

UNIVERSIDAD DE GRANADA  
FACULTAD DE CIENCIAS  
DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGÍA



**Fe-SODe: DIAGNÓSTICO Y  
SEROPREVALENCIA DE LA  
LEISHMANIASIS Y LA  
ENFERMEDAD DE CHAGAS  
EN MÉXICO**

TESIS DOCTORAL

ÁNGELES LÓPEZ CÉSPEDES

GRANADA, JUNIO 2013

Editor: Editorial de la Universidad de Granada  
Autor: Ángeles López Céspedes  
D.L.: GR 353-2014  
ISBN: 978-84-9028-758-3



La doctorando Ángeles López Céspedes y los directores de la tesis Manuel Sánchez Moreno, Clotilde Marín Sánchez y M<sup>a</sup> José Rosales Lombardo. Garantizamos, al firmar esta tesis doctoral, que el trabajo ha sido realizado por el doctorando bajo la dirección de los directores de la tesis y hasta donde nuestro conocimiento alcanza, en la realización del trabajo, se han respetado los derechos de otros autores a ser citados, cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones.

Granada, Junio 2013

**Directores de la Tesis:**

Fdo.:

Manuel Sánchez Moreno

Clotilde Marín Sánchez

M<sup>a</sup> José Rosales Lombardo

**Doctorando:**

Fdo.:

Ángeles López Céspedes



# ÍNDICE



<b>1. RESUMEN</b> .....	12
<b>2. INTRODUCCIÓN</b> .....	18
2.1. Taxonomía de los tripanosomátidos.....	20
2.2. <i>Leishmania spp.</i> y la leishmaniasis.....	21
2.2.1. Morfología y ciclo de vida de <i>Leishmania spp.</i> .....	23
2.2.2. Control de la leishmaniasis: Hospedadores y vectores.....	27
2.2.3. Diversidad clínica de la leishmaniasis.....	31
2.2.4. Distribución de la leishmaniasis.....	35
2.3. <i>Trypanosoma cruzi</i> y la enfermedad de Chagas.....	38
2.3.1. Morfología y ciclo de vida de <i>T. cruzi</i> .....	39
2.3.2. Control de la enfermedad de Chagas: Hospedadores y vectores.....	42
2.3.3. Manifestaciones clínicas de la enfermedad de Chagas.....	48
2.3.4. Distribución de la enfermedad de Chagas.....	51
<b>3. ANTECEDENTES</b> .....	56
3.1. Importancia de los animales domésticos en la transmisión de la leishmaniasis y la enfermedad de Chagas.....	58



3.2. Importancia del diagnóstico de la leishmaniasis.....	64
3.3. Importancia del diagnóstico de la enfermedad de Chagas.....	71
<b>4. OBJETIVOS.....</b>	<b>76</b>
<b>5. PUBLICACIONES.....</b>	<b>80</b>
5.1. An iron-superoxide dismutase antigen-based serological screening of dogs indicates their potencial role in the transmission of cutaneous leishmaniasis and trypanosomiasis in Yucatan, Mexico (Vector-Borne and Zoonotic Diseases, 2011; 11(7): 815-21).....	82
5.2. Prevalence of antibodies against three species of Leishmania (L. mexicana, L. braziliensis, L. infantum) and possible associated factors in dogs from Mérida, Yucatán, México (Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 2012; 106(4): 252-8).....	92
5.3. Leishmania spp. Epidemiology of Canine Leishmaniasis en the Yucatan Peninsula (The Scientific World Journal, 2012; doi: 10.1100/2012/945871).....	102
5.4. Seroprevalence of antibodies against the Excreted Antigen Superoxide Dismutase by <i>Trypanosoma cruzi</i> in dogs from Yucatan Peninsula (Mexico) (Zoonoses and Public Health, 2012; doi: 10.1111/j.1863-2378.2012.01520.x).....	114
5.6. <i>Trypanosoma cruzi</i> : Seroprevalence Detection in Suburban Population of Santiago de Querétaro (Mexico) (The Scientific World Journal, 2012; doi: 10.1100/2012/914129)...	134

<b>6. DISCUSIÓN.....</b>	<b>144</b>
<b>7. CONCLUSIONES.....</b>	<b>164</b>
<b>8. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>168</b>
<b>9. AGRADECIMIENTOS.....</b>	<b>198</b>



## **1.RESUMEN**



La leishmaniasis y la enfermedad de Chagas junto a malaria, schistosomiasis, filariasis y lepra, están consideradas por la OMS unas de las enfermedades tropicales de mayor importancia, de hecho están incluidas en el programa OMS/TDR por la búsqueda de nuevas técnicas de prevención, diagnóstico y tratamiento. Estas “Enfermedades Olvidadas” están asociadas a la pobreza y a las malas condiciones de vivienda, por ello se extienden, principalmente en las áreas rurales de todo el continente latinoamericano, y en el caso de la leishmaniasis también en el africano y asiático, así como en los cinturones de pobreza alrededor de las grandes ciudades. Están consideradas como las enfermedades parasitarias con mayor carga económica debido a su prolongada cronicidad. Estas parasitosis frecuentemente pasan desapercibidas como un problema de salud y están relacionadas con el desarrollo socio-económico del país.

Actualmente su diagnóstico está basado en la presencia de anticuerpos contra *T. cruzi* y *Leishmania* sp. en el suero de individuos infectados. Estos anticuerpos se han detectado principalmente empleando diferentes pruebas, las pruebas serológicas más utilizadas han sido ELISA, HAI e IFI, conocidas como pruebas convencionales. A partir de diciembre del 2002, la OMS recomendó el uso de una prueba de alta sensibilidad (ELISA) que representa una herramienta adecuada para el tamizaje, aunque es importante mejorar su calidad considerando que, la mayoría de las pruebas ELISA utilizadas pertenecen a dos categorías: las que usan fracciones antigénicas del lisado parasitario y las que utilizan antígenos recombinantes o péptidos sintéticos. Sin embargo, estas pruebas no presentan una alta sensibilidad y especificidad. Además, se necesita la

estandarización de una prueba complementaria para confirmar los resultados obtenidos en el tamizaje serológico, ya que el número de muestras que es dirigido a servicios clínicos para confirmar los resultados reactivos o dudosos en el tamizaje y que quedan sin confirmación, es bastante elevado.

Así, según la OMS, la necesidad en investigación para solucionar la problemática de la enfermedad de Chagas en los bancos de sangre es la producción comercial de una prueba altamente sensible y específica para el correcto diagnóstico de *T. cruzi*, así como para la detección de *Leishmania* spp., agentes etiológicos de diferentes patologías y con diferente tratamiento médico.

Debido a la alta incidencia de la enfermedad de Chagas y de la leishmaniasis en una gran variedad de zonas endémicas, y tomando en cuenta el riesgo que presenta tanto para los seres humanos como para otras especies de mamíferos que actúan como reservorios naturales de estos parásitos, es de suma importancia atender con medidas de prevención a las poblaciones que se encuentran con más alto riesgo de sufrir la enfermedad. Para ello, es necesario desarrollar métodos de diagnóstico eficaces que tengan la sensibilidad y la especificidad adecuadas para hacer un diagnóstico fiable a tiempo, y así poder brindar un tratamiento que permita a los individuos afectados recuperarse y de esta forma disminuir las posibilidades de contagio de la enfermedad, debido al ciclo de vida del agente que la causa.

Por todo ello, nuestro estudio plantea el uso de la Hierro Superóxido Dismutasa (Fe-SODe) excretada por los tripanosomátidos como un antígeno altamente efectivo para el diagnóstico de infecciones por *T. cruzi* y *Leishmania* spp. Para ello, hemos analizado diferentes sueros procedentes de México, país endémico para estas enfermedades. La mayoría de las muestras ensayadas en este estudio proceden de perros de diferentes zonas de la Península de Yucatán, debido a la gran importancia de estos animales domésticos en la transmisión de estas enfermedades a los seres humanos por su estrecha relación con éstos. Además en este trabajo hemos analizado sueros de gatos, hasta el día de hoy estudiados por pocos autores, procedentes de la misma área geográfica de los cánidos con el fin de demostrar su posible papel como reservorio. Por último, para demostrar la eficacia de nuestra fracción antigénica hemos ensayado sueros humanos de pacientes procedentes del estado Querétaro. Nuestro estudio serológico lo hemos realizado empleando la técnica de ELISA usando como fracción antigénica tanto nuestra Hierro Superóxido Dismutasa excretada (Fe-SODe) como el lisado total del parásito, para comparar así los resultados. Tras esto, comprobamos todos nuestros resultados mediante la técnica de Western blot por su mayor especificidad.

Con la estandarización de una prueba diagnóstica para la leishmaniasis y la enfermedad de Chagas se contribuiría a un mejor conocimiento y control de estas enfermedades desde el punto de vista clínico y epidemiológico.





## **2. INTRODUCCIÓN**



## **2. 1. Taxonomía de los tripanosomátidos**

Los tripanosomátidos son parásitos protozoos pertenecientes al orden Kinetoplastida. Se trata de organismos flagelados (mastigóforos) hemotisulares capaces de parasitar una gran variedad de hospedadores invertebrados y vertebrados. Este orden se distingue por su ultraestructura, que incluye la presencia de una única mitocondria alargada, llamada kinetoplasto que contiene ADN superenrollado (ADN del kinetoplasto, ADNk) asociado al corpúsculo basal o blefaroplasto flagelar. Siguiendo la clasificación, entraríamos dentro de la Familia Trypanosomatidae, en la que los géneros *Trypanosoma* y *Leishmania* son los más importantes por incluir una serie de especies que ocasionan graves enfermedades en humanos, como *T. cruzi* agente causal de la enfermedad de Chagas, *T. brucei gambiense* y *T. b. rhodesiense* agentes causales de la enfermedad del sueño y *Leishmania* spp. agentes causales de la leishmaniasis (visceral, cutánea o mucocutánea).

La clasificación para *Trypanosoma* spp. y *Leishmania* spp., acordada por Levine en 1980, es la siguiente:

Reino: Protista

Subreino: Protozoa

Phyllum: Sarcomastigophora

Subphyllum: Mastigophora

Clase: Zoomastigophorea

Orden: Kinetoplastida

Familia: Trypanosomatidae

Géneros: *Leishmania* spp y *Trypanosoma* spp.

## **2.2. Leishmania y leishmaniasis**

La leishmaniasis es una enfermedad parasitaria grave relacionada con la pobreza que supone una carga sanitaria cada vez mayor, causada por el protozoo parásito del género *Leishmania*, del que más de 20 especies son patógenas para humanos. Esta enfermedad puede presentar diferentes manifestaciones clínicas que se clasifican en tres grandes grupos: leishmaniasis visceral (LV), leishmaniasis cutánea (LC) y leishmaniasis mucocutánea (LMC); según la célula diana de replicación de los parásitos, que serían las células del sistema fagocítico mononuclear, las de la dermis y las de los tejidos nasofaríngeos, respectivamente.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) la considera una de las 9 enfermedades olvidadas más importantes incluidas en el “Programa especial de investigación y formación en enfermedades infecciosas” (TDR) (WHO, 2007) y la señala como prioritaria para la investigación y el control (WHO, 2010), formando parte en la actualidad del “TDR strategic plan” 2012-2017.

Esta parasitosis es muy cosmopolita, presentando una amplia distribución en todos los continentes excepto en la Antártida. La enfermedad ha sido reportada en 98 países y se han descrito casos de leishmaniasis cutáneas, mucocutáneas y viscerales (WHO, 2010). La OMS estima que hay unas 12 millones de personas infectadas en el mundo y que 350 millones están en riesgo de contraer la enfermedad produciéndose cada año dos millones de nuevas infecciones (0,5 millón de leishmaniasis visceral y 1,5 millón de leishmaniasis cutánea). Sin embargo, la mayoría de

los casos no están reportados, siendo obligatoria la denuncia de los datos registrados sólo en 33 países. Debido a los daños económicos, sociales y psicológicos causados por la leishmaniasis, se considera un problema de alto impacto o estigmatización en la salud pública y, sin embargo, sigue siendo una de las enfermedades más olvidadas en el mundo.

En los últimos años, la leishmaniasis es considerada una enfermedad emergente (Pavli y Maltezou, 2010; Ameen, 2010) debido a las modificaciones climáticas, a las migraciones de las poblaciones, a la resistencia de los mosquitos hacia los insecticidas y a la dificultad para eliminar la infección en los animales reservorios, así como su relación como infección oportunista en enfermos de SIDA (Gil-Prieto y col., 2011; Grabmeier-Pfistershammer y col., 2012).

Siendo así una de las enfermedades más diversas y complejas producidas por protozoos cuya forma natural de transmisión es de manera vectorial mediante la picadura de dípteros hematófagos (moscas de arena) de la familia Psychodidae que pertenecen a los géneros *Lutzomyia* en el continente americano y *Phlebotomus* en Europa, Asia y África (Ameen, 2010).

### 2.2.1. Morfología y ciclo de vida de *Leishmania spp.*

La morfología de las diferentes especies de *Leishmania spp.* es muy parecida. Estos protozoos se desarrollan y multiplican en el hospedador vertebrado como formas amastigotas intracelulares de las células del sistema fagocítico mononuclear y, como amastigotas y promastigotas en la luz del tubo digestivo de los vectores invertebrados, dípteros de la familia Psychodidae, subfamilia Phlebotominae.

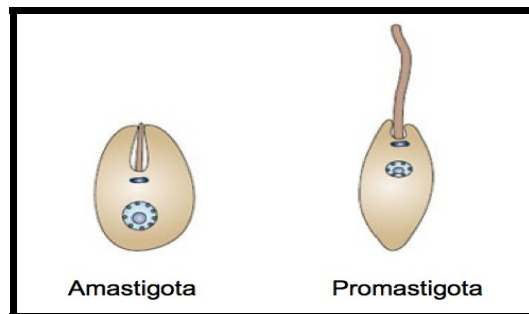


Figura 1: Formas que adopta *Leishmania sp.* en su ciclo de vida  
<http://www.nature.com/scitable/topicpage/kinetoplastids-and-their-networks-of-interlocked-dna-14368046>

La **forma amastigota** es la única que se desarrolla y multiplica en el vertebrado, en las células macrofágicas fijas y circulantes. Tanto en situación intracelular como cuando quedan libres después de multiplicarse en las células, aparecen como pequeños corpúsculos ovals de 3-5  $\mu\text{m}$ , en los que se distingue muy bien el núcleo y un corpúsculo baciliforme (figura 1), que corresponde al kinetoplasto (Marín y col., 2013).

Las **formas promastigotas** se desarrollan en el vector invertebrado y tienen un aspecto fusiforme de unos 7-15  $\mu\text{m}$  de largo, distinguiéndose bien un núcleo, un kinetoplasto pre-nuclear y un flagelo que emerge en la

región apical del cuerpo libre en toda su longitud (Gallego Berenguer, 2007).

Durante el desarrollo del parásito en el vector, *Leishmania* adopta varias morfologías intermedias entre la forma flagelada y la aflagelada. Las formas descritas enumeradas por orden de aparición a lo largo de esta transformación son los promastigotes procíclicos (aparecen entre las 24 y 48 tras la ingesta), nectomonas (48 -72 horas), leptomonas (4-7 días), haptomonas (5-7 días) y metacíclicos (7-14 días), estos últimos son los responsables de la transmisión de la infección al vertebrado (Kamhawi, 2006).

Todas las especies de *Leishmania* presentan un ciclo de vida similar y es importante conocer cada una de las etapas para poder entender y aplicar ciertas medidas de control. Para que se complete el ciclo se requiere la presencia de un hospedador vertebrado y un vector invertebrado (Fig. 2).

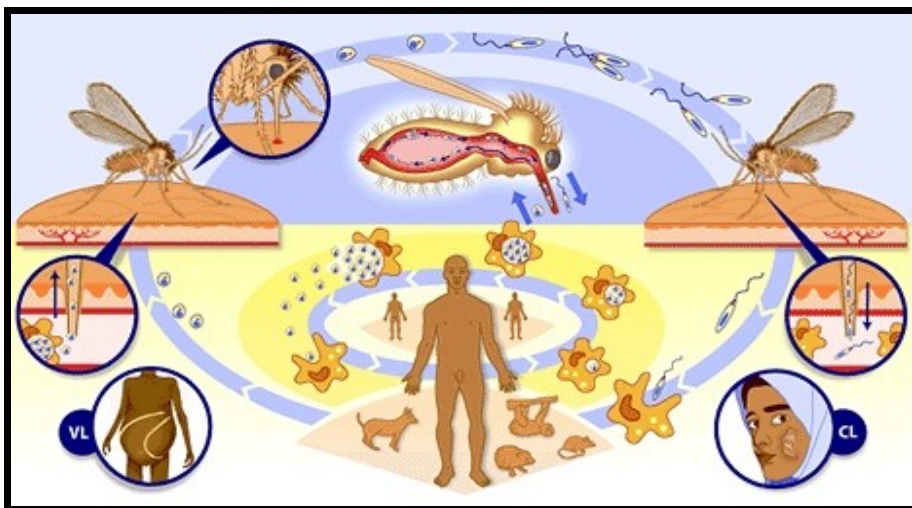


Figura 2: Ciclo de vida de *Leishmania* spp.

[http://www.who.int/tdr/diseases/leish/life\\_cycle\\_leishmania/en/index.html](http://www.who.int/tdr/diseases/leish/life_cycle_leishmania/en/index.html)



El ciclo comienza cuando el insecto vector toma sangre de un vertebrado infectado. Al alimentarse, el flebotomo ingiere macrófagos infectados con las formas amastigotas del parásito. Durante un periodo inicial de 6 a 9 días (dependiendo de la especie) *Leishmania* se desarrolla diferenciándose en los distintos estadios descritos anteriormente hasta convertirse en promastigotes metacíclicos. El proceso de transformación de amastigotas en promastigotas metacíclicas es conocido como metaciclogénesis (Kamhawi, 2006). La sangre de la que se alimenta el vector permanece contenida inicialmente en la región abdominal del aparato digestivo gracias a la membrana peritrófica. Al segundo o tercer día de desarrollo, *Leishmania* adopta la forma nectomonas y se produce la degeneración de la membrana peritrófica, permitiendo la migración de los parásitos hacia la zona anterior del intestino medio. Una vez en el intestino, los promastigotes avanzan hacia la zona bucal pasando por los distintos estadios del desarrollo. En el momento que los promastigotes adoptan la forma haptomonas se adhieren a la cutícula de la válvula estomodeal formando anillos concéntricos. Posteriormente, los parásitos se desplazan en sentido oral ocupando el esófago y la zona posterior de la faringe. Aproximadamente a partir del séptimo día tras la ingesta aparecen las primeras formas infectantes, las promastigotas metacíclicas. Las promastigotas metacíclicas maduras se acumulan en el intestino anterior e intestino medio del mosquito, que transmite la infección al alimentarse otra vez de sangre de un hospedador vertebrado (Marín y col., 2013).

El insecto vector inyecta las formas promastigotas durante la picadura al hospedador mamífero y poco después el parásito es fagocitado

## INTRODUCCIÓN

por los macrófagos de la dermis, donde las formas promastigotas se transforman en amastigotas tras un periodo de 12 a 24 horas después de la inoculación. Después de la transformación, las formas amastigotas se dividen en el interior de los macrófagos hasta la ruptura de estos, liberando así las amastigotas que pueden ser fagocitadas por otros macrófagos. Esta fase es crónica y puede durar de meses a años, incluso toda la vida sin que se presenten signos clínicos, dependiendo de la susceptibilidad del hospedador y de su sistema inmunitario (Sharma y Singh, 2008). Los macrófagos infectados pueden permanecer localizados en la piel, limitándose la invasión a la zona dérmica, dando lugar a lesiones de tipo localizado o úlceras características de la leishmaniasis cutánea. También pueden invadir, bien por paso directo o por metástasis sanguínea, las mucosas labial y nasal, provocando la leishmaniasis mucocutánea. O pueden pasar arrastradas por los macrófagos circulantes y por el torrente sanguíneo, a otros sistemas orgánicos ricos en células macrofágicas fijas (médula ósea, hígado, bazo, etc.), dando lugar a invasiones generalizadas muy graves, conocidas como leishmaniasis visceral. El ciclo se reanuda cuando el flebótomo pica a un hospedador infectado para alimentarse de sangre.

### **2.2.2. Control de la leishmaniasis: Hospedadores y vectores**

Los hospedadores reservorios de la leishmaniasis son mamíferos salvajes y domésticos. Según la OMS son dos las categorías en la que se pueden dividir la leishmaniasis dependiendo de la fuente de infección humana: la antroponótica en la que los reservorios son los humanos y la zoonótica en la que los reservorios son los animales salvajes, comensales o domésticos. Aunque cada especie de *Leishmania* generalmente se divide en una de estas categorías hay excepciones, como es el caso de varias especies cutáneas que aunque suelen ser zoonóticas también pueden infectar a los seres humanos de forma accidental. Por lo general, hay un grupo de hospedadores mamíferos más frecuente para las especies de *Leishmania*, pero otros mamíferos de la misma zona se pueden infectar y se conocen como hospedadores accidentales. Estos pueden jugar un papel importante en el mantenimiento del ciclo, ya que en ocasiones llevar al parásito a un contacto más estrecho con los seres humanos (WHO, 2010).

Entre el parásito, el vector y el reservorio se establece un conjunto de relaciones complejas que permiten que el sistema se mantenga por sí mismo. Así, una especie concreta de *Leishmania* puede parasitar reservorios de diferentes grupos filogenéticos (primates, perros, roedores,...); de la misma manera que un hospedador concreto puede ser parasitado por varias especies de *Leishmania*.

Los mamíferos reservorios de *Leishmania* pertenecen a diferentes órdenes: **Primates**, los humanos; **Carnivora**, el perro doméstico (*Canis familiaris*); **Rodentia**, roedores de los géneros *Meriones*, *Mastomys*,

*Arvicanthis*, *Tatera*, *Proechimys* y *Neotoma*, entre otros; **Edentata**, los perezosos de las selvas centro y sudamericanas (*Choelopus spp.* y *Bradypus spp.*); **Marsupialia**, la zarigüeya sudamericana (*Didelphis marsupialis*). Se han comunicado infecciones por *Leishmania* en otras numerosas especies de mamíferos de los órdenes anteriormente citados y otros como **Perissodactyla**, que podrían actuar en algún caso como reservorio o como huéspedes accidentales, sin una repercusión importante en la epidemiología de la infección (WHO, 2010).

Los **vectores** de la leishmaniasis son dípteros pertenecientes al género *Lutzomyia* en el Nuevo Mundo (América central y del sur) y al género *Phlebotomus* en el Viejo Mundo (África, Asia y Europa). El mosquito vive en zonas de bosque que ha sido talado y pican a humanos que viven o trabajan cerca de estas zonas. Se puede encontrar desde regiones intertropicales hasta zonas templadas (Sharma y Singh, 2008).

Los mosquitos adultos son pequeños (2 ó 3 mm de largo) y tienen las alas erectas en forma de V. Los machos se alimentan de azúcares de vegetales, pero la hembra además necesita ingerir sangre para concluir su ciclo reproductivo. Su actividad va desde el crepúsculo hasta el amanecer. Las larvas se crían en zonas húmedas con material orgánico en descomposición (Salomón, 2009).

