

# ESTUDIO COMPARATIVO DE PRUEBAS SEROLÓGICAS PARA EL DIAGNÓSTICO DE LA LEISHMANIASIS VISCERAL CANINA: NOTA TÉCNICA

## Comparative Study of Serological Test for the Diagnosis of Canine Visceral Leishmaniasis: Technical Note

Marlyn H. Romero<sup>1\*</sup>, Myriam C. López<sup>2</sup>, María C. Echeverry<sup>2</sup> y Favio Rivas<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Salud Animal, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad de Caldas. Calle 65 #26-10, Manizales, Caldas, Colombia. Telefax: 8781516. E-mail: marlyn.romero@ucaldas.edu.co, <sup>2</sup>Laboratorio de Parasitología- Departamento de Salud Pública, Facultad de Medicina, Universidad Nacional de Colombia, <sup>3</sup>Departamento de Salud Pública, Facultad de Medicina, Universidad Nacional de Colombia.

### RESUMEN

El objetivo del presente estudio consistió en comparar la concordancia entre los resultados obtenidos por las técnicas IFI, ELISA y Western Blot en 72 sueros caninos procedentes de siete municipios de la zona endémica de leishmaniasis visceral zoonótica (LVZ) del departamento del Tolima (Colombia). Se utilizó como antígeno la cepa colombiana de *Leishmania infantum* MHOM/CO/CL044B para IFI, ELISA y WB, y el antígeno rK39 para una prueba de ELISA disponible comercialmente. Se encontró que la concordancia entre las diferentes técnicas comparadas fue menor del 16% ( $k < 16\%$ ), lo que sugiere que las pruebas no son consistentes y por lo tanto, no son aceptables como método de diagnóstico en el presente estudio. La baja asociación de las pruebas serológicas utilizadas en el diagnóstico de *L. infantum* sugiere que es necesario desarrollar estudios que permitan establecer un algoritmo de pruebas diagnósticas en el país para confirmar el estado real de la infección en los animales y de esta forma orientar eficientemente los recursos de salud pública destinados para el control de la enfermedad.

**Palabras clave:** ELISA, IFI, leishmaniasis visceral zoonótica, western blot.

### ABSTRACT

The goal of present study was to compare the agreement between the results obtained by ELISA, IFI and WB tests in 72 canine serums from the South of the Tolima Department (a vis-

ceral leishmaniasis endemic area). The Colombian *Leishmania infantum* MHOM/CO/CL044B strain was used as antigen for ELISA, IFI and WB test, and the rK39 antigen for the commercial ELISA test. The agreement among the compared techniques was smaller than 16% ( $k < 16\%$ ), suggesting that the tests are not consistent and therefore not acceptable as a diagnostic tool in this study. The low association between the serological tests used in diagnosing *Leishmania infantum* suggested the need for further studies aimed at establishing an algorithm for diagnostic tests in Colombia for confirming the real state of the animals' infection and thereby efficiently orientating public health resources allocated for controlling visceral leishmaniasis.

**Key words:** ELISA, IFI, western blot, zoonotic visceral leishmaniasis.

### INTRODUCCIÓN

Tradicionalmente los métodos de control de la leishmaniasis visceral zoonótica (LVZ) han incluido: el tratamiento de las personas afectadas, la disminución de la densidad del vector, y la identificación y eliminación de caninos (*Canis familiaris*) infectados [3]. En lo referente a esta última estrategia, se ha señalado que el control de los caninos no ha logrado disminuir drásticamente la enfermedad en el hombre en algunas regiones, debido a la baja sensibilidad y especificidad de algunas pruebas diagnósticas utilizadas para la identificación de animales infectados [4, 16]. Para el diagnóstico de la LVC es fundamental el empleo de pruebas diagnósticas eficientes, que no subestimen la incidencia, ni la prevalencia de la enfermedad, y que permitan además obtener resultados confiables,

que minimicen las reacciones falsas positivas y la reacción cruzada con otros agentes patógenos [3, 6, 14, 19].

