA MARÍA RODRÍGUEZ PINEDA

AL CONFERÍRSELE EL GRADO ACADÉMICO DE

MÉDICA VETERINARIA

GUATEMALA, FEBRERO 2011

JUNTA DIRECTIVA
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA

DECANO: Med. Vet. LEONIDAS ÁVILA PALMA
SECRETARIO: Med. Vet. MARCO VINICIO GARCÍA URBINA
VOCAL I: Med. Vet. YERI EDGARDO VÉLIZ PORRAS
VOCAL II: MSc. Med. Vet. FREDY ROLANDO GONZÁLEZ GUERRERO
VOCAL III: Med. Vet. y Zoot. MARIO ANTONIO MOTTA GONZÁLEZ
VOCAL IV: Br. SET LEVI SAMAYOA LÓPEZ
VOCAL V: Br. LUIS ALBERTO VILLEDA LANUZA

ASESORES

Med. Vet. MANUEL EDUARDO RODRIGUEZ ZEA
Med. Vet. CARLOS ENRIQUE CAMEY RODAS
Med. Vet. BLANCA JOSEFINA ZELAYA DE ROMILLO

HONORABLE TRIBUNAL EXAMINADOR

EN CUMPLIMIENTO CON LO ESTABLECIDO POR LOS ESTATUTOS DE LA
UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA, PRESENTO A SU
CONSIDERACIÓN EL TRABAJO DE TESIS TITULADO:

**“DETERMINACIÓN DE ANTICUERPOS CONTRA *Leishmania braziliensis* POR
MEDIO DE ELISA Y PRESENCIA DE AMASTIGOTES EN PERROS EN EL
MUNICIPIO DE DOLORES, PETÉN”**

QUE FUERA APROBADO POR LA JUNTA DIRECTIVA DE LA FACULTAD DE
MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

COMO REQUISITO PREVIO A OPTAR AL TÍTULO PROFESIONAL DE

MÉDICA VETERINARIA

AGRADECIMIENTOS

A mis papas: por su amor, eterno apoyo, sus enseñanzas, comprensión y por siempre empujarme para dar más y lo mejor de mi.

A mis hermanos: por su apoyo, su ejemplo y buenos consejos.

A mis asesores: por su ayuda, tiempo y todos los conocimientos brindados para poder llevar a cabo esta tesis.

A mis catedráticos: por compartir sus conocimientos y su amistad.

A Nidia Rizzo: porque sin ella este proyecto no lo hubiera podido realizar.

A U.del Valle: en especial a Nancy Cruz, Nazario y Rodrigo Gramajo.

Al PECET: por toda su ayuda, paciencia y hospitalidad en especial a Daniel.

A mis amigos: por su amistad, apoyo y las experiencias vividas durante años, en especial a Paola, Jose, Octavio, Khrista, Picho, Pedro, Miche, Jacqueline, Anajoyce y Gaby.

ÍNDICE

I.	INTRODUCCIÓN	1
II.	HIPÓTESIS	2
III.	OBJETIVOS	3
	3.1 General	3
	3.2 Específicos	3
IV.	MARCO TEÓRICO	4
	4.1 Etiología	4
	4.2 Clasificación taxonómica	4
	4.3 Morfología	4
	4.4 Ciclo de vida	4
	4.5 Vía de Transmisión	5
	4.6 Predisposición	6
	4.7 Patogenia	6
	4.8 Periodo de incubación	6
	4.9 Signos clínicos	7
	4.10 Diagnostico	7
	4.10.1 Signos clínicos	7
	4.10.2 Laboratorio clínico	7
	4.10.3 Técnica parasitológica	8
	4.10.3.1 Microscopio	8
	4.10.3.2 Cultivos	9
	4.10.4 Pruebas serológicas	9
	4.10.4.1 ELISA	9
	4.10.5 Técnicas de biología molecular	9
	4.11 Diagnostico diferencial	10
	4.12 Prevención y control	10
	4.13 Tratamiento	10
V.	MATERIALES Y MÉTODOS	12
	5.1 Recursos humanos	12
	5.2 Materiales biológicos	12
	5.3 Materiales de campo	12
	5.4 Materiales de laboratorio	13
	5.5 Muestreo de campo	13
	5.6 Toma de la muestra	14
	5.7 Metodología	14
	5.8 Método estadístico	15
VI.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	16
VII.	CONCLUSIONES	21
VIII.	RECOMENDACIONES	22
IX.	RESUMEN	23
X.	BIBLIOGRAFÍA	24
XI.	ANEXOS	26

I. INTRODUCCIÓN

La Leishmaniasis es una enfermedad infecciosa tanto de los animales como de los humanos, causada por un protozoo del género *Leishmania*. Existen tres tipos de forma de leishmaniasis, dependiendo del agente causal: la visceral, cutánea y mucocutánea. En esta ocasión se trabajará con *Leishmania braziliensis*, que es la causante de la leishmaniasis cutánea en los perros. La Leishmaniasis es transmitida por el vector *Lutzomyia* sp (“la mosca de los arenales”) y es predominante en las áreas tropicales y subtropicales como Petén. Los perros son considerados los principales reservorios de esta enfermedad. La Leishmaniasis siendo una enfermedad zoonótica es un problema de salud pública muy importante que está creciendo cada vez más. La enfermedad en los humanos está confirmada en 88 países, de ellos 22 en América incluyendo Guatemala; 12 millones de personas están afectadas en todo el mundo.

El estudio se realizó en un área endémica de Leishmaniasis humana, en el municipio de Dolores, en el departamento de Petén. Comprobando la presencia de la enfermedad se desea hacer conciencia para tomar medidas preventivas; como sería la colocación de collares de deltametrina a los perros pues ésta tiene una acción prolongada de hasta 6 meses. Teniendo resultados confiables se puede tomar acción respecto a esta enfermedad aunque sea en un área del país.

Este estudio se efectuó por medio de la prueba serológica de ELISA y por medio de un frote sanguíneo con sangre periférica. La serología demuestra anticuerpos contra Leishmaniasis cutánea y en el frote sanguíneo se observa la presencia del amastigote que es la fase infectiva en el huésped. Un resultado positivo en la serología sólo puede ser interpretado como evidencia que hubo contacto con el agente infeccioso; es por esto, que se hizo el frote sanguíneo en busca del amastigote para confirmar la presencia de la enfermedad.

II. HIPÓTESIS

- Los perros del municipio de Dolores, Petén tienen anticuerpos contra *Leishmania braziliensis*.
- Se encontrarán amastigotes de *Leishmania braziliensis* en los frotos sanguíneos realizados a los perros del municipio de Dolores, Petén.