El control de la leishmaniasis en América latina ha demostrado ser un reto. Tanto un tratamiento como un diagnóstico temprano van a ser esenciales para el paciente, sin embargo el impacto en la transmisión será limitado si no se abordan los animales reservorios ni los insectos vectores.

Hay estudios serológicos que demuestran un descenso de la incidencia de leishmaniasis visceral en niños debido al sacrificio de perros seropositivos (Ashford y col., 1998; Palatnik de Sousa y col., 2001). Sin embargo, el impacto no fue tan importante y se debió a la baja sensibilidad de los test de diagnóstico, el retraso entre el diagnóstico y el sacrificio, y la baja aceptación de la medida por parte de los dueños de los perros. Los modelos matemáticos sugieren que el control de los vectores y la vacunación de los perros, son medidas de control mucho más eficaces que el sacrificio, sin embargo hasta el día de hoy no existen vacunas eficaces para esta enfermedad. El tratamiento no sería tan efectivo, porque las recaídas son frecuentes y los perros vuelven a ser infecciosos de nuevo rápidamente (Romero y Boelaert, 2010).

Para desarrollar medidas de control efectivas en América latina no se pueden extrapolar métodos que funcionen en otras zonas, dada la heterogeneidad de las especies causantes de la enfermedad, la variedad de vectores y los diferentes patrones de transmisión. Por ello se necesitan estudios específicos en cada zona y ajustar las medidas de control a las necesidades requeridas (Romero y Boelaert, 2010).

Diversas organizaciones públicas y privadas han emprendido iniciativas específicas para el control de la leishmaniasis; la colaboración interinstitucional abarca la participación del sector privado, si bien en una medida aún no comparable a la colaboración prestada en el caso de otras enfermedades tropicales desatendidas. A este respecto, se pueden señalar los ejemplos siguientes: *i*) la iniciativa del Gobierno de España para contribuir, junto con la OMS, al control de la leishmaniasis visceral en

Etiopía y el Sudán; *ii*) la plataforma organizada en el Cuerno de África por la Drugs for Neglected Diseases Initiative (Iniciativa en pro de los Medicamentos para las Enfermedades Desatendidas) para la realización de ensayos clínicos; *iii*) el proyecto de acuerdo entre la Fundación Bill y Melinda Gates y la campaña de la entidad sin fines de lucro OneWorld Health para realizar los ensayos clínicos de fase III/IV de la paromomicina en la India; *iv*) los programas específicos de las organizaciones no gubernamentales Médecins sans Frontières y HealthNet International, y *v*) las actividades para controlar la actual epidemia de leishmaniasis cutánea en Kabul, apoyada por los Gobiernos del Afganistán y de Bélgica, la OMS, la Fundación La Caixa, HealthNet International y la Fundación Massoud. Algunas empresas farmacéuticas han acordado reducir los precios de sus medicamentos.

La OMS ha impartido a los países más endémicos capacitación especializada en la realización de actividades sobre el terreno y ha ayudado a organizar programas nacionales de control, aun cuando será preciso mejorar su coordinación. Deben intensificarse las actividades de apoyo a los equipos que suministran atención en las zonas más remotas. Hay que ampliar los programas de control a los países afectados donde aún no existen, para lo cual será necesario establecer una estructura descentralizada que cubra las zonas donde existen focos importantes de esta enfermedad, aumentar el número de centros colaboradores de la OMS y asignarles un papel más destacado, y apoyarse en iniciativas emprendidas por las diversas partes mencionadas en el párrafo anterior.

Es fundamental intensificar la colaboración entre los países para crear centros de vigilancia «centinela», cartografiar los focos y la prevalencia sobre la base de evaluaciones epidemiológicas, formar personal técnico para investigar los fracasos terapéuticos, y establecer sistemas informáticos para la recogida y el análisis de datos.

### **2.2.3. Diversidad clínica de la leishmaniasis**

Una de las características más notables de la leishmaniasis es la diversidad de enfermedades causada por agentes morfológicamente similares. La diversidad no está totalmente explicada por la diversidad genética de los parásitos. Además, está generada en parte por la variedad en la respuesta del hospedador a la infección y en parte por la restricción de los parásitos a partes u órganos específicos del cuerpo. En experimentación animal se ha visto que la genética tiene un gran efecto en la respuesta del hospedador a la infección. Hay evidencias considerables de que las formas más virulentas pueden causar enfermedades no detectables en ciertos individuos. Por ello también es de considerar la respuesta inmune del hospedador. Se describen varias formas clínicas:

La **leishmaniasis cutánea** produce lesiones en la piel, principalmente en la cara, brazos y piernas. Aunque esta forma a menudo se cura de manera espontánea, a veces puede crear serias dificultades y cicatrices permanentes (WHO, 2010).

La **leishmaniasis cutánea difusa**, suele aparecer en individuos inmunodeprimidos y su importancia es debida a que es difícil de tratar ya que sus lesiones son diseminadas, se asemejan a la lepra y no se curan de forma espontánea. Se inicia con una lesión que puede ser úlcera, placa o nódulo que posteriormente dan lugar a lesiones satélites. Esta forma particular se relaciona con un sistema inmunológico defectuoso y se caracteriza por recaídas después del tratamiento. Por tanto es crónica y resistente a terapia.

La **leishmaniasis mucocutánea**, también llamada "espundia" en América del Sur, causa lesiones en la cara, así como la destrucción de las membranas mucosas de la nariz, boca y garganta. Después de meses o años de una lesión cutánea, los parásitos se diseminan por vía linfática hacia la oronasofaringe. Se forman lesiones nodulares que evolucionan a úlceras. Al final se perfora el tabique y se produce una deformación de la nariz llamada "nariz de tapir". Otras veces la lesión mucosa empieza en el paladar blando con posterior destrucción de la úvula. Otras lesiones pueden aparecer en la epiglotis y producen disfonías. La cirugía reconstructiva de deformidades es una parte importante de la terapia (WHO, 2010).

La **leishmaniasis visceral**, es la forma más grave de la leishmaniasis y suele ser mortal si no se trata. El período de incubación puede ser de meses o años y, a diferencia de la forma cutánea de la leishmaniasis, ésta afecta a los órganos internos. Tras la aparición de un úlcera cutánea la enfermedad visceral puede establecerse con grave esplenomegalia, hepatomegalia y signos hematológicos como anemia y leucopenia. La leishmaniosis visceral se puede clasificar como endémica,



esporádica o epidémica y las manifestaciones clínicas suelen diferir según se trate de una u otra de las tres situaciones (WHO, 2010).

La **endémica** afecta sobre a todo a niños y se desarrolla en la zona del Mediterráneo, Asia sudoriental, China y América Latina. La incidencia es dos veces mayor en los hombres que en las mujeres. El periodo de incubación oscila entre 10 días y más de un año. Los síntomas más frecuentes son fiebre, malestar, pérdida de peso y anorexia; a veces aparecen tos y diarrea. Los signos clínicos más corrientes son esplenomegalia indolora a la presión (el bazo es blando a diferencia de otras esplenomegalias (*bazo de leche*)), hepatomegalia moderada (el hígado también es blando y con el reborde marcado) y linfadenopatía, consunción y palidez de las membranas mucosas. En la India es frecuente el oscurecimiento de la piel de la cara, manos, pies y abdomen (**kala-azar**: enfermedad negra). Existen signos de malnutrición (edema y alteraciones de la piel y el cabello). A veces se producen neumonía, disentería o tuberculosis pulmonar.

La leishmaniasis visceral **esporádica** se da cuando las personas no nativas de cualquier edad entran en una zona endémica y contraen la enfermedad. La fiebre aparece entre tres semanas y dos años después de la exposición. La enfermedad puede avanzar de forma aguda con escalofríos, fiebre alta ondulante, sudor abundante, pérdida de peso rápida y malestar profundo. A veces aparece anemia hemolítica aguda grave, lesión renal aguda y hemorragia intensa de las mucosas.

La leishmaniasis visceral **epidémica** se puede presentar en todas las edades, excepto los que hayan sido infectados en una epidemia anterior. Se produce más frecuentemente en los hombres que en las mujeres en una proporción de 4:3. Las formas agudas son raras.

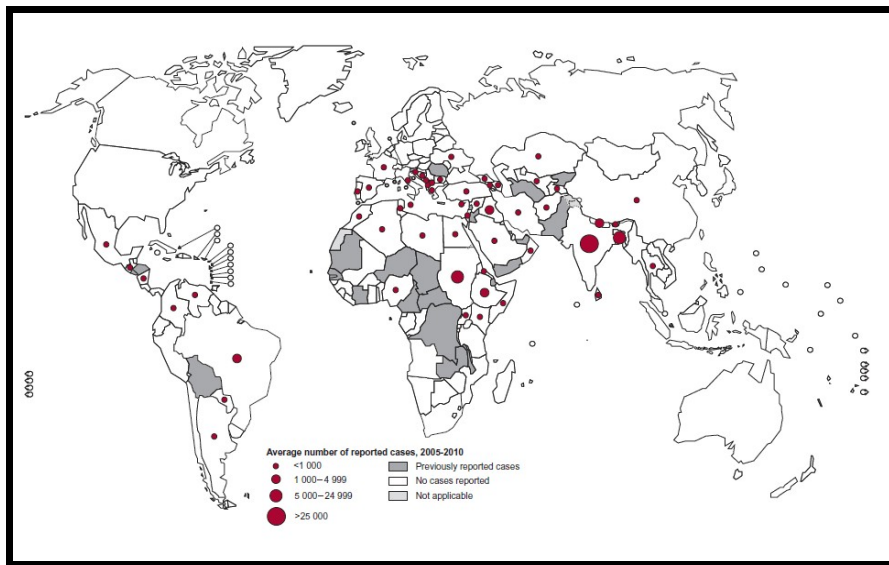
También existe **enfermedad subclínica** ya que se cree que en algunos países los casos subclínicos superan a los casos clínicos en una proporción de 5:1.

La **leishmaniasis dérmica post-kala-azar (LDPK)**, está causada por la especie *L. donovani*, después de la cura de una leishmaniasis visceral inicial y es característica del subcontinente indio, aunque se observa ocasionalmente en África oriental. No está asociada a la infección por *L. infantum*. Se presenta ocasionalmente en pacientes sin historial de enfermedad visceral, pero solo en lugares en los que *L. donovani* es transmitida. A veces se desarrolla antes de que la infección visceral se haya curado, pero su aparición se puede retrasar hasta dos años. Es una enfermedad variable que puede empezar como una punción, despigmentación progresiva dando a la piel un aspecto de moteado o puede ser notada al principio como unas discretas pápulas, principalmente en superficies expuestas a la luz. Puede progresar produciendo una superficie extensa de pápulas o discretos nódulos (WHO, 2010).

La leishmaniasis visceral es una de las infecciones oportunistas que ataca a personas con VIH. La población infantil ha sido la más afectada por esta enfermedad, aunque actualmente se ha observado con mayor frecuencia en los adultos infectados por VIH. En estos casos de coinfección, la leishmaniasis visceral está latente o se adquiere una vez desarrollado el proceso inmunosupresor, que evoluciona en estas personas de un modo explosivo y con una elevada falta de respuesta a los fármacos usados para su tratamiento.

### **2.2.4. Distribución de la leishmaniasis**

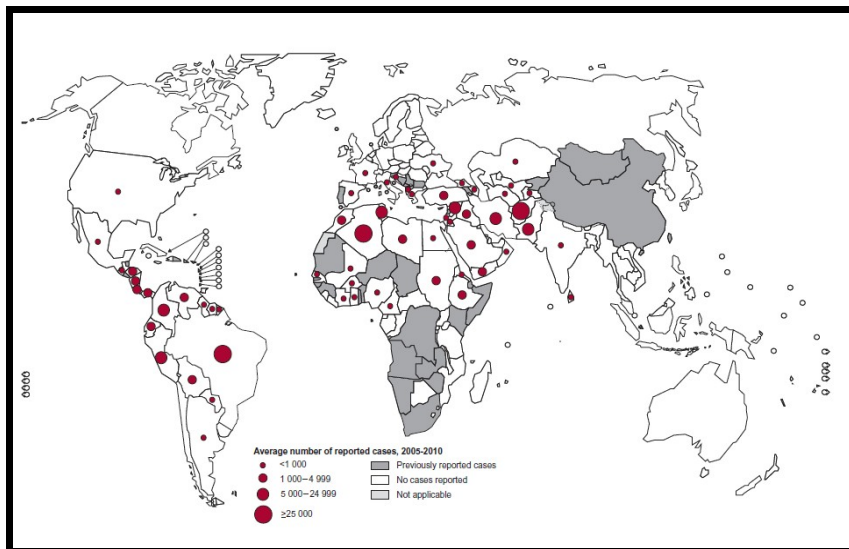
Actualmente la leishmaniasis presenta una distribución cosmopolita y son endémicas en las regiones tropicales y subtropicales de 98 países, de los cuales 72 están en vías de desarrollo. El 90% de los casos de leishmaniasis cutánea ocurren en Afganistán, Argelia, Brasil, Irán, Perú, Arabia Saudita y Siria; el 90% de los casos de leishmaniasis muco-cutánea se dan en Bolivia, Brasil y Perú; y 90% de los casos de leishmaniasis visceral se encuentran en Bangladesh, Brasil, India, Nepal y Sudán (WHO, 2013).



Mapa 1: Distribución de la Leishmaniasis Visceral en el Nuevo Mundo  
(Fuente: Second WHO report Neglected Tropical Diseases. 2013)

La leishmaniasis en el Nuevo Mundo actualmente se distribuye desde el sur de Estados Unidos hasta el norte de Argentina. En México la leishmaniasis se ha registrado en 22 estados y se considera endémica en los estados de: Chiapas, Oaxaca, Tabasco, Veracruz, Campeche, Yucatán y

Quintana Roo (Bonfante-Garrido, 1983; Córdova-Uscanga y col., 1993; Velasco Castrejón y col., 2009; Sánchez-García y col., 2010). En estos estados la manifestación clínica que se suele observar es la leishmaniasis cutánea y en su transmisión están implicadas diferentes especies de vectores del género *Lutzomyia* (*Lu. olmeca*, *Lu. whitmanni*, *Lu. pessoai*, *Lu. mogonei* y *Lu. Intermedia*, entre otras) (Bonfante-Garrido, 1983).



Mapa 2: Distribución de la Leishmaniasis Cutánea  
(Second WHO report Neglected Tropical Diseases. 2013)

Las principales especies que existen en el continente americano son: *L. braziliensis*, *L. guayanensis*, *L. panamensis*, *L. mexicana*, *L. amazonensis*, *L. colombiensis*, *L. infantum* (syn. *chagasi*), *L. peruviana* y *L. pifanoi*. La situación epidemiológica y las tendencias demográficas son diferentes para cada especie de *Leishmania* (Tolezano y col., 2007)

En la península del Yucatán (constituida por los estados de Yucatán, Quintana Roo y Campeche) se sabe de la existencia de la leishmaniasis

desde 1912 (Seidelin, 1912). En algunas áreas, especialmente zonas chicleras o exchicleras, se consideran endémicas para la leishmaniasis cutánea y mucocutánea (Andrade-Narvaez y col., 2003; Rebollar-Téllez y col., 1996; Ibáñez-Bernal, 1999), sin embargo se ha observado un cambio importante en el ecosistema que podría estar modificando la dinámica de transmisión, tanto en vectores como reservorios, como se ha observado en el estudio realizado en Chetumal, Quintana Roo (Sánchez-García y col., 2010) y en otros estados como Tabasco, donde se ha observado esta parasitosis en centros periurbanos (Córdova-Uscanga y col., 1993).

### **2.3. *Trypanosoma cruzi* y la enfermedad de Chagas**

La tripanosomiasis americana, mal o enfermedad de Chagas es una zoonosis muy compleja que está presente de forma endémica en toda Latino América, representando una grave amenaza para la salud de los países de la región. Esta enfermedad parasitaria está causada por el protozoo hemoflagelado *Trypanosoma cruzi*. Este parásito fue descubierto en 1909 por Carlos Chagas, quien lo caracterizó, estableció su ciclo de vida y su vía natural de transmisión, por las deyecciones de los triatomos hematófagos. Actualmente, se conocen otras formas de transmisión: por alimentos contaminados con el parásito, por la transfusión de sangre infectada, por la transmisión de la madre parasitada a su hijo durante el embarazo o el parto, por el trasplante de órganos provenientes de una persona infectada o por accidentes de laboratorio (Yoshida, 2009).

La OMS la considera como una de las 9 enfermedades más olvidadas del mundo (WHO, 2007), teniendo en cuenta que es una de las parasitosis más graves en los humanos, tanto por su prevalencia como por la gravedad de su cuadro clínico (Hotez, 2008). La transmisión vectorial de esta enfermedad alcanza el 80% de los casos y un 20% es por vía congénita (Rassi Jr y col., 2010). Se calcula que aproximadamente unos 10 millones de personas están infectadas en América Latina (Coura y Dias, 2009 ; Schmunis y Yadon, 2010; WHO, 2012) y causa unas 14.000 muertes al año (Coura y Viñas, 2010; WHO, 2010). Más de 25 millones de personas están en riesgo de adquirir la enfermedad (WHO, 2012). El impacto de la

transmisión vertical de la enfermedad se estima en Latinoamérica en más de 15.000 casos por año (PAHO, 2006).

### 2.3.1 Morfología y ciclo de vida de *T. cruzi*

*T. cruzi* presenta un ciclo de vida heteroxeno que requiere la presencia de dos hospedadores, uno invertebrado (hemípteros hematófagos) y otro vertebrado. Este parásito es un organismo pleomórfico que tiene varias fases en su ciclo vital, unas en el hombre u hospedadores reservorios mamíferos y otras en los insectos transmisores. En el hospedador mamífero se encuentra en la sangre la forma típica de **tripomastigota sanguínea** (Figura 3), mientras que en las células del sistema retículoendotelial y de otros tejidos adopta la forma intracelular típica de **amastigota**. En el insecto transmisor triatomino, este parásito presenta la morfología de las fases de **epimastigota** y **tripomastigota metacíclica**. (Adams, 2013)

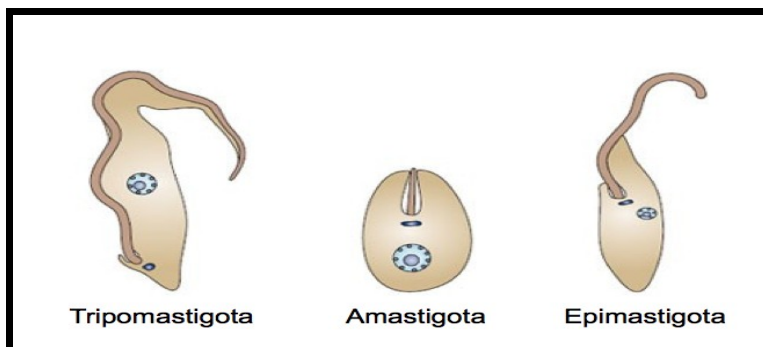


Figura 3: Formas que adopta *T. cruzi* en su ciclo de vida  
<http://www.nature.com/scitable/topicpage/kinetoplastids-and-their-networks-of-interlocked-dna-14368046>

Las **formas tripomastigotas sanguíneas** se encuentran en la sangre de los hospedadores mamíferos (humanos, perros, gatos,...). Son fusiformes, en forma de “C” o “S”, y miden 20  $\mu\text{m}$  de largo por 1  $\mu\text{m}$  de ancho. En la unión de los dos tercios posteriores con el anterior se localiza el núcleo, elipsoidal y vesiculoso; mientras que en el extremo posterior se observa el kinetoplasto. El axonema parte del cuerpo basal, situado dentro de la bolsa flagelar, y corre a lo largo del cuerpo del parásito, por fuera, con pocas ondulaciones. La forma tripomastigota no se multiplica en la sangre del hospedador.

Las **formas amastigotas** son intracelulares y se observan en las fibras del músculo cardíaco estriado o los fagocitos. Éstas carecen de flagelo y son redondeadas, presentando un tamaño de 2 a 5  $\mu\text{m}$  de diámetro. El kinetoplasto se ve como un cuerpo oscuro cerca del núcleo. Se multiplica por fisión binaria formando racimos o nidos llenando la célula hospedadora hasta que se rompe. Los parásitos liberados se transforman en tripomastigotas que infectan otras células.

El vector se infecta al tomar la sangre del hospedador mamífero infectado. En el intestino del triatomino se forman los **epimastigotas** y, al cabo de 15 o 30 días, en el recto aparecen las **tripomastigotas metacíclicas** infectantes. En ellos el kinetoplasto se encuentra detrás del núcleo y en la parte posterior del parásito, el flagelo sale del extremo posterior y se dobla hacia adelante a lo largo del parásito formando una membrana ondulante a lo largo de su cuerpo. La transmisión solo ocurre cuando el insecto defeca en el momento de alimentarse (Carrada-Bravo y col., 2004).



En el hombre las tripomastigotas no se multiplican mientras están en el torrente circulatorio, pero una vez que penetran en los macrófagos o células de los tejidos, pierden el flagelo y la membrana ondulante, transformándose en formas amastigotas. Éstas se multiplican por fisión binaria, lo que da origen a la formación de gran número de clones, que adoptan la forma típica de tripomastigota y aparecen en la sangre periférica, completando así su ciclo (Faust, 2003; Adams, 2013).

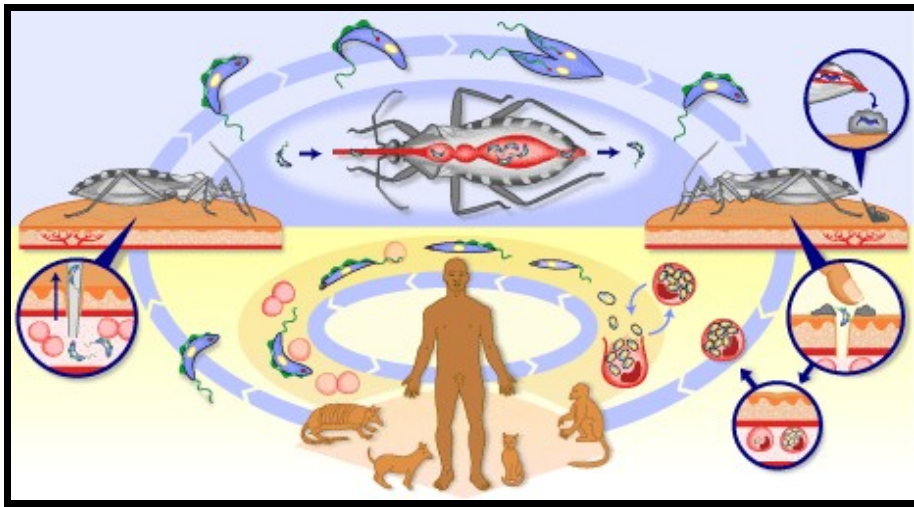


Figura 4: Ciclo de vida de *T. cruzi*

[http://www.who.int/tdr/diseases/chagas/life\\_cycle\\_trypanosoma/en/](http://www.who.int/tdr/diseases/chagas/life_cycle_trypanosoma/en/)

En los vectores triatóminos, conocidos vulgarmente con diferentes nombres tales como “chiches besuconas”, “chiches hociconas” o “vinchucas”, el ciclo de desarrollo puede realizarse en todos los estadios de ninfas o adulto, y siempre se efectúa en el intestino de la chinche. Las formas típicas de tripomastigotas sanguíneas son ingeridas por el insecto al alimentarse de un mamífero infectado y éstas se convierten en epimastigotas que se multiplican y se encuentran en la parte posterior del intestino medio. Al cabo de unos ocho o diez días aparecen en el recto las

formas infectantes para el hombre y mamíferos, que se han originado de las epimastigotas, denominadas tripomastigotas metacíclicas. Los triatomíneos tras alimentarse suelen defecar, liberando en sus heces las formas tripomastigotas metacíclicas que pueden entrar en el hospedador a través de las mucosas o heridas. El mamífero al rascarse puede inocular las tripomastigotas en la herida de la picadura, por lo que las especies de vectores que presentan un retraso en la defecación tienen menos probabilidad de transmitir la enfermedad de Chagas que los que defecan en el hospedador tras alimentarse (de Souza y col., 2010). La infección puede adquirirse también por vía transplacentaria o sanguínea, por trasplante de órganos o también por vía oral cuando la comida o líquidos están contaminados con *T. cruzi* y son ingeridos por animales o el hombre (Coura, 2006). El ciclo vital de *T. cruzi* se encuentra representado esquemáticamente en la Figura 4.