El objetivo del presente estudio consistió en la comparación de pruebas serológicas para el inmunodiagnóstico de la LVC en estudios de campo en Colombia, que permitan sugerir una herramienta diagnóstica específica, para ser aplicada en la identificación de animales positivos como medida de control en zonas endémicas de la enfermedad.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Sueros.** El estudio se desarrolló usando setenta y dos sueros caninos que fueron recolectados en los municipios del departamento del Tolima: Coyaima, Natagaima, Purificación, Coello, Ataco y Ortega, zona localizada dentro del foco de transmisión de LVZ en Colombia. La toma de muestras de sangre se efectuó por venopunción cefálica.

**Inmunofluorescencia-indirecta.** La técnica fue desarrollada siguiendo la metodología descrita por Corredor y col. [8]. Como antígeno se emplearon promastigotes en fase metacíclica de *L. infantum* cepa MHOM/COL/CL-044B cultivados en medio bifásico NNN y replicados para la obtención de cultivos en masa en medio Schneider's (Sigma) suplementado con 15% de suero fetal bovino. Se consideraron como títulos seropositivos aquellos  $\geq 1:32$  [8].

**Western Blot.** La prueba de Western blot se adaptó a partir de la metodología descrita por Laemmli U. [15] y Towbin y col. [21]. Para la preparación del antígeno se emplearon promastigotes de *L. infantum* cepa MHOM/COL/CL-044B en fase estacionaria, mantenidos en medio líquido Schneider's (Sigma, Saint Louis, Missouri, EUA) a una concentración de  $10^6$  parásitos por mL. Los parásitos fueron lisados por ciclos de congelación en nitrógeno líquido y descongelación en agitación constante. Para la electroforesis del antígeno se usó el sistema SDS-PAGE (Sodium-Dodecyl-Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis), el cual se llevó a cabo en condiciones reductoras-denaturantes en geles de poliacrilamida a una concentración del 12%. Las proteínas separadas fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa (tamaño del poro 0,22  $\mu\text{m}$ , HAWP 304 FO, Millipore, Bedford, MA). Las membranas fueron bloqueadas con Tris 0,5M, NaCl 2M, Metanol, HCl 12N y 5% de leche descremada durante una hora a temperatura ambiente. Los sueros fueron diluidos 1:200 en una solución de Tris-HCl 0,5 M pH 6,8, SDS 10% y 0,1% de azul de bromofenol y se agregó el conjugado anti IgG canina (Sigma Lote 073K4846) diluido 1:20.000 en solución bloqueadora de sitios inespecíficos de unión (Tris 0,5M, NaCl 2M, Tween 20 y leche descremada al 5%), incubando en agitación constante durante una hora a temperatura ambiente. Se lavó cinco veces con PBS-T durante 5 minutos y a continuación se lavó con solución activadora de la fosfatasa pH 9,8 (Tris 0,5M pH 10,  $\text{MgCl}_2$  0,1M) y  $\text{H}_2\text{O}_2$ . El color de la reacción fue revelado con 4 cloro-1-naftol (Sigma) incubando a temperatura ambiente durante 15 minutos. La reacción se detuvo

con agua destilada. Se consideró WB como positivo cuando en ensayos por triplicado, el suero de los caninos evaluados, reaccionaba a la altura de pesos moleculares entre 14 kD y 116 kD, según lo descrito por Vargas [22].

**Ensayo Inmunoenzimático-ELISA.** La prueba de ELISA se llevó a cabo siguiendo la metodología descrita por Pappas y col. [18] y las recomendaciones descritas por Vega y col. [23]. Para la obtención del antígeno se emplearon promastigotes de *L. infantum* cepa MHOM/COL/CL-044B en fase estacionaria, mantenidos en medio líquido Schneider's (Sigma) a una concentración de  $10^6$  parásitos por mL. Se consideraron como sueros positivos aquellos que mostraron valores de absorbancias iguales o mayores de 0,421.