III.OBJETIVOS

3.1 General

Determinar la presencia de *Leishmania braziliensis* en perros, en el municipio de Dolores, Petén.

3.2 Específicos

- Determinar la presencia de anticuerpos contra *Leishmania braziliensis* en perros por medio de ELISA.
- Determinar presencia de amastigotes de *Leishmania braziliensis* por medio de frote sanguíneo.
- Establecer correlación entre los métodos de diagnóstico ELISA y frote sanguíneo para *Leishmania braziliensis*.
- Determinar una relación entre los caracteres epidemiológicos y los casos positivos de *Leishmania braziliensis* en los perros.
- Notificar a Salud Pública los resultados de este estudio.

IV. MARCO TEÓRICO

La Leishmaniasis es una enfermedad metazoontica que es transmitida en su mayoría por la mosca de los arenales y causada por un protozoo intracelular obligatorio del género *Leishmania*.

4.1 ETIOLOGÍA

La Leishmaniasis resulta de la infección de varias especies de *Leishmania*, un parásito protozoo unicelular dimorfo. Al menos 23 especies y subespecies son patógenas para los mamíferos. En este caso se enfocará en la especie *Leishmania braziliensis*. (5)

4.2 CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA

Protozoo unicelular dimorfo del Phylum protozoa, Subphylum sarcomastigophora, superclase Mastigophora, clase Zoomastigophora, orden Kinetoplastida, familia Trypanosomatidae, género *Leishmania*. (5)

4.3 MORFOLOGÍA

Promastigote fusiforme, mide de 12 a 20 μm (15- 25 μc de largo y 1.5-3.5 μc de ancho), tiene un núcleo central y un flagelo anteronuclear que nace del cuerpo basal situado delante del cinetoplasto. Los amastigotes (cuerpos de *Leishman-Donovan*), son redondeados, miden 2.5 a 3.5 μm de diámetro, tienen un núcleo grande excéntrico y un cinetoplasto que consta de blefaroplasto y cuerpo basal, de donde nace un rizoplasto que se convierte en flagelo en el promastigote. (13)

4.4 CICLO DE VIDA

En su ciclo de vida tiene dos estadios: 1) flagelado o promastigote, que es extracelular, se encuentra en el vector 2) aflagelado o amastigote que es intracelular obligado y se encuentra en las células fagocíticas del huésped vertebrado. (Ver Figura 1) (13)

La hembra hematófaga de la *Lutzomyia* requiere sangre para el desarrollo de los huevos y adquiere el parásito al ingerir sangre con macrófagos infectados de un huésped vertebrado. Si el vector es apto inicia un proceso de maduración y diferenciación que dura de 4 a 25 días, los amastigotes se transforman a promastigotes pro cíclicos (forma flagelada inmadura), y se adhieren al epitelio del intestino medio de la mosca mediante la molécula lipofosfoglicano (LPG). Este promastigote madura y se transforma en promastigote metacíclico infectante. Por cambios en las moléculas de LPG el parásito se desprende del epitelio intestinal y migra a la faringe y la cavidad bucal del díptero. (13)

Cuando la *Lutzomyia* hembra, infectada con promastigotes, intenta nuevamente ingerir sangre mediante una picadura, el insecto regurgita el parásito y lo introduce a la piel transmitiéndoselo al huésped. La saliva del insecto contiene anticoagulantes y sustancias activas que modulan la respuesta inmune del huésped. Los promastigotes son fagocitados por los macrófagos, células de Langerhans epidérmicas o monocitos circulantes. Una vez dentro de los fagolisosomas se diferencia en amastigote, se reabsorbe su flagelo y prolifera intensamente por fisión binaria, provocando el rompimiento de la célula. (4,13)

4.5 VÍA DE TRANSMISIÓN

La mosca flebotomina es el vector de la Leishmaniasis. Es de la familia Psychodidae con el nombre común de “mosca de los arenales” del género *Lutzomyia*. Existen varias especies entre las más abundantes en Guatemala y que pican al hombre están: *Lutzomyia panamensis*, *Lu. evansi*, *Lu. ovallesi*, *Lu. ylephiletor*, *Lu. olmeca olmeca* y *Lu. shannoni*. La mosca de los arenales tiene un rango de vuelo de pocos kilómetros y vuelan a pocos centímetros del suelo. Habitan en planicies bajas y húmedas, proliferan en temporadas de lluvias. Es un díptero de actividad crepuscular y nocturna. (8)

Los casos de Leishmaniasis fluctúan dependiendo en la población de los vectores. En perros se ha documentado la transmisión vertical (transplacentaria y transmamaria) , transmisión venérea y se han reportado casos raros de transmisión directa horizontal entre perros al estar en contacto con sangre infectada. También han ocurrido transmisiones por transfusión sanguínea. (5,7,12)

4.6 PREDISPOSICIÓN

Puede afectar a cualquier perro, pero el Dobermann Pinscher y el Pastor Alemán son dos de las razas predispuestas. Afecta a perros mayores de un año de edad. (5)

4.7 PATOGENIA

Después de la infección al huésped con promastigotes de Leishmania, los macrófagos los fagocitan convirtiéndolos en amastigotes. Luego, dos tipos de respuesta inmune pueden ocurrir, haciendo al perro sensible o resistente a la enfermedad. La resistencia se asocia a la activación de las células Th1 produciendo interferón gama e interleucina-2. La sensibilidad y enfermedad progresiva está relacionada con la activación de las células Th2 produciendo interleucina-4. La proliferación de células B y producción de anticuerpos no protegen. La respuesta humoral es responsable de los altos niveles de gama globulinas en el suero. (7,12)

La lesión primaria en la Leishmaniasis canina consiste en una reacción inflamatoria granulomatosa con macrófagos, linfocitos y células plasmáticas parasitadas y no parasitadas. La reacción inflamatoria puede estar presente en cualquier parte del cuerpo incluyendo articulaciones y sistema nervioso central. (1,4)

4.8 PERÍODO DE INCUBACIÓN

El período de incubación puede abarcar desde los 3 meses hasta varios años. Se han reportado casos de períodos de hasta 7 años. (1,4)