### **2.3.2. Control de la enfermedad de Chagas: Hospedadores y vectores**

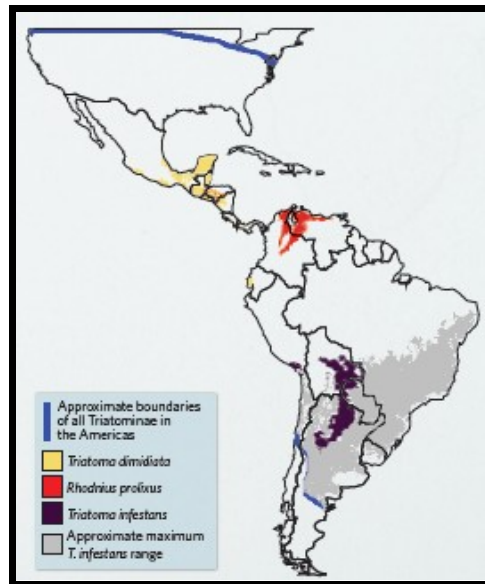
Originariamente *T. cruzi* sólo tenía como reservorios mamíferos de focos naturales, era una zoonosis de la que el hombre y los animales domésticos estaban excluidos. Como resultado de la interacción hombre-vector en zonas rurales y los cambios en el biotopo, la enfermedad ha pasado de tener un ciclo exclusivamente selvático o silvestre, a ocupar además un ciclo doméstico. Sin embargo según los últimos estudios de paleoepidemiología, la enfermedad de Chagas parece ser tan antigua como la presencia humana en el continente americano, donde convivían

humanos, mamíferos reservorios y triatomíneos vectores (Aufderheide y col., 2004).

Los reservorios naturales de *T. cruzi* son mamíferos (domésticos, peridomésticos y salvajes), infectados naturalmente por el parásito (PAHO, 2009). Respecto al ciclo doméstico, los perros y los gatos juegan un importante papel en la dinámica de la transmisión al ambiente humano. A éstos tenemos que añadir otros no de menor importancia como las cabras, ovejas, cerdos, alpacas, cobayas, ratones y ratas. La circulación del parásito en el ciclo doméstico es dinámica y estos animales se suelen infectar a edades tempranas en cuanto toman contacto con los vectores.

Para el ciclo salvaje se han descrito más de 180 especies de pequeños mamíferos tanto arbóreos como terrestres, en todo el continente americano, que han sido infectadas naturalmente con *T. cruzi*. Los reservorios salvajes de importancia epidemiológica, incluyen algunos desdentados, marsupiales y roedores que, debido a sus hábitos y las condiciones locales favorables (deforestación y laboreo excesivo), juegan un importante papel en la conexión entre el ciclo doméstico y el selvático del parásito (PAHO, 2009).

Los vectores del mal de Chagas son las chinches hematófagas pertenecientes a la subfamilia Triatominae (Orden Hemiptera, familia Reduviidae).



Mapa 3: Distribución de los vectores de *T. cruzi*  
[www.nature.com/outlooks](http://www.nature.com/outlooks)

Se trata de chinches hematófagas obligadas de hábitos nocturnos y de las que aproximadamente se conocen unas 138 especies y la gran mayoría de éstas se localizan en América, desde México hasta Argentina y Chile, pero sólo algunas son competentes vectores para *T. cruzi* (Argolo y col., 2008). *Triatoma infestans*, *Rhodnius prolixus* y *Triatoma dimidiata* son las especies de vectores más importantes en la transmisión de *T. cruzi* al hombre, presentando tres ciclos que se superponen: doméstico, peridoméstico y selvático (Miles y col., 2009).

Los insectos vectores normalmente viven en hábitats naturales en contacto con aves, mamíferos y reptiles en diferentes ecosistemas. Las especies epidemiológicamente ligadas a la enfermedad de Chagas están adaptadas al ambiente humano. Los triatomíneos que colonizan permanentemente las casas y son fuertemente antropofílicos, son

considerados de primera importancia epidemiológica. Se pueden encontrar en las grietas de las paredes, detrás de los cuadros y los ornamentos. Sin embargo, la mayoría tienen hábitos selváticos, y se pueden encontrar bajo el tronco de árboles muertos, en los huecos de los árboles y en madrigueras de pequeños mamíferos (WHO, 2002).

Respecto a las medidas de control, la enfermedad de Chagas es difícil de erradicar, ya que es una zoonosis y comprende una larga lista de reservorios: más de 150 especies de animales domésticos (perros, gatos y cobayas) y a mamíferos silvestres (roedores, marsupiales y armadillos).

Los primeros programas nacionales de control de la enfermedad de Chagas comenzaron en la década de los 70, priorizando la mejora de la vivienda (en Venezuela y partes de Uruguay). De forma paralela, se incrementaron por todo el continente los estudios epidemiológicos basados principalmente en encuestas entomológicas y serológicas que mostraban la distribución de los vectores infestados y determinaban tasas directas de prevalencia y las estimaciones de incidencia en los países y subregiones. En la década siguiente se priorizaron los programas de control en países como Argentina, Brasil, Chile y Uruguay, y destaca el incremento del control de los bancos de sangre. A partir de esta década hubo avances técnicos significativos, como la aparición de insecticidas piretroides de síntesis, con mayor efecto residual y menor daño ambiental y personal, con lo que reemplazaron a los fosforados y órgano-clorados. A partir de la década de los 90 se ponen en marcha las “Iniciativas Intergubernamentales para el Control de la Enfermedad de Chagas” en las Américas, bajo la

coordinación de los países involucrados y de la Organización Panamericana de la Salud (Pinto, 2005).

Estas iniciativas subregionales son:

- Iniciativa del Cono Sur para controlar y eliminar la enfermedad de Chagas (**INCOSUR**). Fue creada en Brasilia el año 1991. Países participantes: Argentina, Bolivia, Brasil, Chile, Paraguay y Uruguay. Como resultados destacados cabe citar la interrupción de la transmisión vectorial de *T. cruzi* por *Triatoma infestans* en la casi totalidad de su área endémica en el año 2000, el descenso de la infestación domiciliar por *T. infestans* en amplias áreas, y la mejora y evaluación de la calidad de la transfusión sanguínea.
- Comisión Intergubernamental de la Iniciativa de los Países de Centroamérica para la Interrupción de la Transmisión Vectorial y Transfusional de la Enfermedad de Chagas (**IPCA**). Se creó en 1997 en Honduras. Países participantes: Belice, Costa Rica, El Salvador, Guatemala, Honduras, México, Panamá, y Nicaragua. Sus objetivos son la eliminación del vector *Rhodnius prolixus*, la disminución de la infestación intradomiciliar por *Triatoma dimidiata*, y la eliminación de la transmisión transfusional de *T. cruzi*.
- Iniciativa de los Países Amazónicos para la Vigilancia y Control de la Enfermedad de Chagas (**AMCHA**). Fue creada en Manaus en el año 2004. Países participantes: Bolivia, Brasil, Colombia, Ecuador, Francia, Guayana, Perú, Surinam y Venezuela.
- Iniciativa de los Países Andinos de Control de la Transmisión Vectorial y Transfusional de la Enfermedad de Chagas (**IPA**).

Comenzó en Colombia en el año 1997. Países participantes: Colombia, Ecuador, Perú y Venezuela.

Gracias a todo ello se ha interrumpido la transmisión vectorial de *Trypanosoma cruzi* por las principales especies de triatomínicos vectores en Uruguay, Chile, Brasil y cinco provincias de Argentina, alcanzándose esta meta en el bienio 2008-2009 para Guatemala, Paraguay, Honduras, El Salvador (para *R. prolixus*), dos estados de México (Chiapas y Oaxaca para *R. prolixus*) y dos departamentos de Perú (Tacna y Moquegua); y aún sin completar esta meta, todos los países endémicos han tenido avances en lo que a control de la transmisión vectorial domiciliaria se refiere, con descenso de sus índices de infestación triatomínica domiciliaria.

Además, desde 2009, a los 14 países que contaban con tamizaje universal de Chagas en bancos de sangre, se han sumado Chile, Panamá, Perú y Guyana. También se está abordado la prevención y atención de la enfermedad de Chagas como enfermedad transmitida por alimentos (ETA), generándose guías y procedimientos coordinados con las áreas de inocuidad de alimentos y capacitación de recursos humanos implicados.

La atención médica de la enfermedad de Chagas está mejorando en su calidad y cobertura, incluyendo el diagnóstico preventivo prenatal de infección materna para diagnosticar a tiempo y adecuadamente la infección de recién nacidos infectados por vía transplacentaria.

No hay ningún medicamento disponible para su uso a gran escala que reduzca la probabilidad de transmisión y tampoco ninguna vacuna capaz de

proteger a individuos susceptibles. Consecuentemente, la mejor forma de control posible sería reducir las oportunidades de interacción entre humanos y vectores, lo cual se consigue mediante el uso de insecticidas para matar los triatominos alojados en las casas y habilitar las casas de manera que les sea más difícil a los vectores su colonización (WHO, 2002).

### **2.3.3. Manifestaciones clínicas de la enfermedad de Chagas**

La enfermedad de Chagas tiene dos fases claramente diferenciadas, una aguda y una crónica, con un período de incubación es de 5 a 14 días post-exposición con heces de insectos triatóminos, y de 20 a 40 días a través de transfusión sanguínea. Sin embargo, muchas personas no son sintomáticas hasta la etapa crónica, que puede ocurrir entre los 5 y 40 años tras producirse la infección.

La primera fase, la aguda, suele ser asintomática en el 70% de los casos y más frecuente en niños. Tiene una duración aproximada de dos meses después de contraerse la infección. En esta etapa, los amastigotes de *T. cruzi* se reproducen dentro de las células y las destruyen. Posteriormente, los parásitos libres invaden otras células que también se rompen y causan reacción inflamatoria con infiltrado de diferentes tipos de leucocitos. Durante los primeros 15 días, en menos del 50% de los casos, puede presentarse el llamado "chagoma de inoculación", un nódulo subcutáneo con adenitis regional en el sitio de la picadura; en casos de inoculación ocular, es posible identificar el "signo de Romana", edema



bipalpebral unilateral, con adenitis retroauricular, característico de la enfermedad (Carrada-Bravo y col., 2004). Durante esta fase circulan por el torrente sanguíneo una gran cantidad de parásitos y en la mayoría de los casos no hay síntomas o éstos son leves. Puede haber fiebre, dolor de cabeza, agrandamiento de ganglios linfáticos, palidez, dolores musculares, dificultad para respirar, hinchazón y dolor abdominal o torácico. A pesar de esto, el índice de mortalidad en la fase aguda es bajo, cerca del 10%. Las muertes ocurren principalmente por miocarditis, meningoencefalitis y otras complicaciones como bronconeumonía (Lugones, 2002) y son más comunes en niños en los cuales la mortalidad puede llegar al 40%.

Tras la **fase aguda** la persona infectada que no es tratada entra en un período de latencia, en el cual la sintomatología se apaga, hay multiplicación lenta de los parásitos y presencia de anticuerpos circulantes específicos. Esta fase puede durar toda la vida o pasar a la etapa crónica. (Carrada-Bravo, 2004).

Después de la fase aguda ocurre una respuesta inmune que provoca disminución de la parasitemia y mantiene la infección en algunos focos selectivos. Este período va desde el final de la fase aguda hasta la aparición de los primeros síntomas de la fase crónica y se denomina **fase latente o indeterminada** con una duración media de 10 años. Se estima que esta fase la desarrollan del 50 al 70% de los individuos infectados que se caracteriza por no desarrollar sintomatología alguna, presentan una baja parasitemia y parásitos en los tejidos, aunque si son seropositivos a *T. cruzi* y pueden permanecer en este estado durante el resto de sus vidas. Sin

embargo, pasados 20-30 años o más en la fase indeterminada, el 30-35% de los individuos desarrollarán la fase crónica y sistémica.

La **fase crónica** se manifiesta 10 o más años después de la primera infección. Durante esta fase los parásitos permanecen ocultos principalmente en el músculo cardíaco y digestivo. Hasta un 30% de los pacientes sufren cardiopatías y hasta un 10% presentan alteraciones digestivas conocidas como “megas” por su carácter inflamatorio (megaesófago o megacolón), neurológicas o mixtas (Rassi Jr y col., 2010). Con el paso de los años, la infección puede causar muerte súbita o insuficiencia cardíaca por la destrucción progresiva del músculo cardíaco (WHO, 2010). Las manifestaciones clínicas incluyen principalmente arritmias, disnea de grandes a pequeños esfuerzos, palpitaciones, edema de miembros inferiores, dolor torácico, cuadros sincopales. En ocasiones los pacientes acuden con datos de tipo anginoso, insuficiencia cardíaca congestiva, embolia pulmonar o sistémica, sin recordar antecedentes compatibles con la enfermedad de Chagas. También pueden aparecer tromboembolias y destrucción de las células del sistema nervioso central.

### 2.3.4. Distribución de la enfermedad de Chagas

La enfermedad de Chagas está asociada a la pobreza y a las malas condiciones de vivienda, por ello se extiende principalmente en las áreas rurales de todo el continente latinoamericano y en los cinturones de pobreza alrededor de las grandes ciudades, donde no tienen posibilidad de acceder a una atención médica adecuada. Está considerada como la enfermedad parasitaria con mayor carga económica en América Latina debido a su prolongada cronicidad y está relacionada con el desarrollo socio-económico del país.

Es endémica en 21 países de Latinoamérica, casi el 25 % de la población del continente sudamericano (Mapa 4).



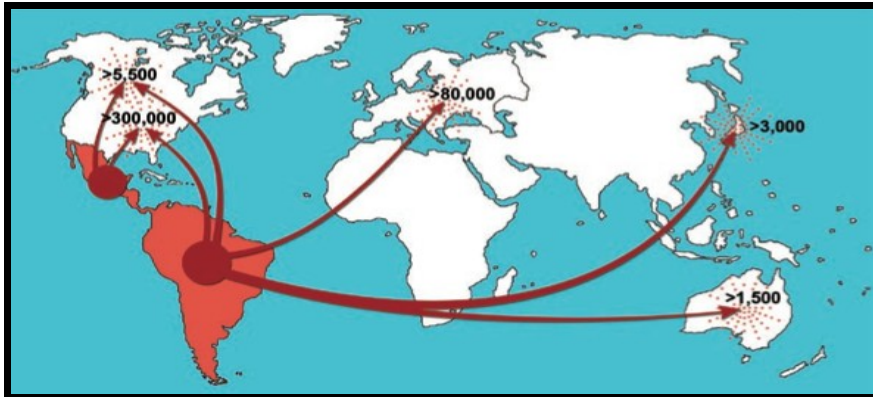
Mapa 4: Distribución de la enfermedad de Chagas.  
www.nature.com/outlooks

## INTRODUCCIÓN

Existe una amplia variedad de tasas de prevalencia, vías de transmisión, características de los parásitos, síntomas clínicos y reservorios entre una región endémica y otra. Se estima que existen más de 25 millones de individuos que viven bajo el riesgo de infectarse y sobre unos 10 millones de personas infectadas en todo el mundo. En 2008 se registraron más de 10000 fallecidos por esta enfermedad (WHO, 2010)

La enfermedad puede encontrarse desde la latitud 42° N (Norte de California) a la latitud 46° S (Sur de Argentina y Chile), sin embargo la distribución de vectores y reservorios es mayor a la de la enfermedad humana (WHO, 2010). Los países más afectados son: Bolivia (6.8% de los casos informados); Argentina (4.1%); El Salvador (3.4%); Honduras (3.1%); Paraguay (2.5%); Guatemala (2%); Ecuador (1.7%); Guayana Francesa, Guyana, and Surinam (1.2%); Venezuela (1.2%); Nicaragua (1.1%); Brasil (1%); y México (1%). (PAHO, 2006).

Se ha notificado la transmisión por transfusión sanguínea con creciente frecuencia, aun en países no endémicos, debido a los fenómenos masivos de migración (Rassi Jr y col., 2010). Es considerada como la segunda vía de adquisición de la infección, ya que todo individuo infectado representa un reservorio potencial del parásito. Por lo que, es importante tener en cuenta que los movimientos migratorios de las zonas rurales a las zonas urbanas han cambiado las características epidemiológicas de la enfermedad de Chagas, transformándose así la infección originariamente rural en urbana.



Mapa 5: Flujo de migraciones de América Latina hacia regiones no endémicas para la enfermedad de Chagas ([www.nature.com/outlooks](http://www.nature.com/outlooks))

Es importante agregar que dicha transmisión no se limita a los países en los que la enfermedad es endémica. La migración de personas infectadas por *T. cruzi* plantea un problema de salud pública, incluso, en países en los que no hay transmisión vectorial del parásito, como Canadá, Estados Unidos, Japón, Australia y España (Mapa 5), en donde se han detectado casos de transmisión sanguínea por *T. cruzi* (Coura y Viñas, 2010).

Esta globalización de la enfermedad de Chagas constituye un importante factor de riesgo de transmisión de la infección por *T. cruzi* por transfusión sanguínea, y por lo tanto, obliga a los países no endémicos a adoptar medidas de prevención y control, además del establecimiento de nuevas políticas y estrategias para la tamización de donantes en bancos de sangre, así como el eventual seguimiento y tratamiento de los pacientes infectados.

Los enormes progresos realizados en el control de la enfermedad de Chagas en las últimas décadas indica claramente que los obstáculos a la eliminación completa de la transmisión de *T. cruzi* al ser humano son principalmente económicos y políticos. En este contexto, no hay avances adicionales importantes, tales como la comprensión más detallada de la patogenia de la enfermedad de Chagas, análisis genéticos realizados posteriormente, nuevas técnicas de diagnóstico, o avances en el desarrollo de vacunas (Carlier, 2004).



### **3. ANTECEDENTES**





### **3.1. Importancia de los animales domésticos en la transmisión de la leishmaniasis y la enfermedad de Chagas**

Los roedores siempre se ha considerado como los reservorios de la **leishmaniasis**, pero el descubrimiento en Brasil en 1913 del primer perro infectado por *Leishmania* (Pedroso, 1913) ha planteado el problema a nivel mundial de la posibilidad de que los perros jugaran un papel mucho más importante en la transmisión de la enfermedad, por su desplazamiento entre áreas salvajes y áreas domésticas, de hecho hasta el día de hoy se han descrito casos de leishmaniasis en perros en muchos países (Hotez, 2008; Dantas-Torres, 2007; Castro y col., 2007; Marco y col., 2005; Madeira y col., 2005; Taranto y col., 2000). En 2009 se reportó por primera vez la infección por *L. mexicana* en perros de los estados mexicanos de Campeche, Quintana Roo y Oaxaca (Velasco-Castrejón y col., 2009). Hay que tener en cuenta las modificaciones en el medio ambiente en la Península del Yucatán, por una parte los desastres naturales y por otra el gran crecimiento demográfico en áreas en las que el turismo es la principal fuente de ingreso. Todo esto ha permitido que la leishmaniasis presente una mayor diversidad de reservorios, y teniendo en cuenta que cada vez invadimos más las áreas selváticas. Se piensa que entre los reservorios que pudieran estar involucrados en la transmisión el perro sería uno de los principales eslabones en la transmisión peri-urbana y urbana debido a su sinantropismo, pudiendo ser uno de los vínculos de la transmisión silvestre a la urbana.

La prevalencia de *Leishmania* spp. en perros en el centro y sur de América varía según la región y el método de diagnóstico utilizado,

oscilando las tasas reportadas del 25 al 75% (Cortada y col., 2004). En México la prevalencia de la enfermedad alcanza el 58,3% (Esquinca y col., 2005). La mayoría de los perros que viven en las zonas rurales pueden presentar lesiones cutáneas o mucocutáneas, jugando un papel importante en la transmisión del ciclo doméstico de la enfermedad (Reithinger y Davies, 1999; Joao y col., 2006). La infección de los cánidos está influenciada por la distribución de los vectores y factores intrínsecos a estos animales como la edad, la condición física o la raza (Ordeix y col., 2005). La leishmaniasis canina está muy extendida por América del Sur y está entre las enfermedades caninas transmitidas por vectores más importantes que ocurren en esta región, principalmente por su gran relevancia zoonótica. Así, numerosas especies de *Leishmania* han sido aisladas y caracterizadas molecularmente en perros en América del Sur, incluidas: *L. amazonensis*, *L. braziliensis*, *L. colombiense*, *L. infantum* (syn. *chagasi*), *L. mexicana*, *L. panamensis*, *L. peruviana*, y *L. pifanoi* (Mayrink y col., 1979; Tolezano y col., 2007).

*L. infantum* (syn. *chagasi*) es el agente causal de leishmaniasis visceral canina más importante de Sudamérica, siendo el perro su principal reservorio. La leishmaniasis visceral canina puede cursar asintomática o sintomáticamente. Los perros cursan esta enfermedad con linfadenomegalia, daños oculares, atrofia muscular, úlceras en la piel, pérdida de peso y onicogrifosis (crecimiento anormal de las uñas) (Dantas-Torres y col., 2009). El aumento de inmunocomplejos circulantes que se depositan en las paredes de los vasos sanguíneos puede generar vasculitis, poliartritis y glomerulonefritis. El depósito de dichos inmunocomplejos en el riñón puede ocasionar fallo renal con la muerte del animal.

*L. braziliensis* es el principal agente causal de leishmaniasis cutánea en perros en América del sur. La mayoría de estos perros viven en áreas rurales y pueden presentar lesiones cutáneas o mucocutáneas, se piensa que probablemente juegan un importante papel en la transmisión del ciclo doméstico de *L. braziliensis* y *L. peruviana* (Reithinger y col., 1999). También se han aislado cepas híbridas de *Leishmania* spp. en perros de Sudamérica. Por ejemplo, se han aislado cepas híbridas de *L. braziliensis/L. peruviana* y *L. braziliensis/L. guyanensis* en perros de Perú y Venezuela, respectivamente. Estas cepas híbridas tienen características fenotípicas y genotípicas de las dos especies de *Leishmania* y se sugiere que estos híbridos pueden representar cepas originadas directamente de un antecesor común o ser el resultado de un intercambio genético (Lainson y Shaw, 2005).