**ELISA con antígeno recombinante.** Se utilizó el kit KalazarDetect™L-MRA ELISA system for canine, kit elaborado por InBios internacional (Seattle, EUA). El procedimiento se realizó de acuerdo a las indicaciones del fabricante, con diluciones de los sueros de 1:50. Se consideraron como positivos los sueros con densidades ópticas iguales o mayores que 0,323.

**Análisis Estadístico.** Se construyó una base de datos en la hoja de cálculo EXCEL 6,0 para la validación estadística de los resultados. La concordancia de las pruebas se efectuó con el test de Kappa usando el programa WIN EPISCOPE Versión 2,0.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La frecuencia de seropositividad anti-*Leishmania* establecida por cada una de las pruebas diagnósticas IFI, ELISA, kit KalazarDetect™L-MRA y WB, fue de 41,6% (30/72), 47,2% (34/72), 40,27% (29/72), 22,2% (16/72), respectivamente, TABLA I. Estos hallazgos contrastan con lo informado por Fernández y col. [11], quienes hallaron en muestreos realizados en diferentes regiones de Colombia, seropositividad entre el 3,8%, en el departamento de Sucre y 17,2% en regiones sub-urbanas del departamento del Huila.

Al comparar los resultados positivos detectados por las cuatro pruebas diagnósticas evaluadas en el estudio, se observó que presentan una baja concordancia, identificando un número diferente de animales seropositivos (TABLA I). Así mismo, se estableció una débil correlación entre ellas, al presentar índices de Kappa muy bajos ( $k < 16\%$ ).

La discordancia de los resultados obtenidos por las técnicas diagnósticas ELISA, WB e IFI que emplearon como antígeno la cepa colombiana, se podría explicar al hecho de haber utilizado antígenos obtenidos por métodos diferentes, teniendo en cuenta que en las dos primeras pruebas se emplearon antígenos solubles y en la tercera antígenos de superficie, por lo tanto, las pruebas diagnósticas pueden identificar un grupo distinto de epítopes [13, 14]. Se sugiere además, que esta baja concordancia se puede deber a la variabilidad y bajos valores de sensibilidad y especificidad de las técnicas IFI y ELI-

**TABLA I**  
**RESUMEN DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS CON LAS CUATRO DIFERENTES TÉCNICAS DIAGNÓSTICAS/**  
**SUMMARY OF THE OBTAINED RESULTS WITH THE FOUR DIFFERENT SEROLOGICAL ASSAYS**

|       | IFI |    | ELISA |    | WB |    | KIT |    |
|-------|-----|----|-------|----|----|----|-----|----|
|       | +   | -  | +     | -  | +  | -  | +   | -  |
| IFI   |     |    |       |    |    |    |     |    |
| +     | 30  | 0  |       |    |    |    |     |    |
| -     | 0   | 42 |       |    |    |    |     |    |
| ELISA |     |    |       |    |    |    |     |    |
| +     | 17  | 13 | 34    | 0  |    |    |     |    |
| -     | 17  | 25 | 0     | 38 |    |    |     |    |
| WB    |     |    |       |    |    |    |     |    |
| +     | 5   | 25 | 9     | 25 | 16 | 0  |     |    |
| -     | 11  | 31 | 7     | 31 | 0  | 56 |     |    |
| KIT   |     |    |       |    |    |    |     |    |
| +     | 13  | 17 | 16    | 18 | 7  | 9  | 29  | 0  |
| -     | 16  | 26 | 13    | 25 | 22 | 34 | 0   | 43 |