4.9 SIGNOS CLÍNICOS

Los signos clínicos de la Leishmaniasis canina son muy variables, usualmente es una enfermedad crónica. Linfadenomegalia, lesiones cutáneas y letargia son las manifestaciones más comunes. Entre las lesiones cutáneas se encuentran alopecia, úlceras (en orejas y extremidades) y costras. La ulcera tiene características que sirven de referencia para llegar a un diagnóstico. La forma de la ulcera es usualmente hemisférica, la superficie es granulosa, sucia y recubierta por costras melisérico-hemáticas, los bordes son elevados e indurados. Otros signos pueden ser pérdida de peso, pirexia intermitente, signos gastrointestinales (diarrea y vómitos), manifestaciones oculares como uveítis, blefaritis o queratoconjuntivitis. En su forma más severa, puede ocurrir fallo renal y hemorragias, principalmente epistaxis. Otras manifestaciones atípicas son neuralgia, poliartritis, polimiositis, lesiones osteolíticas y periostitis proliferativa. (1,3,5)

4.10 DIAGNÓSTICO

Existen varios métodos de diagnóstico, entre éstos podemos encontrar:

4.10.1 SIGNOS CLÍNICOS: Los signos clínicos solos no son suficientes ni confiables, más de 50% de los casos positivos pueden ser asintomáticos. Puede existir confusión con respecto a las úlceras ya que algunas lesiones no son las típicas úlceras.

4.10.2 LABORATORIO CLÍNICO:

1. Hiperproteinemia
2. Hipergammaglobulinemia
3. Anemia hiporegenerativa

4. Leucocitosis
5. Trombocitopenia
6. Azotemia
7. Proteinuria (1,3,5)

4.10.3 TÉCNICA PARASITOLÓGICA: Observación directa del parásito.

4.10.3.1 Microscopio: Los amastigotes de la Leishmania pueden ser observados en frotos obtenidos por aspiración con aguja fina de nódulos linfáticos, de medula ósea, bazo o con sangre periférica. También pueden ser identificados con improntas o biopsias de las lesiones cutáneas o de los nódulos. Los frotos citológicos pueden ser teñidos con Giemsa o Wright. Se debe señalar que la sensibilidad del frote con sangre periférica oscila entre 50 y 68% dado que en la sangre, los amastigotes intracelulares se desarrollan rápidamente dentro de los 28 días postinfección, para luego desaparecer usualmente en los 30 días subsecuentes, esto condiciona su rendimiento en los casos crónicos o subclínicos debido que la parasitemia es de baja cantidad. La posibilidad de efectuar el diagnóstico a partir de sangre periférica es importante al ser menos invasivo. (5,9)

Frote sanguíneo: Se realiza colocando un gota de la sangre periférica a utilizar en la punta del porta objetos, utilizando otro portaobjetos se desliza la gota hacia el otro extremo dejando una fina capa para poder observar las células. El portaobjetos se deja para que se seque unos instantes, luego se utiliza metanol para fijar la lámina. La fijación es esencial para una coloración posterior y buena presentación celular. La coloración se realizó con tinción de Giemsa. (6)

- 4.10.3.2 Cultivos: Puede ser cultivado de tejido contaminado, obtenido de un aspirado en el borde de una úlcera. Se puede utilizar el medio de Evans mezclado con sangre de conejo desfibrinada al 20%. Como sobrenadante se utiliza el medio Schneider, suplementado con 20% de suero bovino fetal mas 100µg de penicilina y 100µg de amikacina. A pesar de ser un método oneroso, el cultivo permite confirmar el diagnóstico donde los frotos han sido negativos. (5,8)
- 4.10.4 PRUEBAS SEROLÓGICAS: Detección de anticuerpos contra *Leishmania* es esencial para el diagnóstico de la *Leishmania* canina. Existen varias pruebas, IFAT (indirect immuno-fluorescent antibody test), CFT (complement fixation test) , ELISA (enzyme-linked immuno-sorbent assay), DAT (direct agglutination test), Prueba de látex y Western blot. Un resultado positivo sólo demuestra que hubo contacto con el agente infeccioso. (1,3)
- 4.10.4.1 ELISA: detecta anticuerpos específicos contra antígenos de *Leishmania braziliensis* que permiten definir si el perro ha estado expuesto a la infección por el parásito. El uso de enzimas como marcadores permite detectar los complejos Ag-Ac formados con la ayuda de sustratos específicos para la enzima. Si el sustrato genera productos solubles, estos se pueden medir con la ayuda de un espectrofotómetro donde la formación del producto se asocia con el revelado de un color cuya intensidad será proporcional a la cantidad del producto formado. Éste está basado en una solución de antígenos extraídos de promastigotes de una *Lutzomyia* sp. cultivado en un medio libre de proteínas. El plato incluye 96 fosas para realizar 92 pruebas pues 4 fosas son para control. (12)
- 4.10.5 TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR: El DNA de la *Leishmania* puede ser detectado por medio de PCR (Polymerase Chain Reaction). Esta técnica es utilizada cada vez más pues, es muy específica y sensible. Es muy útil en portadores asintomáticos. (11)

4.11 DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL

La Leishmaniasis canina puede confundirse con otras enfermedades como lo son demodicosis, pénfigo, lupus eritematoso, ehrlichiosis, linfoma, glomerulonefritis y poliartritis. (11)

4.12 PREVENCIÓN Y CONTROL

Se fabricó una vacuna utilizando promastigotes de *L. infantum* en el Sur de Francia pero los resultados no fueron muy positivos. En la actualidad se está trabajando con vacunas genéticas. (4)

Las medidas de control en las áreas endémicas se deben enfocar en el vector, la mosca de los arenales, y en los perros que se cree pueden ser los reservorios principales. Se deben mantener a los perros dentro de las casas en las tardes y utilizando collares con deltametrina se ha demostrado que se reduce la prevalencia de la infección. (11)

Para la desinfección de fómites en contacto con las especies de Leishmania, éstos pueden ser inactivados con hipoclorito de sodio al 1%, glutaraldehído al 2% o formaldehído. También son susceptibles al calor, 50-60°C. (6)

4.13 TRATAMIENTO

No se conoce ningún tratamiento que sea 100% efectivo pues no se logra la completa eliminación del parásito. Existen varios tratamientos.

* **Allopurinol.** Con una dosis de: 20 mg/kg/día-per os. EL producto es fácil de administrar vía oral y no tiene un alto costo. Allopurinol es el tratamiento mas recomendado.

* **Antimoniales.** El protocolo más común de esta familia es el Glucantime con una dosis de: 100mg/kg/día-SC durante 4 semanas. Después de varias

inyecciones la terapia puede ser dolorosa y tiene un alto costo. Puede crear resistencia.

* **Pentamidina.** Con una dosis de: 4mg/kg/48horas-IM. Las inyecciones son muy dolorosas.

* **Anfotericina B.** Altera la permeabilidad de la membrana celular. Es un producto tóxico para los riñones, y es un tratamiento caro.