El control de la infección por *Leishmania* en perros domésticos es fundamental para evitar la propagación de la enfermedad entre los perros y el hombre. Un punto claro es que la identificación y la eliminación de los perros infectados reduciría la prevalencia de la leishmaniasis en humanos. Las últimas investigaciones demuestran que el uso de insecticidas en los hogares, el uso de collares insecticidas para perros y el uso de una vacuna canina preventiva podrían potencialmente sustituir el sacrificio del perro. En cualquier caso, la vigilancia y control de la enfermedad en el ámbito del perro doméstico es fundamental para reducir la incidencia de las enfermedades humanas. (Palatnik de Sousa y col., 2001)

El gato es otro animal de compañía posiblemente involucrado en la transmisión de esta parasitosis en el ciclo doméstico. El primer caso de

leishmaniasis felina se registró en el 1912 en Algeria, donde el animal vivía con un perro que padecía la enfermedad y un niño con leishmaniasis visceral (Sergent y col., 1912). Desde el 1912 hasta el 2006 se han descrito unos 40 casos clínicos, de los cuales 21 han sido en países del sur de Europa. Se han registrado casos de leishmaniasis felina en: Portugal, Italia, Francia, España, Grecia, Israel/Palestina, Brazil, Egipto y Texas (USA) (Michael y col., 1982; Ozon y col., 1998; Maroli y col., 2007; Ayllon y col., 2008; Nasereddin y col., 2008; Diakou y col., 2009; Maia y col., 2010; Cardoso y col., 2010; Duarte y col., 2010; Otranto y Dantas-Torres, 2010; Trainor y col., 2010; Dourado Coelho y col., 2011), áreas consideradas endémicas y en Suiza, área no endémicas, sin embargo los gatos procedían de España (Rüfenacht y col., 2005). Los gatos siempre han mostrado una alta resistencia a la leishmaniasis, presentando titulaciones de anticuerpos muy bajas y ausencia de manifestaciones clínicas. Las bajas titulaciones de anticuerpos frente a *Leishmania spp.* encontrados en gatos se han atribuido a la capacidad de estos animales de desarrollar anticuerpos específicos frente a un agente patógeno presente en el entorno sin padecer la enfermedad (Manciantini, 2004). Sin embargo en estudio reciente se ha demostrado la presencia del ADN de *Leishmania* en gatos usando técnicas de PCR (Ayllon y col., 2008; Dourado Coelho y col., 2011). Aun no se sabe si el gato es o no es un reservorio de la enfermedad, además siempre se ha asociado la leishmaniasis felinas a otras enfermedades inmunodepresoras como la FIV (Feline Immunodeficiency Virus) y la FeLV (Feline Leukemia Virus) sin embargo muchos estudios están llevando adelante la idea de que sí lo podrían ser. En Italia y en Syria se han encontrado vectores del género *Leishmania* que se habían alimentado de forma natural de gatos (Maroli y col., 2007; Maroli y col., 2009), por lo

que hace sospechar que el gato, que mantiene uno hábito de vida parecido a los del perro pueda ser reservorio de la enfermedad y no un hospedador accidental.

Hasta el día de hoy en México no se ha reportado ningún caso de leishmaniasis en gatos. Tampoco se han reportado casos de leishmaniasis felina en otros países de centro y sur América, con excepción de Brasil que presenta una prevalencia de 5,76%. Hay que destacar que en este país la leishmaniasis canina alcanza valores muy altos (Dourado Coelho y col., 2011).

Los reservorios naturales de la **enfermedad de Chagas** son mamíferos que desempeñan un papel importante en el mantenimiento y la interacción de los ciclos domésticos, peri-domésticos y salvajes. Entre ellas, se ha demostrado que los perros son clave en el ciclo doméstico y se consideran un factor de riesgo para la infección en los seres humanos, lo que representa una conexión entre el ciclo doméstico y selvático del parásito (PAHO, 2009; Cruz-Chan y col., 2010). Los casos de infección por *T. cruzi* en perros se ha descrito en toda América Latina, desde el sur de Texas hasta el norte de Argentina. Se han reportado casos en Chile, isla de Grenada (Antillas), Brasil y Colombia (Rosypal y col., 2007; Rosypal y col., 2010). En estos animales la transmisión no se da por contacto casual, sino que como en todo carnívoro, se pueden contaminar al comer otros animales reservorios infectados, de esta manera se amplifican los hospedadores y se aumenta la posibilidad de infección de los vectores que se alimentan de ellos.

En México, el primer caso de perros infectados por *T. cruzi* fue descrito por Luis Mazzotti en 1940 en el estado de Oaxaca, y desde entonces, muchos más casos han sido diagnosticados en otros estados del país, como Puebla, Distrito Federal de México y Yucatán (Zavala-Velázquez y col., 1996; Salazar-Schettino y col., 1997; Estrada-Franco y col., 2006). Un estudio más reciente, realizado en muestras de la zona sur de la ciudad de Mérida (estado de Yucatán), ha demostrado una seroprevalencia del 34% de los perros evaluados y el 8% de los dueños resultó positivos para Chagas (Jiménez-Coello y col., 2010). Esto indica una estrecha relación entre la infección de perros con el diagnóstico positivo de la enfermedad en los seres humanos que viven con estos animales. Además, los perros que pasan la mayor parte del tiempo fuera están más expuestos al contagio que los que viven en el hogar prácticamente todo el día (Jiménez-Coello y col., 2010). Estos resultados implican una buena adaptación del vector en las zonas urbanas de la península, que constituyen un gran riesgo de contagio tanto para los perros, así como para otros animales domésticos y/o peridomésticos, y en especial para los seres humanos. En la península de Yucatán la prevalencia para *T. cruzi* en perros oscila entre el 14,60 y 21,40% (Cardinal y col., 2007). Por estas razones, presentamos este estudio sobre una muestra suficientemente grande como para estimar la seroprevalencia de la enfermedad en la población canina de la Península de Yucatán.

La presencia de *T. cruzi* en gatos domésticos se registró por primera vez en 1978 en una comunidad rural en el noreste de Brasil (Mott y col., 1978) y, posteriormente en 1993, en el noroeste de Argentina (Mizbani y

col., 2009). Desde entonces, en América casos de tripanosomiasis en gatos se han observado sólo en Honduras (prevalencia del 16%) y en la región argentina de Chaco (prevalencia de 6,55%) (Mohapatra y col., 2010). En México nunca se han reportado casos de gatos infectados por *T. cruzi*.

### **3.2. Importancia del diagnóstico de la leishmaniasis**

El diagnóstico de la leishmaniasis es difícil debido a la amplia variedad de manifestaciones clínicas que la enfermedad puede presentar. Los métodos diagnósticos más extendidos combinan las técnicas de observación directa del parásito con las inmunológicas (ELISA, inmunofluorescencia indirecta, Western blot) o moleculares (PCR) (Reithinger y Dujardin, 2007).

El **diagnóstico parasitológico** es el método más tradicional, se basa en la detección de amastigotas en frotis teñidos de aspirados de la médula espinal, bazo, hígado y nódulos linfáticos; o de lesiones mucosas o dérmicas en las leishmaniasis cutáneas o muco-cutáneas. Sus limitaciones es que son métodos invasivos y poco exitosos para detectar parásitos en caninos asintomáticos. Estos métodos son muy específicos pero poco sensibles, por lo que se suelen complementar con el examen físico y otras técnicas diagnósticas (Mettler y col., 2005). También se puede inocular la muestra en un medio de cultivo apropiado e incubar hasta que los parásitos se multipliquen.



Los **métodos moleculares** se basan en el uso de la PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa), PCR anidada y PCR a tiempo real. En perros presenta un series de inconvenientes, como el de la elección del tejido que ofrezca más información para ser muestreado, las dificultades que se presentan en la preparación del DNA y la alta frecuencia de inhibidores de la PCR presentes en la sangre canina (Lachaud y col., 2001).

Muchos tejidos han sido estudiados: nódulos linfáticos, aspirados de médula ósea, sangre completa, biopsias de piel, piel congelada y la conjuntiva del ojo. De estos, los que han mostrado la mayor sensibilidad y especificidad para el diagnóstico de la leishmaniasis canina son la médula ósea, nódulos linfáticos y muestras de piel; sin embargo, se recomienda el uso de sangre periférica porque su obtención es poco invasiva, produciendo menos estrés en los animales (Romero-Peñuela y Sánchez-Valencia, 2007).

La PCR para la identificación de DNA de *Leishmania spp.* en muestras de tejidos de perros se ha desarrollado usando primers para amplificar la secuencia del gen de la subunidad pequeña rRNA de *Leishmania* y la región constante del DNA del kinetoplasto, siendo esta última, la más sensible para la detección de *Leishmania* en caninos asintomáticos (Solano-Gallego y col., 2001).

Algunos autores recomiendan la detección de ARN en lugar de ADN mediante RT-PCR (PCR de la transcriptasa inversa) (Reithinger y Dujardin, 2007). Se han llevado a cabo varios estudios con el fin de comparar distintas técnicas de diagnóstico existentes, confirmando que la

técnica más sensible y específica es la PCR (Piarroux y col., 1994; Ikononopoulos y col., 2003; Saridomichelakis y col., 2005). Sin embargo, Moreira y col. observaron una excepción en los casos asintomáticos, donde la inmunocitoquímica mostró un 100% de especificidad frente al 95% de la PCR (Moreira y col., 2007). Asimismo se ha hallado una ausencia de correlación en casos asintomáticos entre los resultados inmunológicos y los moleculares (Iniasta y col., 2002).

Los **métodos inmunológicos** son esenciales para detectar portadores asintomáticos y monitorear el esquema de control, debido a la variabilidad que presenta el espectro clínico y la poca sensibilidad de las pruebas directas (Fernández-Pérez y col., 1999). Los métodos serológicos demuestran la presencia de parásitos a través de la detección de los anticuerpos circulantes en el torrente sanguíneo. Por ello, son fundamentales en el diagnóstico de los casos de infecciones tempranas y en evaluaciones epidemiológicas dirigidas a controlar individuos infectados en áreas endémicas, así como para establecer la seroprevalencia, debido al largo periodo de incubación y a las características de cronicidad de la enfermedad (Iniasta y col., 2002). Este grupo incluye las pruebas de Inmunofluorescencia indirecta (IFI), Inmunoensayo ligado a enzimas (ELISA) y Western Blot (WB), entre otras.

El IFI comenzó a usarse en los 60 para diagnosticar la leishmaniasis visceral y desde entonces ha sido reconocida universalmente como la “prueba de oro” y la técnica recomendada por el Manual de Pruebas Diagnósticas para Epizootias de la Oficina Internacional de Sanidad Animal OIE. Presenta buenos valores de sensibilidad (entre el 90 y el

100%) y de especificidad (hasta el 80%). Sin embargo, en Colombia se hicieron estudios con la cepa MHOM/CO/CL044B de *L. infantum* usando antígeno total, se usaron perros infectados artificialmente y se comprobó que los valores de sensibilidad y especificidad eran más bajos, 69.7% y 67.5% respectivamente (Vargas, 2005).

Las ventajas del IFI son su facilidad de ejecución, rapidez en la emisión de los resultados y el bajo coste. Sin embargo, los inconvenientes que presenta se relacionan con su precisión. Teniendo en cuenta los valores de sensibilidad y especificidad del IFI, los autores afirman que existe una elevada confianza en un resultado negativo (el valor predictivo negativo es alto), pero por otro lado, no se puede afirmar con la misma contundencia cuando sale un resultado positivo porque, debido a su baja especificidad, el valor predictivo positivo es bajo, por lo que la técnica presenta un alto número de falsos positivos (Alves y Bevilacqua, 2004).

Tampoco hay un consenso sobre las diluciones a las que un suero se puede considerar positivo usando la técnica de IFI. Los títulos varían de 1:20 a 1:160, por lo que la zona cercana al punto de corte es demasiado amplia, por lo que cuando los sueros se acercan a estas diluciones es difícil su clasificación como positivos o negativos. En estos casos se recurre a confirmar el resultado con otra técnica alternativa (Guhl y Nicholls, 2001). Otras de las desventajas descritas para esta técnica, son: que no tiene ningún valor la titulación obtenida sobre la progresión de la enfermedad (De Paula y col., 2003).

El DAT es una técnica rápida y barata que consiste en poner en contacto antígeno total del parásito con el suero del paciente sospechoso de leishmaniasis. Si el suero tiene anticuerpos contra el parásito se produce la aglutinación de complejos antígenoanticuerpo y su precipitación. Esta técnica también utiliza distintas diluciones del suero para titular la muestra problema (El Harith y col., 1989). La técnica del DAT se ha perfeccionado dando lugar al FAST (prueba rápida basada en la aglutinación) que utiliza una única dilución del suero problema. De este modo se logra la realización de la prueba sobre una amplia cantidad de sueros problema con rapidez y sin necesidad de un gran equipo técnico (Cardoso y col., 2004).

La técnica ELISA se empezó a usar en el diagnóstico de la leishmaniasis en los 70 y presenta valores de sensibilidad que oscilan entre el 85% y el 96%, y de especificidad del 86% al 98%. Sin embargo, la utilización de antígenos purificados específicos de *Leishmania spp.* están contribuyendo a mejorar estos resultados (Braz y col., 2002).

Se observan grandes variaciones en la especificidad y sensibilidad de las diferentes pruebas de ELISA que se deben a modificaciones introducidas en la preparación de los antígenos completos, así como al empleo de antígenos purificados y/o recombinantes; así pues, las diferencias entre las preparaciones de antígenos crudos elaboradas con promastigotas completas y sus extractos solubles limitan la estandarización de las pruebas y la reproducibilidad de los resultados (Do Rosario y col., 2005).

La técnica ELISA usando antígeno crudo, ha demostrado en trabajos recientes valores de sensibilidad y especificidad bajos del 51,5% y 57,5%, respectivamente; por otra parte, identificó el 37,55% de animales evaluados como seropositivos cuando se procesaron sueros provenientes de zona no endémica para la leishmaniasis visceral; aspectos que favorecen la aparición de animales tanto falsos negativos, como falsos positivos (Vargas, 2005).

Además, se han realizado muchos estudios de los antígenos para aumentar la especificidad de las pruebas serológicas en el diagnóstico de *Leishmania*. Entre estos antígenos se encuentran: K39 de *L. chagasi*, uno de membrana de 32 kDa (P32) a partir de *L. donovani*, dos hidrofílicos (K9 y K26) de *L. chagasi*, A2 y rk26 y rK39 de *L. infantum*. (Mizbani y col., 2009; Mohapatra y col., 2010).

Otro marcador molecular específico y altamente inmunogénico es la enzima hierro superóxido dismutasa excretada (Fe-SODe); las SODs son un grupo de metaloenzimas antioxidantes con un papel importante en la defensa del radical superóxido que protege las células infectadas (Paramchuk y col., 1997). Esta enzima protege al parásito y su actividad se ha detectado en las principales especies de *Leishmania*. La Fe-SODe es una de las enzimas más prometedoras para aumentar la inmunogenicidad y especificidad de las pruebas serológicas, que ofrece buenos resultados para el diagnóstico de la leishmaniasis visceral, cutánea y mucocutánea en humanos (Marín y col., 2009) y en perros (Marín y col., 2007). Se ha demostrado que el uso de la Fe-SOD como antígeno tanto en la técnica de ELISA como en ensayos de Western blot (WB) proporcionan resultados

satisfactorios para el diagnóstico de diferentes especies de *Leishmania*. La prueba de ELISA-SOD es muy sensible (98,6%), pero con un nivel bajo de especificidad (44,8%) (Marín y col., 2009); sin embargo, el WB es muy sensible (90,4%) y muy específica (100%) para el diagnóstico de las especies de *Leishmania* (Martins Gonçalves y col., 2002).

El Dot-ELISA basada en la combinación del ELISA y el dot-blot ha resultado ser muy sensible aunque no se considera adecuado para seguir el desarrollo clínico de la enfermedad (Vercammen y col., 1998).

El Western-blot (WB) ha sido propuesto para el estudio de la leishmaniasis en trabajos experimentales y de campo, ya que las fracciones antigénicas obtenidas en esta prueba permitirían detectar animales infectados y discriminar las fases iniciales de la infección. Con esta técnica se han realizado numerosos estudios en animales infectados experimentalmente pero hay muy pocos estudios de campo en zonas endémicas, y todavía no existe consenso en cuanto al patrón de reconocimiento antigénico requerido para obtener valores altos de sensibilidad y especificidad (De Paula y col., 2003).

En cuanto a las desventajas, es una técnica que requiere de experiencia para su desarrollo y que se limita a investigaciones de laboratorio, es difícil de aplicar como rutina en la clínica (Ferroglia y col., 2007).

Los patrones de reconocimiento antigénico obtenidos por Western blot relacionados con antígenos de bajo peso molecular han resultado muy

sensibles para el diagnóstico de los casos asintomáticos, incluso antes que cuando usamos las pruebas de IFI y ELISA. Posiblemente estas mismas bandas, permitirían evaluar la evolución del tratamiento de la enfermedad, porque desaparecen cuando el tratamiento es efectivo o cuando se presenta mejora del estado clínico del perro (Riera y col., 1999).

Se han llevado a cabo varios estudios con el fin de comparar las distintas técnicas de diagnóstico existentes, confirmando que la técnica más sensible y específica es la PCR (Ikonomopoulos y col., 2003; Saridomichelakis y col., 2005). Sin embargo, Moreira y col. observaron una excepción en los casos asintomáticos, donde la inmunocitoquímica mostró un 100% de especificidad frente al 95% de la PCR (Moreira y col., 2007). Asimismo se ha hallado una ausencia de correlación en casos asintomáticos entre los resultados inmunológicos y los moleculares (Iniasta y col., 2002).

### **3.3. Importancia del diagnóstico de la enfermedad de Chagas**

El diagnóstico de la enfermedad de Chagas depende de la fase en la que se encuentre el individuo. En la fase aguda o de reactivación, cuando la parasitemia es alta, el diagnóstico se realiza mediante la visualización directa del parásito en líquidos corporales. Otras técnicas empleadas para la observación directa del parásito son el frotis sanguíneo/gota gruesa y el xenodiagnóstico. Estos métodos presentan respectivamente una sensibilidad del 60-70% (Luquetti, 2007). Estas técnicas, aunque sean las más empleadas por sus bajos costes no presentan una sensibilidad alta por

lo que se están buscando otras nuevas que mantengan las características de ser baratas y rápidas (Barbabosa y col., 1983; Luz y col., 1994). Otro de los problemas que presentan estas técnicas es su dificultad a la hora de diferenciar morfológicamente a *T. cruzi* de otras especies no patógenas como *T. rangeli* y que solo se pueden observar las formas sanguíneas cuando la parasitemia es alta.

En la detección de la enfermedad de Chagas se puede emplear la técnica de la PCR, sin embargo, además de presentar un coste muy elevado y no estar disponible en la mayoría de los laboratorios de las áreas endémicas, presenta una sensibilidad muy variable (45%-96.5%) y puede amplificar productos inespecíficos dando resultados falsos positivos (Luquetti, 2007; Wincker y col., 1994; Portela-Lindoso and Shikanai-Yasuda, 2003).

Por todo lo mencionado anteriormente, las pruebas serológicas podrían representar el diagnóstico eficaz por su sensibilidad y coste relativamente bajo. Se dividen en dos grupos: las llamadas pruebas convencionales, las cuales usan extracto total del parásito como antígeno, o extracto solubles de un complejo de antígenos y las no convencionales que suelen usar antígenos recombinantes o péptidos sintéticos (WHO, 2002). El diagnóstico serológico permite obtener diferentes resultados según el tipo de antígeno usado, la fase de la enfermedad y la clase de Ig (IgG ó IgM). La elección del antígeno es importante para obtener un buen resultado (Caballero y col., 2007).



Es importante recordar que en estudios epidemiológicos se deben preferir las pruebas con alta sensibilidad, para disminuir la tasa de falsos negativos. Una alta sensibilidad evitaría que los animales positivos permanezcan como fuentes de infección para los vectores; mientras que la especificidad se requiere para la confirmación clínica de los perros sospechosos. La elección del antígeno que usemos para la ELISA es importante para obtener un buen resultado. El uso de epimastigotas como antígeno, tiene buena sensibilidad pero la especificidad es menor en la fase aguda (Caballero y col., 2007).

Muchos estudios se centran en definir un antígeno específico de *T. cruzi* que aumentará la especificidad del diagnóstico serológico, tales como: una lectina purificada GP90, una cisteína proteinasa (GP57/51), la proteína Tc-40, una grp78 proteína de choque térmico producido por el parásito durante la infección, junto con algunas moléculas recombinantes, como un transialidasa de fase aguda (Marín y Sánchez Moreno, 2010). Así se han comercializado test rápidos como el SERODIA Chagas con partículas de gelatina ligadas a antígenos de *T. cruzi*.

En estos momentos las investigaciones se centran en la búsqueda de antígenos excretados por el parásito, ya que éstos se relacionan con los mecanismos de diseminación del agente etiológico y la resistencia a la respuesta inmunológica del hospedador. Además son moléculas detectables en los fluidos corporales, como la sangre, incluso cuando la parasitemia es baja. De esta manera permitiría el diagnóstico tanto en la fase aguda como en la crónica, además de permitir el seguimiento del tratamiento de los pacientes chagásicos (Marín y Sánchez-Moreno, 2010).

Quizá el antígeno más adecuado sea la Fe-SODe. Estas enzimas se consideran factores de virulencia que protegen al parásito del ataque de la célula hospedadora, su actividad ha sido detectada en las principales especies de tripanosomátidos (Ismail y col., 1997). En particular la SOD excretada tiene características bioquímicas comunes en los tripanosomátidos estudiados, tales como un punto isoeléctrico entre 3.75 y 4 y una masa molecular entre 20 y 25 kDa (Marín y Sánchez-Moreno, 2010).

Villagrán y colaboradores en 2005, empleando la Fe-SODe por *T. cruzi* en un estudio serológico de pacientes procedentes del estado de Querétaro (México), demostraron que la prevalencia encontrada por las dos técnicas, ELISA y Western blot, tenían una concordancia del 100%.

Posteriormente, se ha demostrado que la Fe-SODe por *T. cruzi* es altamente inmunogénica y específica, proponiéndola como una fracción antigénica útil en el diagnóstico de la enfermedad de Chagas (Marín y Sánchez-Moreno, 2010).



## **4.OBJETIVOS**



Debido a la alta incidencia de la leishmaniasis y enfermedad de Chagas en una gran extensión de zonas endémicas y teniendo en cuenta el riesgo que representa, tanto para los seres humanos como para otras especies de mamíferos que actúan como reservorios naturales de estos parásitos, es de suma importancia atender con medidas de prevención a las poblaciones que se encuentran con más alto riesgo de sufrir la enfermedad. Para ello, es necesario desarrollar métodos de diagnóstico eficaces que tengan la sensibilidad y la especificidad adecuadas para hacer un diagnóstico fiable a tiempo, para establecer un tratamiento que permita la curación del paciente y evite la transmisión de la enfermedad. Por ello, se plantea el uso de la Fe-SODe (Hierro Superóxido Dismutasa excretada), como un antígeno altamente efectivo para el diagnóstico de infecciones por *Leishmania* spp. y *Trypanosoma cruzi*.

Las características de alta inmunogenicidad y especificidad de la Fe-SODe apuntan a esta proteína como un marcador ideal que podría consolidarse como un componente fundamental en pruebas de diagnóstico serológico, con la correspondiente importancia que esto conlleva también a nivel epidemiológico para el estudio de la leishmaniasis y la enfermedad de Chagas.