**TABLA II**  
**CONCORDANCIA CALCULADA CON EL ÍNDICE DE KAPPA (K) ENTRE LAS DIFERENTES PRUEBAS/**  
**CALCULATE AGREEMENT WITH KAPPA INDEX (K) BETWEEN THE DIFFERENT TESTS.**

| Prueba Diagnóstica | Prueba Diagnóstica | Índice   | Valor | (IC)*              |
|--------------------|--------------------|----------|-------|--------------------|
| 1                  | 2                  | $\kappa$ | P     |                    |
| IFI                | ELISA              | 0,158    | 0,018 | (-0,0157 - 0,257 ) |
|                    | WB                 | -0,102   | 0,084 | (-0,398 - 0,194)   |
|                    | KIT                | 0,0526   | 0,163 | (-0,179 - 0,284)   |
| ELISA              | WB                 | 0,082    | 0,103 | (-0,212 - 0,378)   |
|                    | KIT                | 0,1294   | 0,066 | (-0,104 - 0,363)   |
| WB                 | KIT                | 0,034    | 0,187 | (-0,244 - 0,3138)  |

\*  $\alpha = 0,05$

SA (<60%) [22], en donde el primer parámetro puede permitir una sobreestimación de la infección y su baja especificidad puede favorecer la presencia de resultados falsos positivos, debido a la reacción cruzada con otros patógenos [5, 7, 9, 14], aspecto que no fue evaluado en el presente estudio. Estas características pueden llevar al sacrificio de un número desconocido de animales no infectados y la presencia de animales infectados no detectados, que se convierten en fuentes de infección para la población canina y humana [20].

De otra parte, al comparar las técnicas ELISA usando antígeno completo colombiano y el kit comercial con antígeno recombinante, se observa una concordancia baja ( $k=0,12$ ) (TABLA II), que puede deberse a que los valores de sensibilidad y especificidad de ELISA están ampliamente influenciadas por el antígeno usado para su desarrollo [2, 10, 17]. Es importante además tener en cuenta que, los antígenos crudos son derivados de promastigotes cultivados *in vitro* y consisten en una amplia variedad de antígenos somáticos y componentes de superficie [2,10], que en el presente caso no han sido suficientemente

caracterizados y purificados, factor que podría explicar la baja asociación entre las pruebas diagnósticas evaluadas.

En la prueba de WB se identificaron fracciones antigénicas de 14 y 29 kDa, las cuales ya habían sido descritas en Colombia por Vargas [22]. Las bandas de bajo peso molecular como la de 14 kDa, observada frecuentemente en los caninos incluidos en el estudio, han sido definidas como potencialmente diagnósticas en fases tempranas de la LVZ, cuando los animales son negativos o presentan bajos niveles de anticuerpos por medio de otras técnicas. Esta proteína de 14 kDa ha sido identificada como una proteína nuclear denominada p 14 [1, 16]. Como persiste por muchos años, es posible usarla para evaluar la resolución de la enfermedad [12].

Se ha reportado que el uso de un sólo antígeno, tanto en los estudios de tamizaje y confirmación de la infección, puede incrementar la proporción de resultados falsos positivos, particularmente en los casos de baja prevalencia, siendo importante considerar la necesidad de estandarizar antígenos recombi-

nantes específicos para fortalecer los programas de control y establecer un algoritmo de pruebas diagnósticas en el país para confirmar el estado real de la infección en animales natural y experimentalmente infectados, como lo han reportado otros investigadores en Colombia [22, 23].

## CONCLUSIONES

Teniendo en cuenta que desde la óptica de la salud pública es fundamental la vigilancia epidemiológica activa de la leishmaniasis canina, como un indicador de riesgo potencial para la población humana y como soporte de las medidas de control de los reservorios, se hace necesario contar con pruebas serológicas precisas. La baja asociación de las pruebas serológicas IFI, ELISA y WB usando el antígeno colombiano de *L. infantum* cepa MHOM/COL/CL-044B, sugiere que es prioritario desarrollar estudios posteriores, que evalúen diferentes epítopes y establecer un algoritmo de pruebas diagnósticas para confirmar el estado real de la infección en animales naturalmente infectados, aspecto fundamental para orientar las políticas y recursos de salud pública tendientes al control de la enfermedad.