* **Paromomicina Aminosidina** Inhibe la función ribosomal. Con una dosis de: 5-10 mg/kg/cada 12 horas-IM o SC. El producto puede ser nefrotóxico u ototóxico. (6)

V. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Recursos Humanos

- Tesista.
- Asesores: Dr. Manuel Rodríguez, Dr. Carlos Camey y Dra. Blanca de Romillo.
- Dueños de los perros.
- Personal del laboratorio de Parasitología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad San Carlos de Guatemala.
- Personal del PECET de la Universidad de Antioquia en Medellín, Colombia.

5.2 Material Biológicos

- Suero de los perros muestreados.
- Sangre periférica de los perros muestreados.

5.3 Material de Campo

- Jeringas
- Agujas
- Alcohol etílico
- Algodón
- Tubos Vacutainer sin anticoagulante
- Porta objetos
- Marcador Permanente
- Hielera
- Hielo
- Metanol
- Bozales
- Guantes de latex
- Micro tubos (ependorfs)
- Parafilm

5.4 Material de Laboratorio

- Kit ELISA específico para detectar anticuerpos contra *L. braziliensis*.
- Espectrofotómetro
- Centrífuga
- Microscopio
- Aceite de Inmersión
- Tinción de Giemsa
- Instrumentos de laboratorio.

5.5 Muestreo de Campo

Dolores es un [municipio](#) en el departamento de [Petén](#) en la República de [Guatemala](#). Dolores se encuentra a setenta y ocho Km. al sudeste de la cabecera departamental de Petén, y a una distancia de 420 kilómetros de la ciudad de Guatemala. Limita al Norte con el municipio Flores, Santa Ana y de Melchor de Mencos, con este último, en el paralelo 16° 49'. Al Oeste o Poniente colinda con el municipio de San Francisco y Sayaxché. Con Flores en un esquinero denominado San Clemente, entre Flores, Santana y Dolores. Con Santa Ana en una franja superior Al Este u Oriente colinda en toda su extensión con el territorio de Belice; al Sur colinda con el Municipio de Poptún hasta la confluencia del Río Poxté y San Juan. (2)

Su población es de 26.269 aproximadamente. La extensión del municipio es de 3.050 [km²](#), hacia el oriente se extienden la montañas mayas. La altura del municipio es de 436.52 [msnm](#).(2)

Posee dos tipos de clima, en su parte norte es cálido y seco, sin estación bien definida, en el resto del municipio el clima es cálido con inviernos benignos, la temperatura es de veintiocho grados centígrados y mínimo de dieciocho grados centígrados, temporalmente durante los meses de marzo, abril y mayo la temperatura sube un poco más de lo normal debido a la extensión seca. (2)

5.6 Toma de la muestra

Se muestrearon 92 perros que habitan en el municipio de Dolores, que forma parte del departamento de Petén. El tamaño de la muestra se determinó por el número de fosas que incluye el plato de ELISA. El plato está conformado de 96 fosas de las cuales 4 se utilizan para control, restando 92 fosas para las muestras. Se trabajó solo con un kit por razones económicas. La toma de muestras se llevó a cabo en varios puntos de encuentro del municipio. No importó sexo ni raza, pero debían ser mayores de un año.

A los perros se les tomó una muestra de sangre de la vena radial con tubos sin anticoagulante. Se tomó también una muestra de sangre periférica puncionando la oreja. La sangre de las orejas fue utilizada para el frote sanguíneo en las láminas portaobjetos que se fijaron con metanol. Los tubos se colocaron en una hielera con hielo para conservarse y trasladarse junto con los frotos sanguíneos a la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.

5.7 Metodología

Las muestras de sangre se centrifugaron para la obtención de suero, el suero se colocó en micro tubos (ependorf) y pasó a congelarse a 4°C hasta ser utilizados.

Debido a la falta de la disponibilidad de los conjugados en Guatemala, la prueba de ELISA se realizó en la Universidad de Antioquia en Medellín, Colombia. La universidad posee un departamento científico llamado Sede de Investigación Universitaria, SIU, en donde se encuentra el PECET, Programa de Estudios y Control en Enfermedades Tropicales. Aquí se realizó la prueba de ELISA con los sueros tomados en Petén.

Los frotos sanguíneos se trabajaron en el departamento de Parasitología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la USAC, donde se colorearon

con tinción de Giemsa y se observaron en un microscopio utilizando el objetivo de inmersión. En el frote sanguíneo se buscó la presencia del amastigote.

Los resultados del ELISA se indican por medio de un espectrofotómetro lo que demuestra los perros que han tenido contacto con la *L. braziliensis* por la presencia de anticuerpos.

5.8 Método estadístico

Los resultados se tabularon usando estadística descriptiva y los caracteres epidemiológicos relevantes se evaluaron usando prueba de Chi².

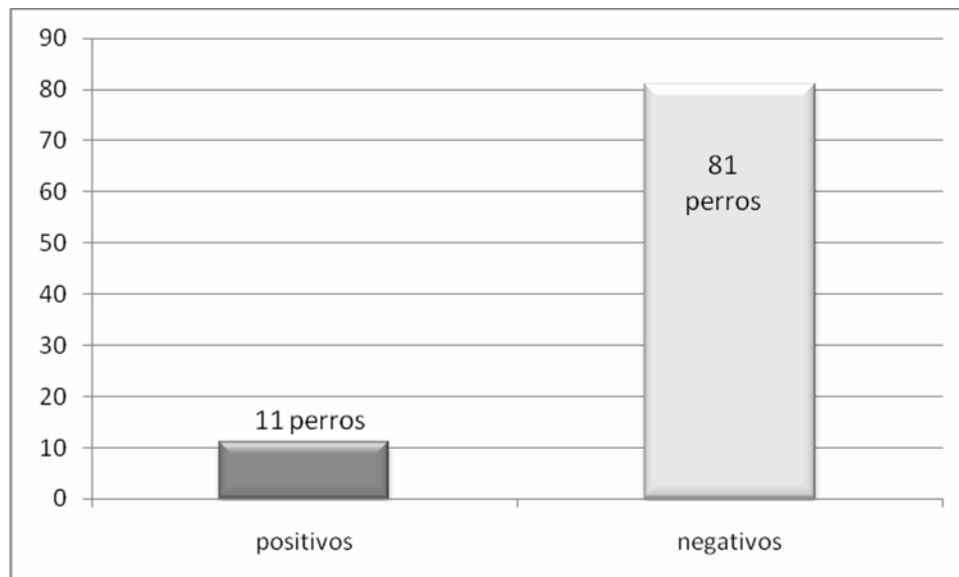
Se utilizó una ficha de control para cada perro donde se compararon los caracteres epidemiológicos. (Ficha 1)

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se tomaron 92 muestras de sangre de perros para determinar la presencia de anticuerpos contra *Leishmania braziliensis* por medio de la prueba serológica de ELISA y por la presencia del parásito en frotos sanguíneos. Las muestras fueron tomadas en 4 comunidades del municipio de Dolores en el departamento de Petén. Para la toma de muestras no se tomaron en cuenta las variables de raza ni sexo, pero si la edad, teniendo que ser mayores de un año.