Por todo lo expuesto, los principales objetivos del presente trabajo son:

- Determinar la sensibilidad y especificidad de la técnica de ELISA y Western blot, usando como fracción antigénica la Fe-SODe, para especies de *Leishmania* y *T. cruzi*.

## OBJETIVOS

- Evaluar, mediante dichas técnicas, la prevalencia de *L. mexicana*, *L. infantum* (*syn. Chagasi*), *L. braziliensis* y *T. cruzi* en diferentes poblaciones de animales domésticos: perros y gatos de la Península de Yucatán (México).
- Estudiar la seroprevalencia de *T. cruzi* en sueros humanos de Santiago de Querétaro (México).

## **5. PUBLICACIONES**





**5.1. An iron-superoxide dismutase antigen-based serological screening of dogs indicates their potencial role in the transmission of cutaneous leishmaniasis and trypanosomiasis in Yucatan, Mexico** (Vector-Borne and Zoonotic Diseases, 2011; 11(7): 815-21)

## PUBLICACIONES

VECTOR-BORNE AND ZOONOTIC DISEASES  
 Volume 11, Number 7, 2011  
 © Mary Ann Liebert, Inc.  
 DOI: 10.1089/vbz.2010.0125

## An Iron-Superoxide Dismutase Antigen-Based Serological Screening of Dogs Indicates Their Potential Role in the Transmission of Cutaneous Leishmaniasis and Trypanosomiasis in Yucatan, Mexico

Silvia S. Longoni,<sup>1</sup> Clotilde Marín,<sup>1</sup> Carlos H. Sauri-Arceo,<sup>2</sup> Angeles López-Caspedes,<sup>1</sup>  
 Roger I. Rodríguez-Vivas,<sup>2</sup> Noelia Villegas,<sup>1</sup> Javier Escobedo-Ortegón,<sup>3</sup> Mario A. Barrera-Pérez,<sup>1</sup>  
 Manuel E. Bolio-González,<sup>2</sup> and Manuel Sánchez-Moreno<sup>1</sup>

### Abstract

An increasing number of studies have reported high infection rates for American cutaneous leishmaniasis in dogs, which have thus been proposed as the reservoir host. Canine leishmaniasis is widespread in different states in Mexico, where a number of *Leishmania* species have been isolated from dogs. In the present study, the detection of different *Leishmania* species is described in stray dogs from two localities, namely Tulum and Celestún on the Yucatan Peninsula (Mexico). The use of iron-superoxide dismutase excreted by the parasites as the antigen fraction and enzyme-linked immunosorbent assay and western blot tests allowed us to confirm the presence of at least three species of *Leishmania* (*Le. mexicana*, *Le. braziliensis*, and *Le. panamensis*), some of which are reported for the first time in this species. In addition to a high prevalence of *Le. mexicana* and *Le. braziliensis*, and to a lesser degree, *Le. panamensis*, there is a significant prevalence of *Trypanosoma cruzi*, suggesting that the dog may be a source of transmission of trypanosomiasis. However, a more thorough epidemiological study on the dog population, both wild as well as urban, of the Yucatan Peninsula will be required to design a control strategy for these diseases, paying particular attention to the population affected and even broadening the study to other Mexican states as well as neighboring countries. These results again confirm that iron-superoxide dismutase excreted by the different trypanosomatid species constitutes a good source of antigen for serodiagnosis in epidemiological studies.

**Key Words:** Cutaneous leishmaniasis—Dog—ELISA—*Le. braziliensis*—*Le. mexicana*—*Le. panamensis*—Western blot.

### Introduction

THE TERM LEISHMANIASIS COVERS a group of diseases transmitted by the sand fly and caused by kinetoplastids belonging to the genus *Leishmania*. These parasitoses are widely distributed all over the world except Antarctica ([www.who.int/Leishmaniasis/Leishmaniasis\\_maps/en/index.html](http://www.who.int/Leishmaniasis/Leishmaniasis_maps/en/index.html)). In recent years, leishmaniasis has begun to be considered a group of emerging diseases as a result of

climate change, population migration, the resistance of mosquitoes to insecticides, and the difficulty of eliminating the infection in reservoir animals (Ameen 2010).

Leishmaniasis is endemic in 88 countries, and according to WHO estimates, 12 million people are currently infected, 350 million are at risk, and some 2 million new cases are reported each year. Thus, the disease constitutes a serious public health problem because of its significant economic, social, and psychological costs. However, these figures are likely to be an

<sup>1</sup>Departamento de Parasitología, Facultad de Ciencias, Universidad de Granada, Granada, Spain.

<sup>2</sup>Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma de Yucatán, Mérida, Yucatán, México.

<sup>3</sup>Laboratorio de Parasitología, Centro de Investigaciones Regionales Dr. Hileayo Noguchi, Universidad Autónoma de Yucatán, Mérida, Yucatán, México.

Vector-Born 2

Vector-Born 3

Vector-Born 4

Vector-Born 5



Vector-Born 6

Vector-Born 7

## PUBLICACIONES

**5. 2. Prevalence of antibodies against three species of *Leishmania* (*L. mexicana*, *L. braziliensis*, *L. infantum*) and possible associated factors in dogs from Mérida, Yucatán, México.**

(Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 2012; 106(4):252-8)

## PUBLICACIONES

Provided for non-commercial research and education use.  
Not for reproduction, distribution or commercial use.



This article appeared in a journal published by Elsevier. The attached copy is furnished to the author for internal non-commercial research and education use, including for instruction at the authors institution and sharing with colleagues.

Other uses, including reproduction and distribution, or selling or licensing copies, or posting to personal, institutional or third party websites are prohibited.

In most cases authors are permitted to post their version of the article (e.g. in Word or Tex form) to their personal website or institutional repository. Authors requiring further information regarding Elsevier's archiving and manuscript policies are encouraged to visit:

<http://www.elsevier.com/copyright>

Royal Tropical Society of Medicine and Hygiene 2

Royal Tropical Society of Medicine and Hygiene 3



Royal Tropical Society of Medicine and Hygiene 4

Royal Tropical Society of Medicine and Hygiene 5

Royal Tropical Society of Medicine and Hygiene 6

Royal Tropical Society of Medicine and Hygiene 7

Royal Tropical Society of Medicine and Hygiene 8

**5.3. *Leishmania* spp. Epidemiology of Canine Leishmaniasis  
en the Yucatan Peninsula** (The Scientific World Journal, 2012;  
1-10. doi: 10.1100/2012/945871)

## PUBLICACIONES

## Research Article

# ***Leishmania* spp. Epidemiology of Canine Leishmaniasis in the Yucatan Peninsula**

**A. López-Céspedes,<sup>1</sup> S. S. Longoni,<sup>1</sup> C. H. Sauri-Arceo,<sup>2</sup> M. Sánchez-Moreno,<sup>1</sup>  
 R. I. Rodríguez-Vivas,<sup>3</sup> F. J. Escobedo-Ortegón,<sup>3</sup> M. A. Barrera-Pérez,<sup>3</sup> M. E.  
 Bollo-González,<sup>2</sup> and C. Marín<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Departamento de Parasitología, Facultad de Ciencias, Universidad de Granada, Severo Ochoa s/n, 18071-Granada, Spain

<sup>2</sup> Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Campus de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Universidad Autónoma de Yucatán, Km 15.5 Carretera Mérida-Xmucuil, 4-116 Itzimná, Mérida, Yucatan, Mexico

<sup>3</sup> Laboratorio de Zoonosis y VBD's, C.L.R. Dr. Hideo Noguchi, Universidad Autónoma de Yucatán, Avenida Itzaes No. 490 x 59, 97000 Mérida, Yucatan, Mexico

Correspondence should be addressed to C. Marín, cmarin@ugr.es

Received 4 April 2012; Accepted 27 April 2012

Academic Editors: J. P. Akse, S. Angel, S. A. Babayan, M. Brunanska, and K. Y. Marmcuoglu

Copyright © 2012 A. López-Céspedes et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Canine Leishmaniasis is widespread in various Mexican states, where different species of *Leishmania* have been isolated from dogs. In the present study, we describe the detection of *L. braziliensis*, *L. infantum*, and *L. mexicana* in serum of dogs from the states of Yucatan and Quintana Roo in the Yucatan Peninsula (Mexico). A total of 412 sera were analyzed by ELISA using the total extract of the parasite and the iron superoxide dismutase excreted by different trypanosomatids as antigens. We found the prevalence of *L. braziliensis* to be 7.52%, *L. infantum* to be 6.07%, and *L. mexicana* to be 20.63%, in the dog population studied. The results obtained with ELISA using iron superoxide dismutase as the antigen were confirmed by western blot analysis with its greater sensitivity, and the agreement between the two techniques was very high.

## 1. Introduction

Leishmaniasis is caused by a protozoan parasite called *Leishmania*, of which 21 species have been identified as pathogenic to humans. In most cases, it causes disease in animals and humans that become infected by accidentally entering endemic areas. It is a cosmopolitan disease of the most complex and diverse type, with significant overlap between different *Leishmania* species and their vectors, determining a complex ecology and epidemiology. It has three clinical forms: cutaneous, mucocutaneous, and visceral [1], with the visceral form being the most severe.

The disease is one of the less understood diseases of the world, affecting mainly developing countries. It is believed that about 350 million people are at risk of contracting the disease and more than 2 million new infections are recorded each year. Control programs of Leishmaniasis remain weak,

showing a worrying increase in both mortality and morbidity in the world [2].

Dogs infected with this protozoan are the main reservoir of the disease and play a key role in its transmission to humans. Growing awareness that the control in humans depends on effective control of canine leishmaniasis has been promoted in recent years. Research on *Leishmania* infection in dogs has been conducted with hope of not only reducing the burden of disease in dogs, but also reducing the incidence of human leishmaniasis [3].

Canine Leishmaniasis is widespread in South America and is among the more important canine vector-borne diseases that occur in the region, mainly because of its great zoonotic relevance. Thus, many species of *Leishmania* have been isolated and molecularly characterized in dogs in South America, including *L. amazonensis*, *L. braziliensis*, *L. colombienseis*, *L. infantum* (syn. *L. chagasi*), *L. mexicana*,



The Scientific World Journal LEISHMANIA 2

The Scientific World Journal LEISHMANIA 3

The Scientific World Journal LEISHMANIA 4

The Scientific World Journal LEISHMANIA 5

The Scientific World Journal LEISHMANIA 6

The Scientific World Journal LEISHMANIA 7

The Scientific World Journal LEISHMANIA 8

The Scientific World Journal LEISHMANIA 9



The Scientific World Journal LEISHMANIA 10

**5.4. Seroprevalence of antibodies against the Excreted Antigen Superoxide Dismutase by *Trypanosoma cruzi* in dogs from Yucatan Peninsula (Mexico) (Zoonoses and Public Health, 2012; 1-7. doi: 10.1111/j.1863-2378.2012.01520.x)**



## ORIGINAL ARTICLE

## Seroprevalence of Antibodies Against the Excreted Antigen Superoxide Dismutase by *Trypanosoma Cruzi* in Dogs From the Yucatan Peninsula (Mexico)

A. López-Céspedes<sup>1</sup>, S. S. Longoni<sup>1</sup>, C. H. Sauri-Arceo<sup>2</sup>, R. I. Rodríguez-Vivas<sup>2</sup>, N. Villegas<sup>1</sup>, J. Escobedo-Ortegón<sup>3</sup>, M. A. Barrera-Pérez<sup>3</sup>, M. Sánchez-Moreno<sup>1</sup>, M. E. Bolio González<sup>2</sup> and C. Marín<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Parasitología, Facultad de Ciencias, Universidad de Granada, Granada, Spain

<sup>2</sup> Campus de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Universidad Autónoma de Yucatán, Mérida, Yucatán, México

<sup>3</sup> Laboratorio de Parasitología, Centro de Investigaciones Regionales Dr. Hideyo Noguchi, Universidad Autónoma de Yucatán, Mérida, Yucatán, México

### Impacts

- Domestic and peridomestic animals, and particularly dogs, are considered the main reservoirs of Chagas disease.
- Information on the prevalence and geographical distribution of American trypanosomiasis in the dog population of seven localities in the Yucatan Peninsula (the city of Mérida and towns of Molas, Playa del Carmen, Akumal, Xcalcoop, Xcalac and Xahuachol) constitute key data for developing control measures for this illness.
- The immunological techniques are evaluated as an indispensable tool for diagnosing infectious diseases, confirming the high sensitivity and specificity of Fe-SODe-CRU, used for a general screening of this disease in endemic areas.

### Keywords:

American Trypanosomiasis; dog; seroprevalencia; ELISA; western blot; *Trypanosoma cruzi*

### Correspondence:

C. Marín, Departamento de Parasitología, Facultad de Ciencias, Universidad de Granada, Severo Ochoa s/n 18001-Granada (España). Tel.: +34 958 248886; Fax: +34 958 243174; E-mail: cmarin@ugr.es

Received for publication September 16, 2011

doi: 10.1111/j.1863-2378.2012.01520.x

### Summary

Numerous studies have shown the role of dogs as a reservoir for the American trypanosomiasis, as the bridge connecting sylvatic and peridomestic cycles. The objective of this study was to determine the prevalence of American trypanosomiasis in the dog population (630 sera) from seven localities in the Yucatan Peninsula (city of Mérida and the towns of Molas, Playa del Carmen, Akumal, Xcalcoop, Xcalac and Xahuachol). These data are key for developing control measures for the disease. The sera were analysed to detect antibodies against *Trypanosoma cruzi*, using Fe-SOD excreted as the antigenic fraction by ELISA and Western blot as confirmation. The total prevalence found in the Yucatan Peninsula was some 14.76%, with 10.74% in the state of Yucatan (city of Mérida, towns of Molas and Xcalcoop) and 21.34% in the state of Quintana Roo (towns of Playa del Carmen, Akumal, Xcalac and Xahuachol). However, a more thorough epidemiological study of the dog population, both wild and urban, in the Yucatan Peninsula will be required to design a control strategy for these diseases, paying particular attention to the population affected and even broadening the study to other Mexican states as well as neighbouring countries. These results again confirm that iron-superoxide dismutase excreted by *T. cruzi* constitutes a good source of antigen for serodiagnosis in epidemiological studies.

Zoonoses and Public Health 2

Zoonoses and Public Health 3

Zoonoses and Public Health 4

Zoonoses and Public Health 5



Zoonoses and Public Health 6

Zoonoses and Public Health 7

## PUBLICACIONES

**5.5. Detection of different *Leishmania* spp. and *Trypanosoma cruzi* antibodies in cats from Yucatan Peninsula (Mexico) using an iron superoxide dismutase excreted as antigen (Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases, 2012; 35(5):469-76.**

## PUBLICACIONES



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Comparative Immunology, Microbiology  
and Infectious Diseasesjournal homepage: [www.elsevier.com/locate/cimid](http://www.elsevier.com/locate/cimid)

## Detection of different *Leishmania* spp. and *Trypanosoma cruzi* antibodies in cats from the Yucatan Peninsula (Mexico) using an iron superoxide dismutase excreted as antigen

Silvia S. Longoni<sup>a</sup>, Angeles López-Céspedes<sup>a</sup>, Manuel Sánchez-Moreno<sup>a</sup>, Manuel E. Bolio-Gonzalez<sup>b</sup>, Carlos H. Sauri-Arceo<sup>b</sup>, Roger I. Rodríguez-Vivas<sup>b</sup>, Clotilde Marín<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Parasitología, Facultad de Ciencias, Universidad de Granada, Severo Ochoa s/n, 18071 Granada, Spain

<sup>b</sup> Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma de Yucatán, Km 15.5 Carretera Mérida-Kinrossil, AP 716 Mérida, Yucatán, Mexico

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 22 November 2011  
Received in revised form 4 April 2012  
Accepted 5 April 2012

## Keywords:

Cats  
*Leishmania*  
*Leishmania mexicana*  
*Leishmania braziliensis*  
*Leishmania infantum*  
*Trypanosoma cruzi*  
Mexico  
Yucatan Peninsula  
Superoxide dismutase excreted  
ELISA

## ABSTRACT

Although human leishmaniasis has been reported in 20 states in Mexico, no case of leishmaniasis has been reported in cats to date. In the Yucatan Peninsula, it has been found that dogs may act as reservoirs for at least three *Leishmania* species (*Leishmania mexicana*, *Leishmania braziliensis*, and *Leishmania panamensis*).

In this study we identified specific antibodies against these three *Leishmania* spp. and *Trypanosoma cruzi* in the sera from 95 cats from two States on the Yucatan Peninsula, namely Quintana Roo and Yucatan, by ELISA and Western blot techniques using whole extract and an iron superoxide dismutase excreted by the parasites as antigens.

As well as demonstrating the presence of trypanosomatid antibodies in the feline population on the Yucatan Peninsula, we were also able to confirm the high sensitivity and specificity of the iron superoxide dismutase antigen secreted by them, which may prove to be very useful in epidemiological studies.

© 2012 Elsevier Ltd. All rights reserved.

## 1. Introduction

Leishmaniasis, a disease induced by protozoa from the genus *Leishmania*, 21 species of which have been identified as human pathogens, is distributed over four continents. Indeed, cases of cutaneous, mucocutaneous and visceral leishmaniasis have been reported in 98 countries [1]. The World Health Organisation (WHO) has estimated that around 12 million people are infected worldwide and that a further 350 million are at risk of contracting this disease, with around two million new infections occurring every year. However, the majority of cases remain

unreported, mainly due to the fact that reporting is obligatory in only 33 countries. Leishmaniasis therefore remains one of the most overlooked diseases on the planet. The reservoirs of this disease include both wild and domestic mammals. According to the WHO, three types of animal host, namely primary, secondary and accidental, can be distinguished. The mammals known to act as primary reservoirs for *Leishmania* belong to different orders, including primates (humans), Carnivora (the domestic dog, *Canis familiaris*), Rodentia, Edentata and Marsupialia. Likewise, *Leishmania* infections have been reported in numerous other species from the above-mentioned orders as well as in others, which may, in some cases, act as secondary reservoirs or simply as accidental hosts without affecting the epidemiology of the disease to any great extent.

\* Corresponding author. Tel.: +34 958 242688; fax: +34 958 243174.  
E-mail address: [cmarin@pug.es](mailto:cmarin@pug.es) (C. Marín).

Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases 2

Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases 3



Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases 4

Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases 5

Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases 6

Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases 7

Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases 8

**5.6. *Trypanosoma cruzi*: Seroprevalence Detection in Sub-urban Population of Santiago de Querétaro (Mexico)** (The Scientific World Journal, 2012; 1-7. doi: 10.1100/2012/914129)



## Research Article

# ***Trypanosoma cruzi*: Seroprevalence Detection in Suburban Population of Santiago de Querétaro (Mexico)**

Ángeles López-Céspedes,<sup>1</sup> Elena Villagrán,<sup>2</sup> Kervin Briceño Álvarez,<sup>1</sup>  
 José Antonio de Diego,<sup>3</sup> Hebert Luis Hernández-Montiel,<sup>2</sup> Carlos Saldaña,<sup>2</sup>  
 Manuel Sánchez-Moreno,<sup>1</sup> and Clotilde Marín<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Parasitología, Facultad de Ciencias, Universidad de Granada, Severo Ochoa s/n, 18071 Granada, Spain

<sup>2</sup>Departamento de Investigación Biomédica, Facultad de Medicina, UAQ, 78050 Santiago de Querétaro, QRO, Mexico

<sup>3</sup>Unidad de Parasitología y Medicina Tropical, Departamento de Medicina Preventiva y Salud Pública, Facultad de Medicina, UAM, 28049 Madrid, Spain

Correspondence should be addressed to Clotilde Marín, cmaris@ugr.es

Received 8 November 2011; Accepted 13 December 2011

Academic Editor: Yoshihisa Hashiguchi

Copyright © 2012 Ángeles López-Céspedes et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

**Objectives.** To evaluate the potential of iron-oxide dismutase excreted (SODeCRU) by *T. cruzi* as the antigen fraction in the serodiagnosis of Chagas disease and compile new epidemiological data on the seroprevalence of this disease in the suburban population of the city of Santiago de Querétaro (Mexico). **Design and Methods.** 258 human sera were analyzed by the techniques of ELISA and Western blot and using the homogenate and the SODeCRU. **Results.** A total of 31 sera were positive against ELISA/SODeCRU (12.4%), while 30 sera proved positive by WB/SODeCRU (11.6%). The comparison between the technique of ELISA and WB showed a sensitivity of 93%, and a specificity of 99%. The positive predictive value was 93% and the negative predictive value was 99%, with a Kappa ( $\kappa$ ) value of 1. **Conclusions.** These preliminary data reveal the degree of infection of nonrural areas of Mexico and demonstrated that SODeCRU is an antigen useful to diagnose Chagas disease.

## 1. Introduction

Chagas disease, or American trypanosomiasis, is an infectious tropical disease caused by the blood flagellate *Trypanosoma cruzi*, which in its natural form is transmitted by Hemipteran vectors colloquially called "vinchucas" in Mexico and certain areas of South America. In addition, other forms of infection are known: blood transfusions, organ transplants, oral transmission, and congenital transmission. The first phase of the infection (acute phase) has clinical symptoms such as fever, discomfort, and cephalgia and thus can be confused with the flu. These symptoms remit spontaneously, when the parasite passes to the mononuclear phagocytic system, nervous system (autonomic and myoenteric plexus), and the myocardium. Thereafter, years or even decades may pass without clinical manifestations (indeterminate phase). This phase can be diagnosed only

by serological diagnosis. When the chronic phase appears (anatomical alterations, megaesophagus, megacolon, and especially cardiomyopathy), the disease has no cure and most patients die a sudden death without the causes being known [1].

The Pan American Health Organization estimates that there are currently 7.7 million people infected by *T. cruzi* in 21 endemic countries, with the appearance of 41,200 cases per year, and 14,400 children are born annually with congenital Chagas disease. The countries most affected are Bolivia (6.8% of the cases reported), Argentina (4.1%), El Salvador (3.4%), Honduras (3.1%), Paraguay (2.5%), Guatemala (2%), Ecuador (1.7%), French Guyana, Guyana, and Surinam (1.2%), Venezuela (1.2%), Nicaragua (1.1%), Brazil (1%), and Mexico (1.3%) [2].