## AGRADECIMIENTO

Los autores quieren expresar su agradecimiento a la Secretaría Departamental de Salud del Tolima, Colombia, por el financiamiento de esta investigación y a la Maestría en Ciencias Biológicas de la Universidad del Tolima.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] AISA, J.; CASTELLEJO, S.; GALLEGU, M.; FISA, R.; RIERA, M.; COLMENARES, M.; TORRAS, S.; ROURA, X.; SENTIS, J.; PORTUS, M. Diagnostic potential of western blot analysis of sera from dogs with Leishmaniasis in endemic areas and significance of the pattern, **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 58(2): 154-159. 1998.
- [2] ALMEIDA, M.; JESUS, E.E.; ALVES, L.C.; BERNE, M.E.; ATTA, A.M. Clinical and serological aspects of visceral leishmaniasis in northeast Brazilian dogs naturally infected with *Leishmania chagasi*. **Vet. Parasitol.** 127: 227-232. 2005.
- [3] ALVES, W.A.; BEVILACQUA, P.D. Quality of diagnosis of canine visceral Leishmaniasis in epidemiological surveys: an epidemic in Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, 1993-1997. **Cad. Saude Publ.** 20(1): 259-265. 2004.
- [4] ASHFORD, D.; DAVID, J. R.; FREIRE, M.; DAVID, R.; SHERLOCK, I.; EULALIO, M. D. C.; SAMPAIO, D. P.; BADARO, R. Studies on Control of Visceral Leishmaniasis: Impact of dog control on canine and human visceral Leishmaniasis in Jacobina, Bahía, Brazil. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 59(1): 53-57. 1998.
- [5] BARROUIN-MELO, S.; LARANGEIRA, D.; FILHO, F.; TRIGO, J.; SILVA, J.F.; FRANKE, C.; AGUIAR, P.; DOS SANTOS, W.; CARVALHO, L. Can spleen aspirations be safely used for the parasitological diagnosis of canine visceral leishmaniasis? A study on asymptomatic and polysymptomatic animals. **The Vet. J.** 171: 331-339. 2004.
- [6] BRAZ, R.; NASCIMENTO, E.; MARTINS, D.; WILSON, M.; PEARSON, R.D.; REED, S.; JERONIMO, S. The sensitivity and specificity of *Leishmania infantum* recombinant k39 antigen in the diagnosis of American Visceral Leishmaniasis and in differentiating active from subclinical infection, 2002. **The Am. Soc. of Trop. Med. and Hyg.** 67(4): 344-348. 2002.
- [7] CABRERA, M. A.; PAULA, A.; CAMACHO, L.A.; MARZOCHI, M.C.; XAVIER, S.C.; DA SILVA, A.V.; CANSEN, A.M. Canine Visceral Leishmaniasis in Barra de Guaratiba, Rio de Janeiro, Brazil: Assesment of risk factors. **Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo.** 45(2): 79-83. 2003.
- [8] CORREDOR, A.; ALVAREZ, C.A.; AGUDELO, C.A.; BUENO, M.; LÓPEZ, M.C.; CÁCERES, E.; REYES, P.; DUQUE, S.; GUALDRÓN, L.E.; SANTACRUZ, M. Prevalence of *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania infantum* infection and risk factors in a Colombian indigenous population. **Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo.** 41(4): 229-234. 1999.
- [9] DE PAULA, A.; DA SILVA, A.; FERNADES, O.; JANSEN, A. The use of immunoblot analysis in the diagnosis of canine visceral leishmaniasis in an endemic area of Rio de Janeiro. **J. of Parasitol.** 89: 832-836. 2003.
- [10] DO ROSARIO, E.; GENERAO, O.; FRANCA-SILVA, D.A.; COSTA, R.; MAYRINK, W.; BARBOSA, A.; CARNEIRO, M. 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. 2005.
- [11] FERNÁNDEZ, J.; CHARRY, T.; BELLO, F.; ESCOBAR, J.; LOZANO, C.; AYALA, M.; NICHOLLS, R.; VARGAS J.; MONCADA, L.; CORREDOR, A.; LÓPEZ, M.C. Prevalencia de Leishmaniasis Visceral canina en municipios de Huila Colombia. **Rev. Salud Pub.** 4(3): 278-285. 2002.
- [12] FERNÁNDEZ-PÉREZ, F. J.; MÉNDEZ, S.; DE LA FUENTE, C.; GÓMEZ-MUÑOZ, M. T.; CUQUERELLA, M.; ALUNDA, J.M. Short report: Improved diagnosis and follow-up of canine Leishmaniasis using amastigote-based indirect immunofluorescence. **The Am. Society of Trop Med. and Hyg.** 61(4): 652- 653. 1999.
- [13] FERROGLIO, E.; CENTARO, E.; MIGNONE, W.; TRISCIUOGLIO, A. Evaluation of an ELISA rapid device for the serological diagnosis of *Leishmania infantum* infection in dog as compared with immunofluorescence assay and Western blot. **Vet. Parasitol.** 144: 162-166. 2007.