Del total de muestras trabajadas, se obtuvo que 11 (11.96%) fueron positivas y 81 (88.04%) fueron negativas para la prueba de ELISA. Para los frotos sanguíneos todas las muestras fueron negativas. (Tabla No. 1 y Grafica No.1)

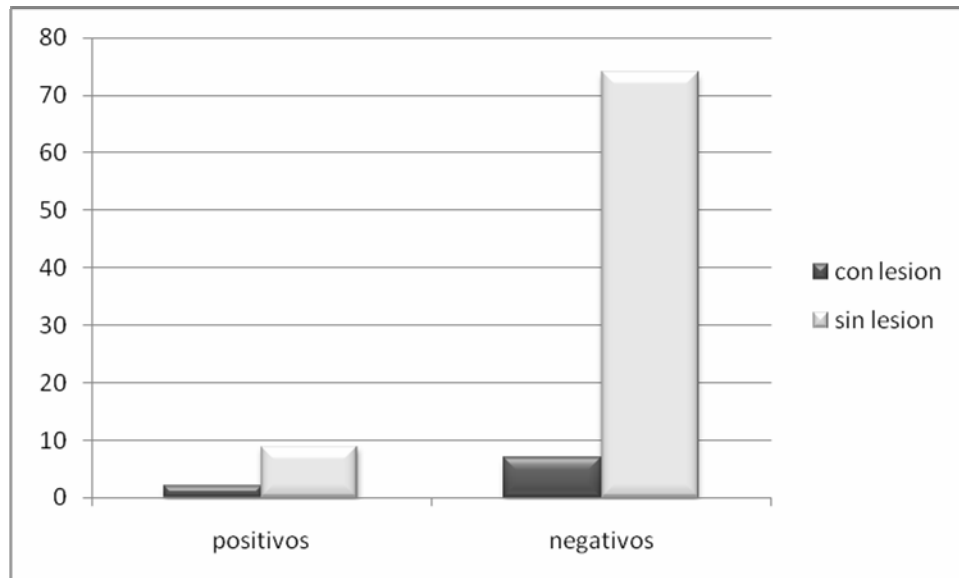
Grafica No.1: Perros positivos a anticuerpos contra *Leishmania braziliensis* por medio de prueba de ELISA.



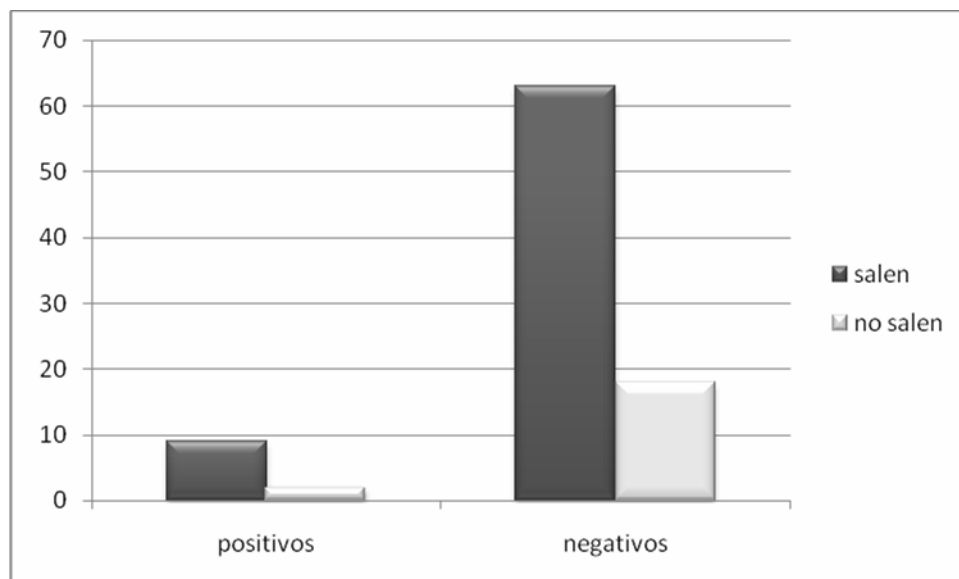
Los caracteres epidemiológicos se evaluaron usando prueba de Chi², siendo estos la presencia de lesiones, si salen de la comunidad, si duermen afuera de la vivienda, sexo y la comunidad donde se tomó la muestra. Teniendo como resultados que de los perros positivos a la prueba de ELISA, 2 tenían lesiones en la piel, 9 salen de la comunidad, 7 fueron machos y todos duermen afuera.

Según estos resultados, se observa que no existe una relación entre los caracteres epidemiológicos y los perros positivos a ELISA. (Grafica 2, 3, 4 y 5)

Gráfica No. 2: Perros con lesiones en la piel.

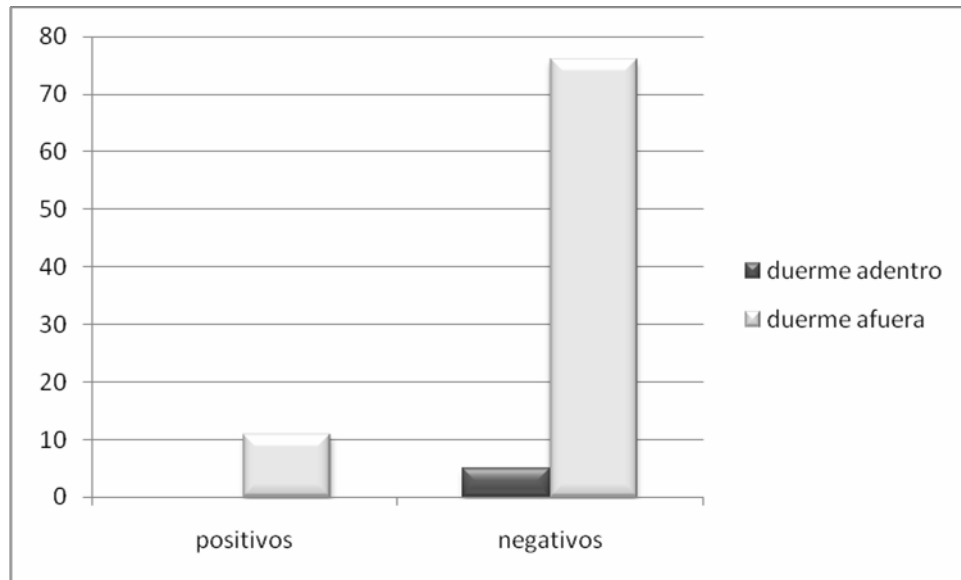


Grafica No. 3: Perros que salen de la comunidad.