The enormous progress made in the control of Chagas disease in the last few decades indicates clearly that the



The scientific world journal, trypanosoma cruzi 2

The scientific world journal, trypanosoma cruzi 3

The scientific world journal, trypanosoma cruzi 4

The scientific world journal, trypanosoma cruzi 5

The scientific world journal, trypanosoma cruzi 6

The scientific world journal, trypanosoma cruzi 7



## **6. DISCUSIÓN**





Actualmente el diagnóstico de la leishmaniasis y la enfermedad de Chagas está basado en la presencia de anticuerpos contra *Leishmania* spp. y *T. cruzi* en el suero de individuos infectados. Estos anticuerpos se han detectado principalmente empleando diferentes pruebas, las pruebas serológicas más utilizadas han sido ELISA, HAI, IFI y Western blot, conocidas como pruebas convencionales. A partir de diciembre del 2002, la OMS promueve la búsqueda y desarrollo de una prueba de alta sensibilidad y bajo coste, como ELISA. Diferentes grupos investigadores están trabajando para mejorar su calidad (sensibilidad y especificidad) en base a fracciones antigénicas exclusivas del parásito que en unos casos usan fracciones antigénicas del lisado parasitario y otros están evaluando el diseño en base a antígenos recombinantes o péptidos sintéticos, pero ambos tipos antigénicos han mostrado diferentes afinidades tanto por anticuerpos específicos como no específicos, por lo que, los niveles de sensibilidad son variables. Así, los antígenos excretados por los parásitos, como la hierro superóxido dismutasa, se han propuesto como prometedoras fracciones antigénicas por su alta sensibilidad y especificidad en tripanosomátidos como: *Phytomonas* (Marín y col., 2006), *Leishmania* spp. (Marín y col., 2009) y *T. cruzi* (Villagrán y col., 2005). Las superóxidos dismutasas (SODs) son un grupo de metaloenzimas antioxidantes con un importante rol en la defensa de los radicales superóxido que protegen las células de la infección (Paramchuk y col., 1997; Piacenza y col., 2007). Estas enzimas se consideran factores de virulencia que protegen al parásito del ataque de la célula hospedadora, su actividad ha sido detectada en las principales especies de tripanosomátidos (Ismail y col., 1997). En particular la Hierro Superóxido Dismutasa

excretada (Fe-SODe) tiene características bioquímicas comunes en los parásitos estudiados, tales como un punto isoeléctrico entre 3.75 y 4, y una masa molecular entre 20 y 25 kDa. (Marín y Sánchez-Moreno, 2010; Mateo y col., 2008; Marín y col., 2004). Estas características hacen de la Fe-SOD excretada un marcador altamente inmunogénico y específico por lo que podría consolidarse como una importante herramienta en el diagnóstico de la enfermedad de Chagas y la leishmaniasis (Marín y col., 2007; Marín y col., 2009; Marín y Sánchez-Moreno, 2010; Villagrán y col., 2005).

Para acometer el objetivo principal de la presente memoria de tesis doctoral se han ensayado 1683 sueros (258 sueros de humanos, 1330 sueros de perros y 95 sueros de gatos) mediante la técnica de ELISA usando como fracción antigénica la enzima hierro superóxido dismutasa excretada (ELISA-SODe) por 4 especies de *Leishmania* (*L. mexicana*, *L. braziliensis*, *L. panamensis* y *infantum*) y *T. cruzi*. La evaluación de la ELISA-SODe, como prueba diagnóstica, en comparación con la técnica de Western blot, demuestra que además de tener una alta sensibilidad la ELISA-SODe (93-100%), es altamente específica (97-100%) y no presenta reacción cruzada con especies de género *Trypanosoma*.

En 1993, se detectaron tres perros afectados de leishmaniasis que vivían con sus dueños, quienes también resultaron estar infectados, en el estado de Quintana Roo, México (Velasco Castrejón y col. 2009). México, más específicamente la Península de Yucatán, es una zona considerada endémica para la leishmaniasis, donde la susceptibilidad de los perros para *Leishmania spp.* se asemeja a la descrita en otros países de América Latina.

Sin embargo, parece que los perros estudiados en esta zona están expuestos a mayores riesgos de infección que sus homólogos en otros países estudiados (Velasco-Castrejón y col., 2009).

Cada vez la relación entre el hombre y el perro está siendo más cercana, tanto en zonas rurales como urbanas. Los perros pueden actuar como hospedadores y reservorios de numerosos agentes zoonóticos, por lo que constituyen una fuente de infección para los humanos (Otranto y col., 2009). El riesgo de infección humana aumenta cuanto mayor es la relación entre los perros y su entorno salvaje, como es el caso de los perros de caza, depredadores, etc... El riesgo de infección humana también aumenta con la presencia de vectores en las viviendas, que es cada vez más común debido a la adaptación exitosa de los artrópodos hematófagos (mosquitos, garrapatas, pulgas, chinches, moscas, etc..) al entorno doméstico (Marco y col., 2005). Numerosos estudios apoyan la posibilidad de que los perros son los reservorios más importantes para la leishmaniasis cutánea, mucocutánea y visceral en los seres humanos (Velasco-Castrejón y col., 2009; Dantas-Torres, 2007; Castro y col., 2007). Es por lo tanto necesario controlar y supervisar estos animales para evitar que se convierta en un problema para la salud humana.

Los perros callejeros son considerados como reservorios principales para la leishmaniasis y actúan como nexo entre el ciclo doméstico y el silvestre. Debido a esto procedimos al análisis de 70 perros callejeros procedentes de Tulum (Quintana Roo) y Celestún (Estado de Yucatán). Con este estudio se demuestra que por lo menos son tres las especies de *Leishmania* que están circulando en la ciudad de Tulum, zona hasta día de

hoy descrita por otros autores como área endémica para *L. mexicana* y sospechosa para *L. braziliensis* (Andrade y col. 2003, Velasco-Castrejón y col. 2009, Pech-May y col. 2010). Nuestros resultados usando la Fe-SODe en ELISA y Western blot proporcionan pruebas de que las infecciones por *L. braziliensis* y *L. mexicana* presentan una prevalencia muy alta en ambos lugares. Además, esta es la primera vez que se ha demostrado la infección por *L. panamensis* en estas regiones. Estos resultados no son, sin embargo, particularmente sorprendentes dada la presencia de *L. braziliensis* en países vecinos como Belice y Guatemala (Soto y col. 2004, Schnedl y col. 2007) y de *L. panamensis* en otros países, como Nicaragua y Honduras, los cuales, a pesar de estar un poco más lejanos, todavía están relativamente cerca (Zeledón y col. 1993). Este es el primer informe de perros infectados con *L. mexicana* en la región de Celestún, que hasta ahora no se había considerado endémica. Además, se ha demostrado que otras especies, como *L. braziliensis* y *L. panamensis*, están circulando en esta región. La prevalencia de *L. mexicana* en Tulum es muy similar a la encontrada en Celestún (20%), lo que indica que la endemicidad de las dos zonas es similar. Además, los vectores implicados en la transmisión del patógeno (*Lutzomyia cayanensis*, *Lu. chiapanensis*, *Lu. olmeca*, y *Lutzomyia* spp.) han sido reportados en ambas regiones (Ibáñez-Bernal, 1999). Se ha demostrado la presencia de diferentes anticuerpos en los sueros estudiados frente a las distintas especies de *Leishmania*. Sin embargo, este hallazgo no es debido a una reacción cruzada, ya que la prevalencia de anticuerpos frente a más de dos especies de *Leishmania* en el mismo suero es de 0 a 12,8% y la prevalencia frente a las tres especies de *Leishmania* y a *T. cruzi* es del 1,4%, si se tratase de reacción cruzada las prevalencias obtenidas deberían ser mucho más altas. La mayor sensibilidad del Western blot con

respecto a ELISA se ha demostrado utilizando Fe-SODe de los parásitos como la fracción antigénica, aunque ambas técnicas serológicas fueron concordantes, con un índice Kappa de 0,83. Este primer estudio sugiere que los perros callejeros y mascotas pueden actuar como reservorios de la leishmaniasis en esta región, mostrando una alta positividad de *L. mexicana* y *L. braziliensis* (41,4% y 32,8%, respectivamente), así como una positividad bastante significativa de *T. cruzi* (17,1%). El perro callejero, por lo tanto, puede ser considerado como una fuente de transmisión de la tripanosomiasis, lo que sugiere la necesidad de realizar un estudio epidemiológico más amplio de la población canina, tanto silvestres como urbana, en la península de Yucatán para diseñar un plan de control para estas enfermedades.

Dada la importancia del perro en la transmisión de la leishmaniasis ampliamos nuestro estudio con 218 sueros caninos precedentes de Mérida. Este estudio demostró que la prevalencia general de anticuerpos para cada especie de *Leishmania* fue: *L. mexicana* 30,2%, *L. braziliensis* 8,2%, y *L. infantum* (*syn. chagasi*) 11,9%. Estos valores son relativamente bajos comparados con los descritos en Brasil del 40,3% (Dantas-Torres y col., 2006). Sin embargo, en otros países de América Latina existen niveles de prevalencia similares, como en Paraguay (28,0%) y Colombia (17,2%) para *L. infantum* (*syn. chagasi*) (Canese y col., 1999; Fernández y col., 2002). La variabilidad en la detección serológica se muestra en otros estudios como el reporte de Rosypal y col. (2007), llevado a cabo en las ciudades de San Pablo (Brasil) y Bogotá (Colombia) que muestran unos niveles de seroprevalencia del 4,7% y el 1,6%, respectivamente, y que son claramente inferiores a los reportados en nuestro estudio para *L. infantum*

(*syn. chagasi*). Posiblemente, estas diferencias de serodetección pueden estar relacionadas a los diversos tipos de antígenos y ensayos de diagnóstico utilizados (ELISA e IFI).

Si analizamos los valores de prevalencia de nuestro estudio según la procedencia de los perros, encontramos que la prevalencia entre los perros del Centro de Control Canino y Felino (CCCF) a *L. mexicana* es de un 43,0%, mientras que, la prevalencia de los perros procedentes de Clínica Privada (Cl.P) es de un 25,0%. Esta diferencia puede ser justificada por el ambiente más doméstico de los perros que van a las clínicas, con la consiguiente disminución en la posibilidad de contagio con respecto a los perros del CCCF que viven en un ambiente más peridoméstico o selvático. Para *L. braziliensis* observamos que los perros procedentes de Cl.P presentan un 14,30 % de prevalencia frente al 6,60 % de los perros procedentes del CCCF, esto podría deberse a que *L. braziliensis* cursa como una enfermedad mucho más agresiva que *L. mexicana* y los dueños de los perros observan patologías, por lo que, llevan al animal al veterinario. Mientras que, la inmensa mayoría de los perros del CCCF no tienen un dueño y nadie se preocupa de su salud. Por otro lado, no es tan sorprendente la presencia de *L. braziliensis* en la Península del Yucatán, ya que, en países cercanos, tales como Belice o Guatemala, ha sido reportada (Soto y col., 2004; Schnedl y col., 2007). Tanto con la ELISA y el Western blot se confirma que el uso de la fracción antigénica Fe-SODE de los parásitos ha permitido la identificación de los casos positivos para las especies de *Leishmania* estudiadas. Así pues, se demostró la alta sensibilidad de la prueba ELISA-SODE (100%) y su capacidad para detectar verdaderos negativos. Además, para confirmar los verdaderos

positivos se utilizó Western blot y se obtuvo una especificidad del 97-99%.

En el siguiente estudio hemos analizado 412 sueros caninos de diferentes zonas tanto del estado de la Península de Yucatán (estados de Yucatán y Quintana Roo). En los perros aquí estudiados encontramos que la especie de *Leishmania* dominante en la Península de Yucatán es *L. mexicana*, con una prevalencia del 20,63% con ELISA-SODE. Estos datos son concordantes con los publicados por otros autores (Velasco-Castrejón y col., 2009; Marco y col., 2005). Si analizamos los valores de prevalencia en función del origen de los perros, encontramos que la prevalencia de *L. mexicana* en perros del estado de Quintana Roo es 16,32%, mientras que la prevalencia en perros del estado de Yucatán es 26,59%. En 2003, Andrade y colaboradores sospecharon de la presencia de *L. braziliensis* en la Península de Yucatán. En este estudio hemos detectado una prevalencia del 7,52% para *L. braziliensis*, correspondiendo un 11.56% al estado de Yucatán y un 4.60% al estado Quintana Roo. Aunque hasta hace pocos años se desconocía la presencia de la *L. braziliensis* en México, y más en concreto en la Península de Yucatán es muy fácil considerar la difusión de esta especie por el desplazamiento de vectores y/o reservorios desde los países fronterizos Belice y Guatemala donde la enfermedad ha sido reportada (WHO, 2010; Soto y col., 2004; Shnedl y col., 2007). Esto puede explicar la prevalencia encontrada para *L. braziliensis* (4.72%) detectado en Xcalak, un pueblo del estado de Quintana Roo cercano a Belice. La especie causante de la leishmaniasis visceral en el continente americano es *L. infantum* (*syn. chagasi*) y es conocida la existencia del vector (*Lu. longipalpis*) implicado en su transmisión en esta zona y el



papel del perro como reservorio de este parásito (Dantas Torres, 2007). En nuestro estudio, se obtuvo una prevalencia del 6,07% en la Península de Yucatán, resultando una gran variación en la prevalencia de *L. infantum* (*syn. chagasi*) dentro de los dos estados de muestreo. En el estado de Yucatán se encontró una prevalencia de sólo el 1,73%, mientras que en el estado de Quintana Roo se encontró una prevalencia de 9,21%. Hay que destacar la prevalencia de *L. infantum* (*syn. chagasi*) del 15,75% detectado en la ciudad de Xcalak (Quintana Roo). Esto podría ser debido a la proximidad entre la región de la ciudad de Xcalak con los países de Belice y Guatemala, en donde existe una alta prevalencia de *L. infantum* (*syn. chagasi*) (WHO, 2010). En este estudio, hemos encontrado que la prevalencia de anticuerpos frente a *L. mexicana* en los sueros caninos ensayados es mucho mayor que las que se encuentran frente a *L. braziliensis* y *L. infantum* (*syn. chagasi*). Se han detectado en más de un perro estudiado, anticuerpos específicos de diferentes especie de *Leishmania*, sin embargo, esto no es debido a una reacción cruzada, ya que la prevalencia de multi-anticuerpos es relativamente baja y muy diferentes entre ellas, por lo cual, como hemos dicho anteriormente, se pueden considerar casos de co-infecciones. La técnica del Western blot presenta una sensibilidad mayor respecto a la técnica de la ELISA. Al comparar los resultados obtenidos con la ELISA/Fe-SODe y los obtenidos con el Western blot, encontramos unos valores de concordancia entre las dos técnicas muy altos, siendo para *L. mexicana* de 99 %, para *L. braziliensis* de 84% y para *L. infantum* (*syn. chagasi*) de 92%. Sin embargo, debido a su bajo coste y fácil reproductibilidad, factores muy importantes en países con un nivel socio-económico muy bajo, endémicos para la leishmaniasis, se puede considerar la ELISA-SODe una técnica muy buena siendo su

especificidad entre el 99% y el 99,7%, su sensibilidad entre el 96,2% y el 100%, el Valor predictivo positivo entre el 86,2% y el 98,8%, el valor predictivo negativo entre el 99,7% y el 100% y el Índice Kappa de 1. En resumen, en el presente estudio demostramos la presencia de por lo menos tres especies de *Leishmania* (*L. mexicana*, *L. braziliensis* y *L. infantum* (*syn. chagasi*)) en la población canina de las ciudades de Playa del Carmen, Akumal, Xcalak, Xahuaxol (estado de Quintana Roo), Molas and Xcalacoop (estado de Yucatán).

Por lo tanto, al igual que en el Viejo Mundo, consideramos a los perros como la principal fuente de mantenimiento del ciclo de transmisión de la leishmaniasis, siendo necesario realizar un estudio epidemiológico más extenso de estos reservorios, tanto silvestres como urbanos, para diseñar un plan de control eficaz contra esta enfermedad. Tal estudio podría extenderse a otros estados mexicanos, como Campeche y a los países vecinos. Debido a la estrecha relación entre los perros y sus dueños, un estudio similar se debería realizar con la población humana de estas regiones.

La enfermedad de Chagas está ampliamente distribuida en México, con una prevalencia oficial debajo de lo esperado (1,5%). Esto podría ser debido a la falta de financiación estatal para este tipo de estudios en los 31 estados mexicanos, los reportes disponibles se han realizado con bajos recursos, con el resultado de que no hay estudios sólidos disponibles para indicar la verdadera prevalencia (Petherick, 2010). En el caso de la Península de Yucatán, el vector de *T. cruzi* es el insecto *Triatoma*

*dimidiata*, encontrado en las viviendas de los campesinos, así como en áreas urbanas en el desde abril hasta mayo, aunque parece ser que tiene poca capacidad para establecer colonias (Payet y col., 2009). Los animales domésticos y peridomésticos, y en particular los perros, son considerados como los principales reservorios de la enfermedad (Cruz-Reyes y Pickering-López, 2006; Barbabosa-Pliego y col, 2009; Troncarelli y col, 2009; Cruz-Chan y col., 2010). En la isla caribeña de Grenada, país no endémico para la enfermedad de Chagas, se realizó un estudio con 67 muestras de perros y se encontró una prevalencia de positividad para *T. cruzi* del 4,3% (Cruz-Reyes y Pickering-López, 2006; Rosypal y col., 2010). En México, la prevalencia de los perros callejeros infectados por *T. cruzi* se ha incrementado del 17% al 34% en los últimos 2 años, debido a la adaptación de los vectores a los ambientes urbanos. Además, el 8% de los propietarios de perros infectados también resultaron positivos para *T. cruzi* (Jiménez Coello y col., 2010). Nuestro estudio de la enfermedad de Chagas en la población canina de siete localidades de la Península de Yucatán: ciudad de Mérida, Molas, Playa del Carmen, Akumal, Xcalacoop, Xcalak y Xahuaxol; es importante por el foco de transmisión que suponen los perros como principal reservorio. Este estudio ha mostrado una prevalencia total del 14,76% en el estado de Yucatán: 10,55% en la ciudad de Mérida, un 8,84% en la ciudad de Molas y 23,08% en la ciudad de Xcalacoop. En el estado de Quintana Roo, encontramos una prevalencia de 21,34%: con un 6,35% en Playa del Carmen, 11,11% en Akumal, 33,07% en Xcalak y 7,69% en Xahuaxol. Estos datos deberían ser preocupantes teniendo en cuenta que estos tres últimos lugares son visitados cada año por miles de turistas que podrían estar expuestos a la picadura del vector y que al regresar a sus países podrían, por sangre y / o donaciones de órganos,

introducir la enfermedad en países no endémicos donde la enfermedad es desconocida. Se confirma nuevamente que la Fe-SODe es un marcador molecular altamente inmunogénico y específico para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas, como ya hemos mostrado en el estudio realizado en las localidades de Tulum y Celestún (17,1% de seroprevalencia). Puesto que los perros están considerados como los principales reservorios de la enfermedad de Chagas es necesario controlar y supervisar estos animales con el fin de evitar que se conviertan en una amenaza para la salud humana. En general, los perros presentan un factor de riesgo para sus dueños, incrementándose cuando los perros tienen una mayor relación con el entorno silvestre (los perros utilizados para la caza o que obtienen su alimento de caza cerca de la casa). Además, se ha registrado cada vez con más frecuencia la presencia de vectores en las viviendas debido a la adaptación de los artrópodos al entorno doméstico. Los datos sobre la prevalencia y la distribución geográfica de la tripanosomiasis americana en los perros son importantes para el desarrollo estratégico de control de la enfermedad. Además, el presente trabajo pone de manifiesto la importancia de las técnicas inmunológicas como una herramienta indispensable para el diagnóstico de enfermedades infecciosas, lo que confirma la alta sensibilidad y especificidad de la Fe-SODe para el cribado general de esta enfermedad en las zonas endémicas.

Aunque han pasado casi cien años desde que se reportó el primer caso de leishmaniasis felina por *L. infantum* en Argelia en 1912 (Michael y col., 1982), se han publicado muy pocos estudios epidemiológicos de esta enfermedad en gatos. Así pues, de los pocos datos existentes se ha

reportado una prevalencia de 3,87% en Grecia, de 2,8% para Portugal, de 6,7% para Israel y de 0,9% para el norte de Italia (Toscana y Liguria) (Nasereddin y col., 2008; Diakou y col., 2009; Duarte y col., 2010; Poli y col., 2002). La prevalencia de *Leishmania* spp. en perros en América Central y América del Sur varía mucho entre regiones, que van desde un 25% hasta un máximo de 75% en focos epidémicos, según el método de diagnóstico utilizado (Cortada y col., 2004). En 2010 se registró el primer caso de un gato infectado de forma natural por *L. infantum* (*syn. chagasi*) en Brasil (da Silva y col., 2010). Desde entonces, en Latinoamérica sólo se ha realizado un estudio en Brasil mediante el uso de técnicas parasitológicas y moleculares que encontró un 5,76% de gatos positivos (Dourado y col., 2011), por el contrario, la prevalencia de leishmaniasis canina en este país es mucho más elevada, habiéndose reportado valores del 64,6% (Silva y col., 2001). Los conocimientos de la leishmaniasis felina en países no endémicos del continente americano como Estados Unidos, han mostrado que se trata de una enfermedad emergente relacionada con los animales de compañía (Petersen, 2009). Por todo ello, parece ser que la falta de datos es debida al limitado número de estudios realizados y no a la ausencia de estas enfermedades en los felinos. Nuestro estudio ha sido pionero en el diagnóstico de la enfermedad de Chagas y la leishmaniasis en sueros felinos y hemos encontrado una prevalencia del 10,5% para *L. mexicana* y de 11,57% para *L. braziliensis* en la península de Yucatán, los cuales son mucho más bajos que los valores que obtuvimos para los perros en esta región (alrededor del 30%). La prevalencia de *L. infantum* (*syn. chagasi*) es casi el doble que para *L. braziliensis* y *L. mexicana*, aunque nuestros estudios correspondientes en perros mostraron lo opuesto, con una prevalencia de *L. braziliensis* y *L. mexicana* que es casi

dos veces la de *L. infantum* (*syn. chagasi*). Esto se puede explicar en función a los hábitos de alimentación de los diferentes vectores para *L. infantum* (*syn. chagasi*): *Lu. longitupalpis* y e *Lu. evanzi*. Así en 2009, Maroli y col. propuso que *Phlebotomus sergenti*, vector principal de *L. tropica*, prefiere alimentarse de los gatos y los pájaros, mientras que, *P. papatasi* vector principal de *L. major*, prefiere alimentarse de perros y gatos. Podría parecer que los vectores de *L. infantum* (*syn. chagasi*) prefieren alimentarse de los gatos antes que de los perros.

La comparación de la fiabilidad de la técnica ELISA-SODe con el Western blot, dio como resultado que se trata de una técnica muy sensible (100%) y altamente específica (97-100%) y no presenta reactividad cruzada con otros tripanosomátidos. En efecto, con esta técnica, hemos sido capaces de demostrar que los gatos producen anticuerpos contra diferentes especies de *Leishmania*: siete de las 95 muestras (7,37%) dieron positivo para dos especies de *Leishmania* spp. y/o *T. cruzi*, y sólo cuatro (4,2%) dieron positivos para tres especies de *Leishmania* spp. y/o *T. cruzi*. Estos bajos niveles de anticuerpos positivos sugieren una posible co-infección, lo cual ocurre normalmente en perros como hemos observado en nuestros estudios.

En función a los datos publicados y a nuestros propios resultados, proponemos que los gatos podrían estar expuestos a las picaduras de los flebotominos, y por lo tanto, la infección por *Leishmania* spp. podría cursar de forma similar a la observada en los perros, así que podrían ser considerados como un reservorios adicionales para esta enfermedad. Además, la preferencia de los vectores al alimentarse de uno u otro de los mamíferos antes mencionados pueden ser útil a la hora de entender la situación epidemiológica completa. Bongiorno y col. (2003) han propuesto

que los hábitos alimenticios de los vectores de *Leishmania* pueden influir en la epidemiología de esta enfermedad en zonas urbanas y periurbanas. Debido a la escasez de hospedadores vertebrados en estas zonas, los flebotominos hembras tienden a picar con más frecuencia a los humanos o perros. Una situación similar podría ocurrir en gatos, domésticos y semi-doméstico. A la luz de estos resultados, sería conveniente ampliar este estudio de gatos domésticos y salvajes a todos los países donde la leishmaniasis es endémica, especialmente aquellos donde la prevalencia en los perros es alta o muy alta.