- [14] INIESTA, L.; FERNÁNDEZ-BARREDO, S.; BULLE, B.; GÓMEZ, T.; PIARROUX, R.; GÁLLEGO, M.; ALUNDA, J.; PORTÚS, M. Diagnostic techniques to detect Cryptic Leishmaniasis in dogs. **Clin. and Diag. Lab. Immunol.** 9(5): 1137-1141. 2002.
- [15] LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature.** 227: 680-685. 1970.
- [16] MARY, C.; LAMOUREUX, D.; DUNAN, S.; QUILICI, M. Western blot analysis of antibodies to *Leishmania infantum* antigens: potential of the 14 kD and 16-kD antigens for diagnosis and epidemiologic purposes. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 47: 764-771. 1992.
- [17] PALATNIK-DE-SOUSA, C. B.; WANIA, R.; FRANCA-SILVA, J.C.; DA COSTA, R. T.; REIS, B. A.; PALATNIK, M.; MAYRINK, W.; GENARO, O. Impact of canine control on the epidemiology of canine and human visceral Leishmaniasis in Brazil. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 65(5): 510:517. 2001.
- [18] PAPAS, M.G.; HAJKOWSKI, J.W., HOCKMEYER, W.T. Dot enzyme-linked immunosorbent assay (Dot-ELISA): A microtechnique for the rapid diagnosis of visceral leishmaniasis. **J. Immunol.** Meth 1983: 64: 205-214.
- [19] REITHINGER, R.; QUINNELL, R.; ALEXANDER, B.; DAVIES, C. Rapid detection of *Leishmania infantum* in dogs: comparative study using immunochromatographic Dipstick Test, Enzyme-linked immunosorbent Assay, and PCR. **J. of Clin. Microbiol.** 7: 2352– 2356. 2002.
- [20] SOLANO-GALLEGO, L.; MORELL, P.; ARBOIX, M.; ALBEROLA, J.; FERRER, LL. Prevalence of *Leishmania infantum* infection in dogs living in an area of canine Leishmaniasis endemicity using PCR on several tissues and serology. **J. of Clin. Microbiol.** 2: 560–563. 2001.
- [21] TOWBIN, H.; STAHELIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrilamide gels to nitrocellulose sheets: procedures and some applications. **Proceedings of National Academy of Sciences, USA.** 76: 4350-4354. 1979.
- [22] VARGAS, J. Inmunodiagnóstico de la leishmaniosis visceral zoonótica en caninos infectados con *Leishmania (leishmania) infantum*. Universidad Nacional de Colombia. Tesis de Grado. 97pp. 2005.
- [23] VEGA, J.C.; LÓPEZ, M.C.; VARGAS, J.; AYALA, M.; NICHOLLS, S.; BELLO, F.; FERNANDEZ, J.; ESCOBAR, J. Estandarización de la prueba de ELISA para el inmunodiagnóstico de la Leishmaniosis visceral canina. **I Encuentro de Investigadores en Salud Pública de la Universidad Nacional de Colombia.** Instituto de Salud Pública. Bogotá, 08/29 -30. Bogotá, Colombia. 80-90pp. 2003.