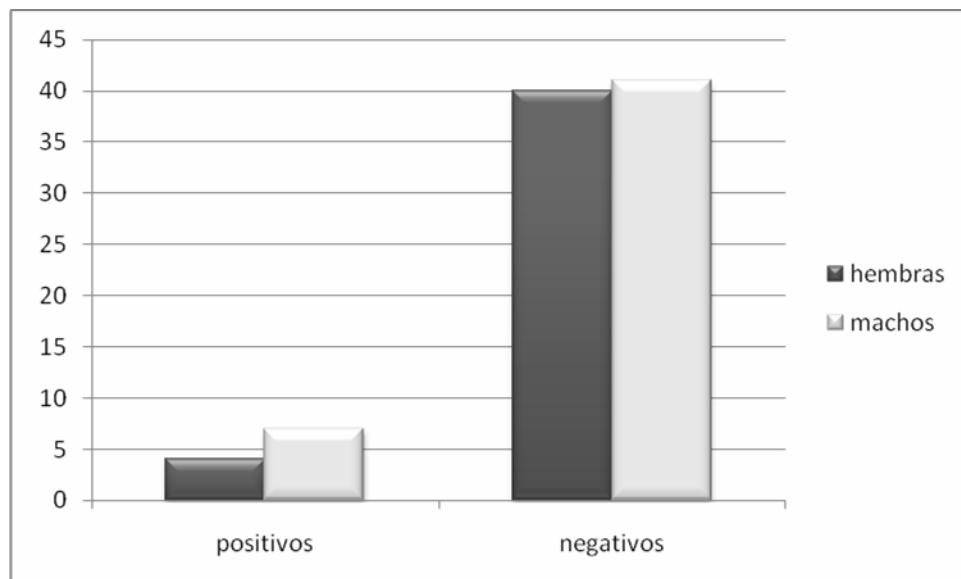
Este dato es importante pues exponerse a áreas selváticas densamente cubiertas de vegetación durante las horas de máxima intensidad de los vectores y de las picaduras puede aumentar los riesgos de infección (Navin, 1991).

Grafica No. 4: Perros que duermen afuera de la vivienda.



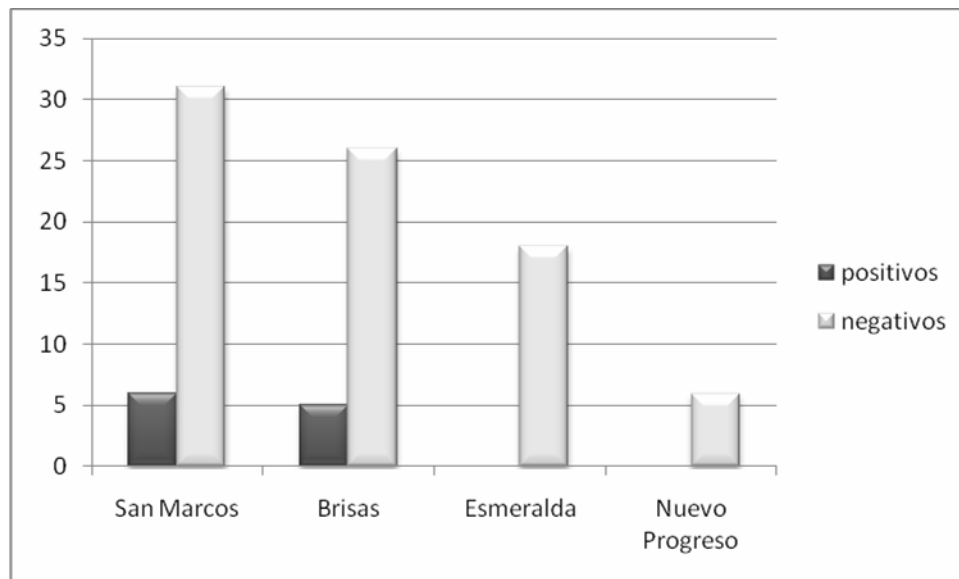
A pesar de no existir relación entre la prueba de χ^2 y los resultados positivos a la prueba de ELISA se puede observar que el 100% de los perros positivos duermen afuera de sus viviendas. Esto se debe tomar en consideración pues la *Lutzomyia* tiene actividad crepuscular y nocturna lo que pone a los perros en mayor riesgo por estar expuestos a las picaduras (Navin, 1991).

Grafica No. 5: Perros clasificados por sexo.



Las comunidades muestreadas del municipio de Dolores fueron: San Marcos, Las Brisas, La Esmeralda y Nuevo Progreso. De los resultados por comunidad, en donde fueron tomadas las muestras se observó que la comunidad con mayor incidencia fue San Marcos con 6 muestras positivas y con menor incidencia fue Las Brisas con 5 muestras positivas. En las comunidades de La Esmeralda y Nuevo Progreso los resultados fueron negativos. (Grafica No.6)

Grafica No. 6: Comunidades del municipio de Dolores que se muestrearon.



Para el total de muestras positivas (11) no se puede confirmar que son perros con Leishmaniasis, puesto que la prueba de ELISA detecta anticuerpos antileishmania circulantes en el suero a títulos bajos, esto sólo demuestra que han estado en contacto con el parásito más no necesariamente están infectados. (Ryan, 2002). El parásito no fue encontrado en los frotis sanguíneos, por lo que no se puede determinar una correlación entre estos dos métodos diagnósticos. Se puede determinar que el parásito no fue encontrado pues éste debe encontrarse en su fase aguda (28 días postinfección) lo que condiciona el rendimiento en los casos crónicos pues existe una parasitemia baja (Ochoa, 2009).

Dos perros positivos a la prueba de ELISA y negativos al frote sanguíneo presentaron úlceras cutáneas. La úlcera no es determinante pues puede existir confusión ya que algunas lesiones no son las típicas úlceras (Navin 1991) . No fue posible por lo tanto definir si las lesiones correspondían o no a Leishmaniasis y de ser positivas, los amastigotes no se encontraron en los frotos sanguíneos por ser fase crónica de la enfermedad (Ochoa, 2009).