La prevalencia de anticuerpos frente a *T. cruzi* en los gatos es de 7,4%, usando Fe-SODe como antígeno. Un valor que es menor al que encontramos para los perros en la Península de Yucatán (14.76%). Estos hallazgos sugieren que el gato puede ser un hospedador accidental de la enfermedad de Chagas en lugar de un reservorio, aunque más estudios serán necesarios para confirmar esta hipótesis.

Debido a los excelentes resultados obtenidos usando la Fe-SODe en el diagnóstico tanto de *T. cruzi* como de *Leishmania* spp. en distintos hospedadores vertebrados de las enfermedades (perros y gatos), decidimos analizar 258 sueros de pacientes procedentes de zonas suburbanas de Santiago de Querétaro (México), ciudad endémica de la enfermedad de Chagas. Para evaluar el potencial antigénico de la Fe-SODe y su posible utilización en el inmunodiagnóstico de la enfermedad de Chagas en humanos, se ensayaron estos sueros por la técnicas de ELISA-SODe y Western blot. Los resultados obtenidos de prevalencia por ELISA-SODe han sido del 12,4%, algo más elevados a las prevalencias obtenidas

anteriormente para *T. cruzi* en distintas regiones de Querétaro: 8,16% (Villagrán y col., 2005) y 6,6% (Villagrán y col., 2009). La evaluación de los resultados teniendo en cuenta el total de los sueros humanos analizados con la técnica ELISA-SODe y comparándola con la técnica de WB-SODe, se encontró que la sensibilidad de esta técnica alcanzó el 93% y una especificidad del 99%. El valor predictivo positivo con la técnica de ELISA-SODe fue del 93% y el valor predictivo negativo fue del 99%. Con el índice de Kappa (k) de 1, lo que nos confirma que la proporción de concordancia, más allá del azar, entre ambas pruebas realizadas ELISA-SODe y WB-SODe, es total.

Por lo general, se piensa que la enfermedad de Chagas no es muy común en México ya que son pocos los casos documentados. Esto puede ser debido a la existencia de un subregistro por falta de un diagnóstico adecuado, como ocurre con otras enfermedades. Los casos notificados en el país corresponden a los estados de Oaxaca, Chiapas, Jalisco, Michoacán, Guerrero, Zacatecas, Yucatán, Veracruz, Estado de México, Sonora y San Luis Potosí (Ramos-Ligonio y col., 2010). La prevalencia reportada es sumamente variada, los datos van desde un 2,8% reportado en el Estado de Nuevo León hasta el 16,8% reportado en el estado de Veracruz (Ramsey y col., 2003; Salazar y col., 2011). En el estado de Querétaro es desconocida la prevalencia de esta enfermedad y solamente se dispone de los datos aportados en el año 2005 (Villagrán y col., 2005), donde se encontró una prevalencia del 8,6% y en el año 2009 del 6,6%, en ambos estudios en poblaciones rurales (Villagrán y col., 2009). Por este motivo el segundo objetivo de nuestro trabajo fue aportar nuevos datos sobre la epidemiología de la enfermedad en este estado, centrando nuestro estudio en la zona suburbana de la capital del estado. La prevalencia encontrada en este



estudio es significativamente mayor que la reportada en el 2005, esto podría deberse a un movimiento de la enfermedad de un ambiente rural a urbano y por otro lado podría deberse a un incremento de la enfermedad. La prevalencia en hombres fue más alta que en mujeres, 17.0% y 11.2%, respectivamente, esto es concordante con los encontrado por algunos autores (Ramos-Ligonio y col., 2010), aunque para otros (Galavíz-Silva y col., 2009), las diferencias no son tan significativas. La prevalencia por edades nos demuestra que el grupo de individuos entre 36 a 50 años, son los que presentan mayor prevalencia (15.9%). Los individuos seropositivos en este estudio presentaban alteraciones patológicas típicas de la fase crónica de la enfermedad de Chagas, el 35% de los pacientes presentaban algún tipo de dislipidemia (DSP), seguido por un 29% de individuos con insuficiencia cardiaca crónica (CCF). Se demostró que Fe-SOD excretada por *T. cruzi* tiene una alta especificidad, lo que es útil para diagnosticar la enfermedad de Chagas y al mismo tiempo proporciona los datos epidemiológicos sobre la seroprevalencia de la enfermedad en la población de los suburbios de Santiago de Querétaro. Estos datos preliminares revelan por primera vez el grado de infección de las zonas no rurales de México.

Debido a la alta incidencia de la Enfermedad de Chagas y teniendo en cuenta el riesgo que presenta tanto para los seres humanos, como para, otras especies de mamíferos que actúan como reservorios naturales de *T. cruzi*, es de suma importancia atender con medidas de prevención a las poblaciones que se encuentran con alto riesgo de sufrir la enfermedad. Cada día se hace más necesario el desarrollo de un método de diagnóstico altamente sensible y específico para brindar un tratamiento adecuado en el

menor tiempo posible, disminuyendo de esta forma el posible contagio de la enfermedad. Por ello proponemos, la Fe-SOD excretada como una es excelente fracción antigénica para el serodiagnóstico en estudios epidemiológicos, de cribado e incluso como constituyente de una prueba de diagnóstico de referencia.

Con este trabajo pretendemos remarcar la importancia de las técnicas inmunológicas como herramienta indispensable para diagnosticar enfermedades tropicales, como la enfermedad de Chagas y la leishmaniasis, ya que, son las únicas que permiten un diagnóstico fiable por su capacidad de detectar casos asintomáticos o con sintomatología confusa. Por lo tanto, es urgente efectua un diagnóstico temprano de animales o humanos sospechosos o en riesgo de padecer estas enfermedades, para así tratarlos adecuadamente y disminuir la densidad de la población de infectados y con ello eliminar los focos endémicos de los parásitos.



## **7. CONCLUSIONES**



1. La enzima Fe-SODe ha demostrado ser un biomarcador molecular de alta sensibilidad y especificidad para el diagnóstico de la leishmaniasis y la enfermedad de Chagas, no mostrando reacción cruzada entre las diferentes especies de la familia Trypanosomatidae.
2. Se ha detectado la presencia de anticuerpos frente a cuatro especies de *Leishmania* (*L. braziliensis*, *L. mexicana*, *L. infantum*, *L. panamensis*) y frente a *Trypanosoma cruzi* en perros de la Península de Yucatán, siendo la primera vez que se detectan anticuerpos frente a *L. panamensis* en perros de esta región.
3. Se confirma así la importancia del hospedador canino como posible reservorio en el ciclo vital de estos agentes etiológicos (*Leishmania spp.* y *T. cruzi*)
4. Se ha demostrado la presencia de anticuerpos frente a *Leishmania spp.* y *T. cruzi* en la población felina de la Península de Yucatán, sugiriendo el papel de los gatos como posibles reservorios de la leishmaniasis y como hospedadores accidentales para la enfermedad de Chagas debido a su baja seroprevalencia.
5. Se ha detectado la presencia de anticuerpos frente a *T. cruzi* en zonas suburbanas de la ciudad de Santiago de Querétaro, indicando un acercamiento de la enfermedad de Chagas a las zonas urbanas

CONCLUSIÓN GENERAL:

La Fe-SODe es una excelente fracción antigénica para el serodiagnóstico en estudios epidemiológicos empleando la técnica de ELISA, tanto para la leishmaniasis como para la enfermedad de Chagas en humanos y en otros mamíferos, presentando una alta sensibilidad (93-100%) y especificidad (97-100%).

## **8. BIBLIOGRAFÍA**





- Adams ER (2013). “Trypanosoma”. Molecular detection of human parasitic pathogens. Ed. Dongyou Liu. 135-148
- Alves WA, Bevilacqua PD (2004). “Quality of diagnosis of canine visceral Leishmaniasis in epidemiological surveys: an epidemic in Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil”, 1993-1997, *Cad Saude Pública*, **20**(1): 259-265
- Ameen M (2010). “Cutaneous leishmaniasis: advances in disease pathogenesis, diagnostics and therapeutics”. *Clin Exp Dermatol*, **35**: 699–705.
- Andrade-Narvaez FJ, Canto-Lara SB, Wynsberghe NR, Rebollar-Tellez EA, Vargas- Gonzalez A and Albertos-Alpuche EN (2003). “Seasonal Transmission of Leishmania (Leishmania) mexicana in the state of Campeche, Yucatán Peninsula, México”. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*, **98**(8): 995-998
- Argolo AM, Felix M, Pacheco R, Costa J (2008). “La enfermedad de Chagas y sus principales vectores en Brasil”. Fundación Oswaldo Cruz. Programa Integrado de la enfermedad de Chagas. Instituto Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro.
- Ashford DA, David JR, Freire M, David R, Sherlock I, y col. (1998) “Studies on control of visceral leishmaniasis: impact of dog

control on canine and human visceral leishmaniasis in Jacobina, Bahia, Brazil”. *Am J Trop Med Hyg*, **59**: 53–57

- Aufderheide AC, Salo W, Madden M, Streitz J, Buikstra J, Guhl F, Arriaza B, Renier C, Wittmers LE Jr, Fornaciari G, Allison M (2004). “A 9,000-year record of Chagas' disease”. *Proc Natl Acad Sci USA*, **101**(7): 2034-9
- Ayllon T, Tesouro MA, Amusategui I, Villaescusa A, Rodriguez-Franco F, Sainz A (2008). “Serologic and molecular evaluation of *Leishmania infantum* in cats from Central Spain”. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **1149**:361-4
- Barbabosa W, Czerewuta AC, Oliveira RL (1983). “Tentativa de isolamento primario de pacientes cronicos de doenca de Chagas por hemocultura agentes bloqueadores,” *Rev Patol Trop*, **12**: 155-163
- Barbabosa-Pliego A, Díaz-Albiter HM, Ochoa-García L, Aparicio-Burgos E, López-Heydeck SM, Velásquez-Ordoñez V, Fajardo-Muñoz RC, Díaz-González S, De Oca-Jimenez RM, Barbosa-Mireles M, Guzmán-Bracho C, Estrada-Franco JG, Garg NJ, Vázquez-Chagoyán JC (2009). “*Trypanosoma cruzi* circulating in the southern region of the State of Mexico (Zumpahuacan) are pathogenic: a dog model”. *Am J Trop Med Hyg*, **81**(3): 390-5

## BIBLIOGRAFÍA

- Bonfante-Garrido R (1983). “Leishmanias y leishmaniasis tegumentaria en América Latina”. Bol Oficina Sanit Panam, **95**: 418-426
- Bongiorno G, Habluetzel A, Khoury C, Maroli M (2003). “Host preferences of phlebotomine sand flies at a hypoendemic focus of canine leishmaniasis in central Italy”. Acta Tropica, **88**(2): 109-16
- Braz R, Nascimento E, Martins D y col. (2002). “The sensitivity and specificity of *Leishmania chagasi* recombinant k39 antigen in the diagnosis of American Visceral Leishmaniasis and in differentiating active from subclinical infection”. Am Soc Trop Med Hyg, **67**(4): 344-348
- Caballero ZC, Sousa OE, Marques WP, Saez-Alquezar A, Umezawa ES (2007). “Evaluation of serological tests to identify *Trypanosoma cruzi* infection in humans and determine cross-reactivity with *Trypanosoma rangeli* and *Leishmania* spp.” Clin Vaccine Immunol, **14**: 1045-9
- Canese A, Garoso O, Ramírez J, Maidana N, Montini M, Santa-Cruz R (1999). “Focos de leishmaniasis visceral canina en las ciudades de Lambare y Villa Elisa Paraguay”. Rev Paraguaya de Microbiología, **19**: 1-15
- Cardinal MV, Lauricella MA, Marcet PL, Orozco MM, Kitron U, Gütler RE (2007). “Impact of community-based vector control on

house infestation and *Trypanosoma cruzi* infection in *Triatoma infestans*, dogs and cats in the Argentine Chaco”. *Acta Tropica*, **103**(3): 201-211

- Cardoso L, Schallig HD, Neto F, Kroon N, Rodrigues M (2004). "Serological survey of *Leishmania* infection in dogs from the municipality of Peso da Ragua (Alto Douro, Portugal) using the direct agglutination test (DAT) and fast agglutination screening test (FAST)." *Acta Trop.* **91**: 95-100
- Carlier Y, Luquetti AO, Dias JCP, Truyens C, y col. (2004) “Chagas Disease (American Trypanosomiasis)”. *eMedicineJournal*. <http://www.emedicine.com/med/topic327.htm>.
- Carrada-Bravo T. (2004). “*Trypanosoma cruzi*: Historia natural y diagnóstico de la enfermedad de Chagas”. *Rev Mex Patol Clin*, **51**(4): 205-219
- Castro EA, Thomaz-Soccol V, Augur C, Luz E (2007). “*Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis*: epidemiology of canine cutaneous Leishmaniasis in the State of Parana ´ (Brazil),” *Experimental Parasitology*, **117** (1): 13-21
- Cardoso L, Lopes AP, Sherry K, Schallig H, Solano-Gallego L (2010). “Low prevalence of *Leishmania infantum* infection in cats from northern Portugal based on DAT and ELISA”. *Vet Parasitol*, **174**:37-42

- Córdova-Uscanga C, Albertos-Alpuche NE, Andrade-Narvaez FJ, Canto-Lara SB (1993). “Leishmaniasis: a preliminary epidemiological study in a locality of the endemic area in the state of the Tabasco”. *Salud Publica de Mexico*, **35**(4): 345-50
- Cortada VM, Doval ME, Souza Lima MA, Oshiro ET, Meneses CR, Abreu-Silva AL, Cupolilo E, Souza CS, Cardoso FO, Zaverucha do Valle T, Brazil RP, Calabrese KS, Gonçalves da Costa SC. (2004) “Canine visceral leishmaniosis in Anastácio, Mato Grosso do Sul state, Brazil”. *Vet Res Commun*, **28**: 365-374
- Coura JR (2006). “Transmission of chagasic infection by oral route in the natural history of Chagas disease”. *Rev Soc Bras Med Trop*. **39** (Suppl 3): 113-7
- Coura JR and Dias JCP (2009). “Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease: 100 years after its Discovery”. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **104**: 31-40
- Coura JR and Viñas PA (2010). “Chagas Disease: a new worldwide challenge”. *Nature*, **465**(7301): S6-7
- Cruz-Chan JV, Quijano-Hernandez I, Ramirez-Sierra MJ, Dumonteil E (2010). “*Dirofilaria immitis* and *Trypanosoma cruzi* natural co-infection in dogs”. *Vet J*, **186**(3): 399-401

## BIBLIOGRAFÍA

- Cruz-Reyes A, Pickering-López JM (2006). “Chagas disease in Mexico: an analysis of geographical distribution during the past 76 years—a review”. Mem. Inst. Oswaldo Cruz **101**: 345-354
- Dantas-Torres F (2007). “The role of dogs as reservoirs of *Leishmania* parasites, with emphasis on *Leishmania (Leishmania) infantum* and *Leishmania (Viannia) braziliensis*,” Veterinary Parasitology, **149** (3-4): 139-146
- Dantas-Torres F (2009). “Canine Leishmaniasis in South America”. Review. Parasite & Vectors, **2** (I)
- Dantas-Torres F, de Brito MEF, Brandão-Filho SP (2006). “Seroepidemiological survey on canine leishmaniasis among dogs from an urban area of Brazil”. Vet Parasitol, **140**: 54-60
- Da Silva SM, Rabelo PF, Gontijo Nde F, Ribeiro RR, Melo MN, Ribeiro VM, y col. (2010). “First report of infection of *Lutzomyia longipalpis* by *Leishmania (Leishmania) infantum* from a naturally infected cat of Brazil”. Veterinary Parasitology, **174**(1-2): 150-4
- De Paula A, Da Silva A, Fernades O y col. (2003) “The use of immunoblot analysis in the diagnosis of canine visceral leishmaniasis in an endemic área of Rio de Janeiro”. J Parasitol, **89**: 832-836

- De Souza W, de Carvalho TM, Barrias ES (2010). “Review on *Trypanosoma cruzi*: Host Cell Interaccion”. International Journal of Cell Biology, ID 295394, 18
- Diakou A, Papadopoulos E, Lazarides K (2009). “Specific anti-*Leishmania* spp. antibodies in stray cats in Greece”. Journal of Feline Medicine and Surgery, **11**(8): 728-30
- Do Rosário E, Generao O, Franca-Silva M y col. (2005). “Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay using crude *Leishmania* and recombinant antigens as a diagnostic marker for canine visceral leishmaniasis”. Mem Inst Oswaldo Cruz, **100**(2): 197-203
- Dourado Coelho WM, Bodelão Richini-Pereira V, Langoni H, Saraiva Bresciani KD (2011). “Molecular detection of *Leishmania* sp. in cats (*Felis catus*) from Andradina Municipality, Sao Paulo State, Brazil”. Veterinary Parasitology, **176**(2–3): 281-2
- Duarte A, Castro I, Pereira da Fonseca IM, Almeida V, Madeira de Carvalho LM, Meireles J, y col. (2010). “Survey of infectious and parasitic diseases in stray cats at the Lisbon Metropolitan Area, Portugal”. Journal of Feline Medicine and Surgery, **12**(6): 441-6
- El Harith A, Slappendel RJ, Reiter I, van Knapen F, de Korte P, Huigen E, Kolk AH (1989). “Application of a direct agglutination



test for detection of specific anti-*Leishmania* antibodies in the canine reservoir." J. Clin. Microbiol. **27**: 2252-7

- Esquinca RR, Gomez CH, Guevara A (2005). "Encuesta rápida de Leishmaniasis visceral en caninos en un área endémica de Chiapas". REDVET, **6**:1-7 (<http://www.veterinaria.org/revista/redvet/n080805.html>)
- Estrada-Franco JG, Bhatia V, Diaz-Albiter H, Ochoa-Garcia L, Barbabosa A, Vazquez-Chagoyan JC, Martinez-Perez MA, Guzman-Bracho C, Garg N (2006). "Human Trypanosoma cruzi infection and seropositivity in dogs, Mexico". Emerg. Infect. Dis. **12**: 624-630
- Faust C (2003). "Flagelados de la sangre y los tejidos". Parasitología clínica. 3ª edición. Ed. Masson Doyma Mexico, S.A. 93-102
- Fernández JM, Charry TAC, Bello GFJ, y col. (2002) "Prevalence of canine visceral leishmaniasis in municipalities of Huila, Colombia". Rev Salud Pública, **4**: 278-85
- Ferroglio F, Centaro E, Mignone W y col. (2007). "Evaluation o fan ELISA rapad device for the serological diagnosis of *Leishmania infantum* infection in dog as compared with immunofluorescence assay and Western blot". Vet Parasitol, **144**: 162-166

## BIBLIOGRAFÍA

- Galavíz-Silva L, Molina-Garza DP, González-Santos MA y col. (2009) “Update on seroprevalence of anti-Trypanosoma cruzi antibodies among blood donors in northeast Mexico,” *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **81**(3): 404-406
- Gallego Berenguer J (2007). “Manual de Parasitología: Morfología y biología de los parásitos de interés sanitario”. Edition: 2. Edicions Universitat Barcelona, 151-157
- Gil-Prieto R, Walter S, Alvar J, Gil de Miguel A (2011). “Incidence of hospitalizations related to Leishmaniasis by autonomous region and human immunodeficiency virus (HIV) status in Spain (1997–2008)”. *Am J Trop Med Hyg*, **85**(5): 820-825
- Grabmeier-Pfistershammer K, Poepl W, Brunner PM, Rappersberger K, Rieger A (2012). *Clinical Challenges in the Management of Leishmania/HIV. Coinfection in a Nonendemic Area: A Case Report*. *Case Rep Infect Dis*, 2012:787305
- Guhl S, Nicholls S (2001). “Manual de procedimientos para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas”. 1. ed. Bogotá, Colombia: Organización Mundial de la Salud, Ministerio de Salud de Colombia, Instituto Nacional de Salud y Universidad de los Andes. 98p

- Hotez PJ (2008). Neglected infections of poverty in the United States of America. *PLoS Negl Trop Dis*, **2**:e256
- Ibáñez-Bernal S (1999). “Phlebotominae in Mexico. I. *Brumptomyia* França and Parrot; *Lutzomyia* França, the species L. (*Lutzomyia*) França and group *verrucarum* [in Spanish?]”. *Folia Entomol Mex*, **107**:61-116
- Ikononopoulos J, Kokotas S, Gazouli M, Zavras A, Stoitsiou M, Gorgoulis VG (2003). "Molecular diagnosis of Leishmaniasis in dogs. Comparative application of traditional diagnostic methods and the proposed assay on clinical samples." *Vet. Parasitol.* **113**: 99-113
- Iniesta L, Fernández-Barredo S, Bulle B, Gómez MT, Piarroux R, Gállego M, Alunda JM, Portús M (2002). "Diagnostic techniques to detect cryptic Leishmaniasis in dogs." *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **9**:1137-41
- Ismail SO, Paramchuk W, Yasir A, y col. (1997). “Molecular cloning and characterization of two iron superoxide dismutase cDNAs from *Trypanosoma cruzi*”. *Mol Biochem Parasitol*, **86**: 87-97
- Jiménez-Coello M, Guzmán-Marín E, Ortega-Pacheco A, Acosta-Viana KY (2010). “Serological survey of American

trypanosomiasis in dogs and their owners from an urban area of Mérida Yucatán, México”. *Transbound Emerg Dis*, **57**: 33-36

- Joao A, Pereira MA, Cortes S, Santos-Gómez GM (2006). “Canine Leishmaniasis chemotherapy: Dog’s clinical condition and risk of Leishmania transmission”. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med*, **53**: 540-5
- Kamhawi S (2006). “Phlebotomine sand flies and Leishmania parasites: friends or foes?”. *Trends Parasitol*, **22**: 439-45
- Lainson R, Shaw JJ (2005). “New World leishmaniasis”. In *Topley & Wilson’s Microbiology and Microbial Infections, Parasitology*. Edited by Cox FEG, Kreier JP, Wakelin D. London: Arnold, 313-349
- Lachaud L, Marchergui-Hammami S, Chabbert E y col. (2001). “Comparison of six PCR methods using peripheral blood for detection of Canine Visceral Leishmaniasis”. *J Clin Microbiol*, **40**(1): 210-215
- Levine ND, Corliss JO, Cox FEG, Deroux G, Grain J, Honigberg BM, Leedale GF, Loeblich AR, Lom J, Lynn D, Merinfeld EG, Page FC, Poljansky G, Sprague V, Vavra J, Wallace FG (1980). “A Newly Revised Classification of the Protozoa”. *J. Protozol*. **27**: 37-58