VII. CONCLUSIONES

1. En el presente estudio se demostró la presencia de anticuerpos contra el parásito *Leishmania braziliensis* en perros por medio de la prueba de ELISA en cuatro comunidades del municipio de Dolores en el departamento de Petén; de los 92 perros muestreados 11 (11.96%) fueron positivos y 81 (88.04) fueron negativos.
2. De los 92 perros muestreados para determinar la presencia del parásito con frotos sanguíneos el 100% fueron negativos.
3. Se concluye que los perros positivos a anticuerpos contra *L. braziliensis*, no necesariamente están infectados.
4. No se pudo establecer una correlación entre el método diagnóstico de ELISA y el frote sanguíneo.
5. No existe una relación entre los caracteres epidemiológicos y los perros con resultados positivos a la prueba de ELISA .
6. Los datos de este estudio fueron reportados al Dr. Luis Sandoval Cámbara en el Ministerio de Salud Pública en el área de zoonosis.

VIII. RECOMENDACIONES

1. Realizar más muestreos con el fin de obtener información relevante a la epidemiología de la enfermedad en el país y tener en cuenta que es una zoonosis de importancia a salud pública.
2. Las medidas de control en áreas endémicas se deben enfocar en el vector, *Lutzomyia* sp. Se recomienda el uso de deltametrina como repelente para ayudar a proteger a ambos, perros y humanos. Se pueden utilizar las diferentes presentaciones del piretroide ya sea en suspensión, polvo o collares para los perros, estos últimos protegen a los perros del 96% de las picaduras durante por lo menos 6 meses. Los flebótomos infectados pueden picar a un perro hasta 100 veces en una hora y la deltametrina no permite que los flebótomos se alojen en los perros, evitando de este modo éstas se alimenten.
3. Se debe divulgar información sobre la Leishmaniasis en las áreas endémicas de forma visual explicando la sintomatología y las formas de prevención. Se debe explicar el papel del perro y los riesgos que se corren al permitirlos deambular por las noches pues la *Lutzomyia* tiene su actividad de picadura máxima entre las 18 y las 6 horas, por lo que ayudaría mucho evitar estar en los bosques y áreas selváticas durante esas horas.

IX. RESUMEN

La Leishmaniasis es una enfermedad infecciosa tanto de los animales como de los humanos, causada por un protozoo del género *Leishmania*. En esta ocasión se trabajó con *Leishmania braziliensis*, que es la causante de la leishmaniasis cutánea en los perros. La Leishmaniasis es transmitida por el vector *Lutzomyia* sp (“la mosca de los arenales”) y es predominante en las áreas tropicales y subtropicales como Petén. Los perros son considerados los principales reservorios de esta enfermedad.

El estudio se realizó en un área endémica de Leishmaniasis humana, en 4 comunidades del municipio de Dolores, en el departamento de Petén. Las comunidades muestreadas del municipio de Dolores fueron: San Marcos, Las Brisas, La Esmeralda y Nuevo Progreso.

Este estudio se efectuó por medio de la prueba serológica de ELISA y por medio de un frote sanguíneo con sangre periférica. La serología demuestra anticuerpos contra Leishmaniasis cutánea y en el frote sanguíneo se observa la presencia del amastigote que es la fase infectiva en el huésped.

Los resultados que se obtuvieron fueron 11 casos positivos a ELISA y todos negativos a los frotos sanguíneos.

Para el total de muestras positivas (11) no se puede confirmar que son perros con Leishmaniasis, puesto que la prueba de ELISA detecta anticuerpos antileishmania circulantes en el suero a títulos bajos, esto sólo demuestra que han estado en contacto con el parásito mas no necesariamente están infectados. El parásito no fue encontrado en los frotos sanguíneos. Se puede determinar que el parásito no fue encontrado pues éste debe encontrarse en su fase aguda (28 días postinfección) lo que condiciona el rendimiento en los casos crónicos pues existe una parasitemia baja.

X. BIBLIOGRAFÍA

1. Borchert, A. 1981. Parasitología Veterinaria. Trad. M Cordero del Campillo, M. Zaragoza, ES, ACRIBIA. p.120
2. Cabrera del Valle, C. 2007. Mi municipio Dolores (en línea). Consultado 2 ene. 2009. Disponible en <http://www.scribd.com/doc/27014144/Monografia-Dolores-Peten>
3. Cordero del Campillo, M. et al. 1999. Parasitología Veterinaria. Madrid, ES, McGraw-Hill-Interamericana. p.98
4. Guptill, L. 2007. Selected zoonoses of dogs (en línea). Consultado 30 nov. 2008. Disponible en <http://www.ivis.org/proceedings/navc/2007/SAE/207.asp?LA=1>
5. Leishmaniasis (Cutaneous and visceral) s.f. (en línea). Consultado 30 nov. 2008. Disponible en http://www.ivis.org/advances/Disease_Factsheets/leishmaniasis.pdf
6. _____. s.f. (en línea) Consultado 29 nov. 2008. Disponible en <http://www.leishmaniasis.info/>
7. _____. s.f. (en línea). Consultado 30 nov. 2008. Disponible en <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/Leishmaniasis.htm>
8. Navin, T. 1991. La leishmaniasis cutánea en Guatemala. Guatemala, Rhône-Poulenc. 80p.

9. Ochoa, W. et al. 2009. Diagnóstico de la leishmoniosis visceral por frotis de sangre periférica (en línea). Consultado 2 jun. 2009. Disponible en <http://www.scielo.org.pe/pdf/rins/v26n2/a21v26n2.pdf>
10. Quiroz Romero, H. 1986. Parasitología y enfermedades parasitarias de animales domésticos. México, D.F, Limusa. p.134
11. Roze, M. 2003. Canine leishmaniasis: An update in diagnosis and treatment (en línea). Consultado 29 nov. 2008. Disponible en <http://www.vin.com/proceedings/Proceedings.plx?CID=WSAVA2003&PID=6627&O=Gen.eric>
12. Ryan, J. et al. 2002. Enzyme-linked immunosorbent assay based on soluble promastigote antigen detects Immunoglobulin M (IgM) and IgG antibodies in sera from cases of visceral and cutaneous leishmaniasis (en línea). Consultado 28 nov. 2008. Disponible en <http://www.jcm.asm.org/cgi/content/abstract/40/3/1037>
13. Vera-Izaguirre, D. et al. 2006 Leishmaniasis (en línea). Consultado 28 nov. 2008. Disponible en <http://antoniorondonlugo.com/blog/?p=341>