## BIBLIOGRAFÍA

- Lugones H (2002). “Chagas aguda. Situación actual”. 1st. Virtual Congress of Cardiology, Argentina.
- Luquetti AO, Rosas F, Vanegas D, Cabrales M. (2007) “Diagnóstico de la enfermedad de Chagas,” in Enfermedad de Chagas, Sociedad Colombiana de Cardiología y Cirugía Vascul ar. Bogaota, Colombia. Eds., 25-32
- Luz LMP, Coutinho MG, Cancado JR, Krettli AU (1994) “Hemocultura: tecnica sensivel na deteccao do Trypanosoma cruzi em pacientes chagasicos na fase cronica da doenca de Chagas,” Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, **27**:143-148
- Madeira MF, Schubach AO, Schubach TM, Pacheco RS, Oliveira FS, Pereira SA, Figueiredo FB, Baptista C, Marzochi MC (2006). “Mixed infection with *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Leishmania) chagasi* in a naturally infected dog from Rio de Janeiro, Brazil”. Trans R Soc Trop Med Hyg, **100**: 442-445
- Maia C, Gomes J, Cristóvão J, Nunes M, Martins A, Rebêlo E, Campino L (2010). “Feline Leishmania infection in a canine leishmaniasis endemic region, Portugal”. Veterinary parasitology, **174**: 336-340
- Manciantini F (2004). “Feline Leishmaniasis: what’s the epidemiological role of the cat?”. Prassitologia, **46**(1-2): 203-206

## BIBLIOGRAFÍA

- Marco JD, Barroso PA, Calvopina M, Kumazawa H, Furuya M, Korenaga M, Cajal SP, Mora MC, Rea MM, Borda CE, Basombrío MA, Taranto NJ, Hashiguchi Y (2005). “Species assignation of *Leishmania* from human and canine American tegumentary leishmaniasis cases by multilocus enzyme electrophoresis in North Argentina”. *Am J Trop Med Hyg*, **72**: 606-611
- Marín C, Hitos AB, Rodríguez-González I, Dollet M, Sánchez-Moreno M (2004). “*Phytomonas* iron superoxide dismutase: a possible molecular marker”. *FEMS Microbiol Lett*, **234**(1): 69-74
- Marín C, Longoni SS, Mateo H, de Diego JA, Alunda JM, Minaya G, Sánchez-Moreno M (2007). “The use of an excreted superoxide dismutase in an ELISA and Western blotting for the diagnosis of *Leishmania (Leishmania) infantum* naturally infected dogs”. *Parasitol Res*, **101**: 801-808
- Marín C, Longoni S, Sánchez-Moreno M (2013). “*Leishmania*”. *Molecular detection of human parasitic pathogens*. Ed. Dongyou Liu. 91-107
- Marín C, Rodríguez-González I, Sánchez-Moreno M (2006). “Identification of secreted iron superoxide dismutase for the diagnosis of *Phytomonas*”. *Mem Inst Oswaldo Cruz*; **101**(6):649-654

- Marin C, Sánchez-Moreno M (2010). “Excreted/secreted antigens in the diagnosis of Chagas’ disease”. In: Jirillo E, Brandonisio O, editors. Immune response to parasitic infections 1. Bentham eBooks, 10–20 [chapter 2]
- Marín C, Longoni SS, Urbano J, Minaya G, Mateo H, de Diego JA, Rosales MJ, Pérez-Cordón G, Romero D, Sánchez-Moreno M (2009). “Enzyme-linked immunosorbent assay for superoxide dismutase-excreted antigen in diagnosis of sylvatic and andean cutaneous leishmaniasis of Peru”. *Am J Trop Med Hyg*, **80**(1): 55-60
- Martins Gonçalves CC, Vissoci Reiche EM, Alvesde Abreu Filho B y col. (2002). “Evaluation of antigens from various *Leishmania* species in a western blot for diagnosis of American tegumentary leishmaniasis”. *Am J Trop Med Hyg*, **66**: 91-102
- Mateo H, Marín C, Pérez-Cordón G, Sánchez-Moreno M (2008). “Purification and biochemical characterization of four iron superoxide dismutases in *Trypanosoma cruzi*”. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, **103**(3): 271-6
- Mateo H, Sánchez-Moreno M, Marín C (2010). Enzyme-linked immunosorbent assay with purified *Trypanosoma cruzi* excreted superoxide dismutase. *Clin Biochem*, **43**(15):1257-64

- Maroli M, Jalouk L, Al Ahmed M, Bianchi R, Bongiorno G, Khoury C, y col. (2009). “Aspects of the bionomics of *Phlebotomus sergenti* sandflies from an endemic area of anthroponotic cutaneous leishmaniasis in Aleppo Governorate, Syria”. *Medical and Veterinary Entomology*, **23**(2): 148-54
- Maroli M, Pennisi MG, Di Muccio T, Khoury C, Gradoni L, Gramiccia M (2007). “Infection of sandflies by a cat naturally infected with *Leishmania infantum*”. *Vet Parasitol*, **145**: 357-360
- Mayrink W, Williams P, Coelho MV, Dias M, Martins AV, Magalhães PA, da Costa CA, Falcão AR, Melo MN, Falcão AL (1979). “Epidemiology of dermal leishmaniasis I n the Rio Doce Valley, State of Minas Gerais, Brazil”. *Ann Trop Med Parasitol*, **73**:123-137
- Mazzotti L (1940). “Dos casos de enfermedad de Chagas en el estado de Oxaca, México”. *Gac. Med. Mex.* **70**: 417-420
- Mettler M, Grimm F, Capelli G y col. (2005) “Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assays an immunofluorescent-antibody test, and two rapid tests (immunochromatographic -dipstick and gel tests) for serological diagnosis of symptomatic and asymptomatic *Leishmania* infections in dogs”. *J Clinic Microbiol*, **43**(11): 5515-5518



- Michael SA, Morsy TA, El-Seoud SF, Saleh MS (1982). Leishmaniasis anti-bodies in stray cats in Ismailiya Governorate, Egypt. *Journal of the Egyptian Society of Parasitology*, **12**(1): 283-6
- Miles MA, Llewellyn MS, Lewis MD, Yeo M, Baleela R, Fitzpatrick S, Gaunt MW, Mauricio IL (2009). "The molecular epidemiology and phylogeography of *Trypanosoma cruzi* and parallel research on *Leishmania*: looking back and to the future". *Parasitology* 136(12):1509-28
- Mizbani A, Taheri T, Zahedifard F, Taslimi Y, Azizi H, Azadmanesh K, Papadopoulou B, Rafati S (2009). "Recombinant *Leishmania tarentolae* expressing the A2 virulence gene as a novel candidate vaccine against visceral leishmaniasis". *Vaccine*, **28**:53-62
- Mohapatra TM, Singh DP, Sen MR, Bharti K, Sundar S (2010). "Comparative evaluation of rK9, rK26 and rK39 antigens in the serodiagnosis of Indian visceral leishmaniasis". *J. Infect. Dev. Ctries*, **4**:114-117
- Moreira MA, Luvizotto MC, García JF, Corbett CE, Laurenti MD (2007). "Comparison of parasitological, immunological and molecular methods for the diagnosis of Leishmaniasis in dogs with different clinical signs." *Vet. Parasitol*, **145**(3-4):245-52

## BIBLIOGRAFÍA

- Mott KE, Mota EA, Sherlock I, Hoff R, Muniz TM, Oliveira TS, y col. (1978) “*Trypanosoma cruzi* infection in dogs and cats and household seroreactivity to *T. cruzi* in a rural community in northeast Brazil. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, **27**(6):1123-7
- Nasereddin A, Salant H, Abdeen Z (2008). “Feline leishmaniasis in Jerusalem: serological investigation”. Veterinary Parasitology, **158**(4):364-9
- Ordeix L, Solano-Gallego L, Fondevila D, Ferrer L, Fondati A (2005). “Popular dermatitis due to *Leishmania* spp. infection in dogs with parasite-specific cellular immune responses”. Vet Dermatol, **16**: 187-91
- Otranto D, Capelli G, Genchi C (2009). “Changing distribution patterns of canine vector borne diseases in Italy: leishmaniosis vs dirofilariosis”. Parasitol Vectors, **2**(Suppl 1):S2
- Otranto D, Dantas-Torres F (2010). “Canine and feline vector-borne diseases in Italy: current situation and perspectives”. Parasites and Vectors, **3**:2
- Ozon C, Marty P, Pratlong F, Breton C, Blein M, Lelièvre A, Haas P (1998). “Disseminated feline leishmaniosis due to *Leishmania infantum* in southern France”. Vet Parasitol, **75**:273-277

## BIBLIOGRAFÍA

- PAHO (2006). “Estimación cuantitativa de la enfermedad de Chagas en las Américas”. Geneva, Organización Panamericana de Salud. Ref Type: Pamphlet. Department of Control of Neglected Tropical Diseases (NTD)
- PAHO (2009). “Guía para vigilancia, prevención, control y manejo clínico de la enfermedad de Chagas Aguda transmitida por alimentos”. Organización Panamericana de la Salud. Área de Vigilancia Sanitaria y Manejo de Enfermedades. Proyecto de Enfermedades Comunicables (PAHO/HSD/CD/539.09). Proyecto de Salud Pública Veterinaria (Serie de manuales técnicos, 12)
- Palatnik de Sousa CB, Wania R, Franca-Silva y col. (2001). “Impact of canine control on the epidemiology of canine and human visceral Leishmaniasis in Brazil”. *Am Soc Trop Med Hyg*, 65(5): 510-517
- Paramchuk WJ, Ismail SO, Bhatia A, Gedamu L (1997). “Cloning, characterization and overexpression of two iron superoxide dismutase cDNAs from *Leishmania chagasi*: role in pathogenesis,” *Molecular and Biochemical Parasitology*, 90(1): 203-221
- Pavli A, Maltezos HC (2010). “Leishmaniasis, an emerging infection in travelers”. *Int J Infect Dis.*, 14(12):e1032-9. Review
- Payet V, Ramirez-Sierra MJ, Rabinovich J, Menu F, Dumonteil E (2009). “Variations in sex ratio, feeding, and fecundity of

*Triatoma dimidiata* (Hemiptera: Reduviidae) among habitats in the Yucatan Peninsula, Mexico”. *Vector Borne Zoonotic Dis.* **9**: 243-251

- Pedroso AM (1913). “Leishmaniose local do cão”. *An Paul Med Cir*, **1**:33–39
- Pech-May A, Escobedo-Ortegón FJ, Berzunza-Cruz M, Rebollar-Téllez EA (2010). “Incrimination of four sandfly species previously unrecognized as vectors of *Leishmania* parasites in Mexico”. *Med Vet Entomol*, **24**:150-161
- Petersen CA (2009). “Leishmaniasis, An Emerging Disease Found in Companion Animals in the United States”. *Top Companion Anim Med*, **24**(4): 182–188
- Petherick A (2010). “Country by Country”. *Nature* 465, S10–S11
- Piacenza L, Irigoín F, Alvarez MN, Peluffo G, Taylor MC, Kelly JM, Wilkinson SR, Radi R (2007). “Mitochondrial superoxide radicals mediate programmed cell death in *Trypanosoma cruzi*: cytoprotective action of mitochondrial iron superoxide dismutase overexpression”. *Biochem J*, **403**(2), 323-334
- Piarroux R, Gambarelli F, Dumon H, Fontes M, Dunan S, Mary C, Toga B, Quilici M (1994). "Comparison of PCR with direct examination of bone marrow aspiration, myeloculture, and serology

for diagnosis of visceral Leishmaniasis in immunocompromised patients." J Clin. Microbiol. **32**: 746-9

- Pinto JC (2005). “La Enfermedad de Chagas como reto para la Salud Pública Latinoamericana”. Primer Taller Internacional sobre Control de la Enfermedad de Chagas, 10-16. Belo Horizonte, (<http://cdiaec.uniandes.edu.co/Capitulo%201.pdf>)
- Poli A, Abramo F, Barsotti P, Leva S, Gramiccia M, Ludovisi A, y col. (2002) “Feline Leishmaniasis due to *Leishmania infantum* in Italy”. Veterinary Parasitology, **106**(3):181-91
- Portela-Lindoso AA, Shikanai-Yasuda MA (2003). “Chronic Chagas’ disease: from xenodiagnosis and hemoculture to polymerase chain reaction,” Revista de Saude Publica, 37(1): 107-115
- Ramos-Ligonio A, López-Monteon A, Guzmán-Gómez D, Rosales-Encina JL, Limón-Flores Y, Dumonteil E (2010). “Identification of a Hyperendemic Area for *Trypanosoma cruzi* Infection in Central Veracruz, Mexico”. Am J Trop Med Hyg, **83**(1): 164-170
- Ramsey JM, Cruz-Celis A, Salgado L y col. (2003). “Efficacy of pyrethroid insecticides against domestic and peridomestic populations of *Triatoma pallidipennis* and *Triatoma barberi* (Reduviidae:Triatominae) vectors of Chagas’ disease in Mexico,” Journal of Medical Entomology, 40 (6): 912–920

- Rassi Jr A, Rassi A, Marin-Neto JA (2010). "Chagas disease". *Lancet*, **375**: 1388- 402
- Rebollar-Téllez EA, Ramirez-Fraire, A, Andrade-Narvaez FJ (1996). "A two years study on vectors of cutaneous Leishmaniasis. Evidence for sylvatic transmission cycle in the state of Campeche, Mexico". *Mem Inst Oswaldo Cruz*, **91**:555-560
- Reithinger R, Davies CR (1999). "Is the domestic dog (*Canis familiaris*) a reservoir host of American cutaneous leishmaniasis? A critical review of the current evidence". *Am J Trop Med Hyg*, **61**:530-541
- Reithinger R, Dujardin JC (2007). "Molecular Diagnosis of Leishmaniasis: Current Status and Future Applications." *J. Clin. Microbiol*, **45**(1):21-5
- Riera C, Valladares JE, Gallego M y col. (1999). "Serological and parasitological follow-up in dogs experimentally infected with *Leishmania infantum* and treated with meglumine antimoniate". *Veterinary Parasitology*, **84**: 33-47
- Romero GAS and Boelaert M (2010). "Control of Visceral Leishmaniasis in Latin America -A Systematic Reviews". *Neglected Tropical Diseases*, 4, 1

## BIBLIOGRAFÍA

- Romero-Peñuela MH, Sánchez-Valencia JA (2007). “El Diagnóstico de la Leishmaniasis Visceral Canina (*Leishmania infantum*)”. *Vet Zootec*, **1**(1):51-59
- Rosypal AC, Cortés-Vecino JA, Gennari SM, Dubey JP, Tidwell RR, Lindsay DS (2007). “Serological survey of *Leishmania infantum* and *Trypanosoma cruzi* in dog from urban areas of Brazil and Colombia”. *Vet Parasitol*, **149**:172-7
- Rosypal AC, Tripp S, Kinlaw C, Sharma RN, Stone D, Dubey JP (2010). “Seroprevalence of canine leishmaniasis and American trypanosomiasis in dogs from Grenada, West Indies”. *J. Parasitol*, **96**: 228-229
- Rüfenacht S, Sager H, Müller N, Schaerer V, Heier A, Welle MM, Roosje PJ (2005). “Two cases of feline leishmaniasis in Switzerland”. *Vet Rec*, **156**(17):542-5
- Salazar Schettino PM, Bucio Torres M, Cabrera Bravo M, Ruiz Hernández AL (2011). “Presentación de dos casos de enfermedad de Chagas aguda en México,” *Gaceta Médica de México*, **147**(1): 63-69
- Salazar-Schettino PM, Bucio MI, Cabrera M, Bautista J (1997). “First case of natural infection in pigs. Review of *Trypanosoma cruzi* reservoirs in Mexico”. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **92**: 499-502

## BIBLIOGRAFÍA

- Salomón OD (2009). “Vectores de leishmaniasis en las Américas”. *Gaz Med Bahia*, 79 ( 3): 3-15
- Sánchez-García L, Berzunza-Cruz M, Becker-Fausser I, Rebollar-Téllez EA (2010). “Sand flies naturally infected by *Leishmania (L.) mexicana* in the peri-urban area of Chetumal city, Quintana Roo, Mexico”. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, **104**:406-411
- Saridomichelakis MN, Mylonakis ME, Leontides LS, Koutinas AF, Billinis C, Kontos VI (2005). "Evaluation of lymph node and bone marrow cytology in the diagnosis of canine Leishmaniasis (*Leishmania infantum*) in symptomatic and asymptomatic dogs." *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **73**: 82-6
- Schnedl J, Auer H, Fischer M, Tomaso H, Pustelnik T, Mooseder G (2007). “Cutaneous leishmaniasis. An import from Belice”. *Wien Klin Wochenschr*, **119**:102-5
- Schmunis GA and Yadon ZE (2010). “Chagas Disease: a Latin American health problem becoming a world health problem”. *Acta Tropica*, **115**: 14-21
- Seidelin H (1912). “Leishmaniasis and babesiasis in Yucatán”. *Ann trop Med Parassitol*, **6**:295-299



## BIBLIOGRAFÍA

- Sergent EE, Lombard J, Quilichini M (1912) . “La Leishmaniose à Alger. Infection simultanée d’un enfant, d’un chien et d’un chat dans le même habitacion”. Bull Soc Pathol Exot, **5**:93-98
- Sharma U and Singh S (2008). “Insect vectors of Leishmania: Distribution, physiology and their control”. Review Articles. J Vector Borne, Dis, **45**: 255-272
- Silva ES, Guntijo C, Pacheco R, Fiuza V, Brazil R (2001). “Visceral leishmaniasis in the Metropolitan Region of Belo Horizonte, State of Minas Gerais, Brazil”. Memorias do Instituto Oswaldo Cruz, **96**(3): 285-91
- Solano-Gallego L, Morell P, Arboix M y col. (2001). “Prevalence of *Leishmania infantum* infection in dogs living in an area of canine Leishmaniasis endemicity using PCR on several tissues and serology”. J Clin Microbiol, 560-563
- Soto J, Arana BA, Toledo J, Rizzo N, Vega JC, Diaz A, Luz M, Gutierrez P, Arboleda M, Berman JD, Junge K, Engel J, Sindermann H (2004). “Miltefosine for new world cutaneous Leishmaniasis,” Clinical Infectious Diseases, 38 (9): 1266-1272
- Taranto, NJ, Marinconz, R, Caffaro, CE, Cajal, SP, Malchiodi EL (2000). “Mucocutaneous leishmaniasis in naturally infected dogs in Salta, Argentina”. Rev Argent Microbiol, 32: 129-135

## BIBLIOGRAFÍA

- Tolezano JE, Uliana SR, Taniguchi HH, Araújo MF, Barbosa JA, Barbosa JE, Floeter- Winter LM, Shaw JJ (2007). “The first records of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in dogs (*Canis familiaris*) diagnosed clinically as having canine visceral leishmaniasis from Araçatuba County, São Paulo State, Brazil”. *Vet Parasitol*, **149**:280-284
- Trainor KE, Porter BF, Logan KS, Hoffman RJ, Snowden KF (2010). “Eight Cases of Feline Cutaneous Leishmaniasis in Texas”. *Veterinary Pathology*, **47**(6):1076-1081
- Troncarelli MZ, Camargo JB, Machado JG, Lucheis SB, Langoni H (2009). “*Leishmania spp.* and/or *Trypanosoma cruzi* diagnosis in dogs from endemic and nonendemic areas for canine visceral leishmaniasis”. *Vet Parasitol*, **164**(2-4):118-23
- Vargas JJ (2005). “Inmunodiagnóstico de la leishmaniosis visceral zoonótica en caninos infectados con *Leishmania (leishmania) chagasi*. Bogotá, Colombia”: Universidad Nacional de Colombia, 2005. 97p. Tesis. (Maestría en Microbiología)
- Velasco-Castrejón O, Rivas-Sánchez B, Mungía-Saldaña A, and Hobart O (2009). “Leishmaniasis cutánea de perros en México,” *Enfermedades Infecciosas y Microbiología*, **29**:135-140
- Villagrán ME, Sánchez-Moreno M, Marín C, Uribe M, de la Cruz JJ, de Diego JA (2009). “Seroprevalence to *Trypanosoma cruzi* in

rural communities of the state of Querétaro (Mexico): statistical evaluation of tests”. *Clin Biochem*, **42**(1-2):12-6

- Villagrán ME, Marín C, Rodríguez-Gonzalez I, De Diego JA, Sánchez-Moreno M (2005). “Use of an iron superoxide dismutase excreted by *Trypanosoma cruzi* in the diagnosis of Chagas disease: seroprevalence in rural zones of the state of Queretaro”, Mexico. *Am J Trop Med Hyg*, **73**(3):510-6
- WHO (2002). “Control of Chagas Disease”. World Health Organization Technical Report Series, Geneva
- 
- WHO (2003). Control de la Enfermedad de Chagas, Organización Mundial de la Salud, Ginebra, Switzerland
- WHO (2006). “Leishmaniasis: background information. The disease and its epidemiology”. (<http://www.who.int/leishmaniasis/en/>)
- WHO (2007). “Neglected diseases: A human rights analysis” TDR/SDR/SEB/ST/07.2
- WHO (2010). Control of the leishmaniasis. World Health Organization Technical Report Series. Geneva, 949: 1-186

- WHO (2010). “Chagas Disease (American trypanosomiasis) fact sheet (revised in June 2010)”. Weekly Epidemiological Record, **34**: 334-336 (<http://www.who.int/wer/2010/wer8534/en/>)
- WHO (2012). La enfermedad de Chagas (tripanosomiasis americana). Nota descriptiva N°340 (<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/es/index.html>)
- WHO (2013). <http://www.who.int/leishmaniasis/burden/en/> (Accessed February 2013)
- Wincker P, Britto C, Pereira JB, Cardoso MA, Oelemann W, Morel CM (1994). “Use of a simplified polymerase chain reaction procedure to detect *Trypanosoma cruzi* in blood samples from chronic chagasic patients in a rural endemic area”. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, **51**(6): 771-777
- Yoshida N (2009). “Molecular mechanisms of *Trypanosoma cruzi* infection by oral route”. Mem Int Oswaldo Cruz, **104**: 101-107
- Zavala-Velázquez J, Barrera-Pérez M, Rodríguez-Félix ME, Guzmán-Marín E, Ruíz-Piña H (1996). “Infection by *Trypanosoma cruzi* in mammals in Yucatan, Mexico: a serological and parasitological study”. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo **38**: 289-292
- Zeledón R, Maingon R, Ward R, Arana B, y col. (1993). “The characterization of *Leishmania* parasites and their vectors from

## BIBLIOGRAFÍA

Central America using molecular techniques". Arch Inst Pasteur Tunis, **70**:325-329

## **9. AGRADECIMIENTOS**



## AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero agradecer a mis directores Manuel Sánchez Moreno, Clotilde Marín Sánchez y M<sup>a</sup> José Rosales Lombardo la oportunidad que me han brindado al integrarme en su grupo de investigación. Muchas gracias por todo lo que me habéis enseñado y por la confianza que habéis depositado en mí para la realización de este trabajo.

A mi familia, en especial a mi madre, a mi hermano y a mi tía Encarna por creer siempre en mí y animarme en los momentos más difíciles. Todo este trabajo no hubiera sido posible sin vuestro apoyo incondicional. Y con muchísimo cariño a mi padre, que seguro se sentiría muy orgulloso de mí. Muchísimas gracias.

A Mario, por estar siempre a mi lado apoyándome, animándome y sacando todo lo bueno de mí. Por su paciencia infinita conmigo y su plena confianza en mí.

A todos mis amigos que de una forma u otra han compartido conmigo esta etapa de mi vida. Gracias por estar siempre ahí y hacerme tan feliz, sin vosotros el día a día sería mucho más difícil.

A mis compañeros de laboratorio con los que he compartido muy buenos momentos y gracias a vosotros todo este trabajo ha sido mucho más ameno.

A todas las personas que de una manera u otra forman parte de este trabajo de investigación.

**A todos, muchas gracias.**