XI. ANEXOS

Ficha No.1: Ficha de animales muestreados

FICHA DE CONTROL		
Comunidad	_____	
Número	_____	
Nombre del perro	_____	
Nombre del dueño	_____	
Edad	_____	
Sexo		
	Hembra <input type="checkbox"/>	Macho <input type="checkbox"/>
Raza	_____	
Propósitos del perro		
	Guardián <input type="checkbox"/>	Compañía <input type="checkbox"/> Campo o cacería <input type="checkbox"/>
Donde duerme el perro	_____	
Sale el perro de la comunidad	_____	
Signos clínicos	_____	
Observaciones	_____	

Figura 1: Ciclo de vida de la Leishmania

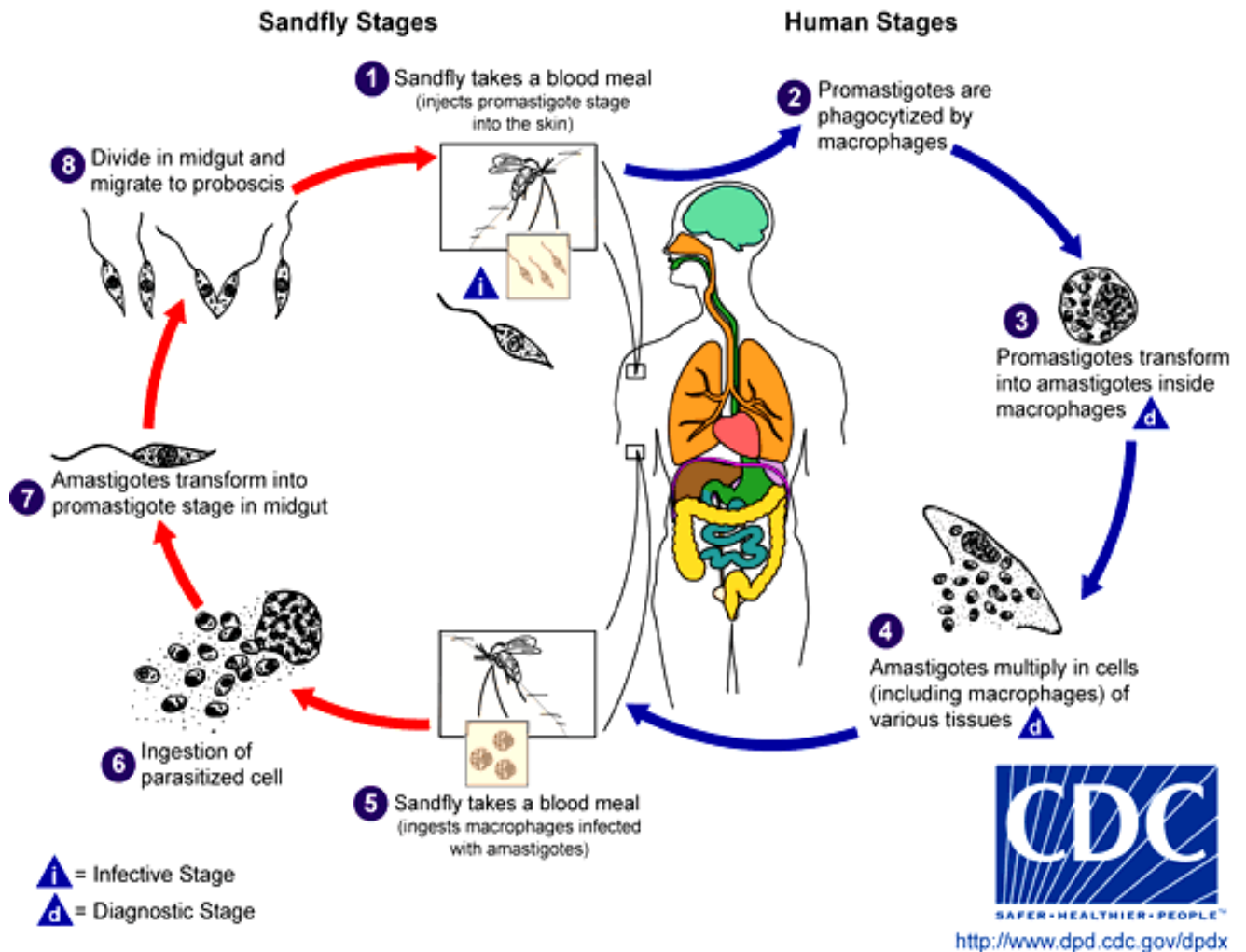


TABLA No.1: Resultados de la prueba de ELISA y frote sanguíneo.

Nº.	ELISA	FROTE	Nº.	ELISA	FROTE
58	Negativo	Negativo	76	Negativo	Negativo
59	Negativo	Negativo	77	Negativo	Negativo
60	Negativo	Negativo	78	Negativo	Negativo
61	Positivo	Negativo	79	Negativo	Negativo
62	Negativo	Negativo	80	Negativo	Negativo
63	Negativo	Negativo	81	Negativo	Negativo
64	Negativo	Negativo	82	Negativo	Negativo
65	Negativo	Negativo	83	Negativo	Negativo
66	Negativo	Negativo	84	Negativo	Negativo
67	Negativo	Negativo	85	Negativo	Negativo
68	Negativo	Negativo	86	Negativo	Negativo
69	Negativo	Negativo	87	Negativo	Negativo
70	Negativo	Negativo	88	Negativo	Negativo
71	Negativo	Negativo	89	Negativo	Negativo
72	Negativo	Negativo	90	Negativo	Negativo
73	Negativo	Negativo	91	Negativo	Negativo
74	Negativo	Negativo	92	Negativo	Negativo
75	Negativo	Negativo	93	Negativo	Negativo
76	Negativo	Negativo	94	Negativo	Negativo
77	Negativo	Negativo	95	Negativo	Negativo
18	Negativo	Negativo	46	Negativo	Negativo
19	Negativo	Negativo	47	Positivo	Negativo
20	Negativo	Negativo	48	Negativo	Negativo
21	Negativo	Negativo	49	Negativo	Negativo
22	Negativo	Negativo	50	Negativo	Negativo
23	Negativo	Negativo	51	Positivo	Negativo
24	Negativo	Negativo	52	Negativo	Negativo
25	Negativo	Negativo	53	Positivo	Negativo
26	Positivo	Negativo	54	Negativo	Negativo
27	Negativo	Negativo	55	Negativo	Negativo
28	Negativo	Negativo	56	Negativo	Negativo