

Epidemiología y diagnóstico de Leishmaniosis canina por E.I.A. indirecto

Angel Aguilera Martínez*
Herminia Aguinaga Zapata**
Luis Enrique Martín Otero*

RESUMEN

Debido al aumento de casos de Leishmaniosis canina en nuestro país, hemos realizado un estudio epidemiológico de dicha enfermedad, determinando su distribución en las diferentes regiones de nuestra geografía, así como su incidencia según la estación del año, aptitud del perro, edad y sexo.

La puesta a punto de la técnica de E.I.A. indirecto para el diagnóstico de esta enfermedad, se efectuó con el fin de procesar un mayor número de muestras simultáneamente, y obtener resultados más objetivos.

PALABRAS CLAVE:

Epidemiología. Leishmaniosis.
Enzimo Inmuno Adsorción Indirecto.
Diagnóstico.

SUMMARY

Due to the growing number of canine leishmaniosis cases in our country. A epidemiologic study of this disease was carried out in order to determine its geographic distribution as well as other factor influence such as dog aptitude, age, sex and seasonal variations.

The development of indirect E.I.A. technique for the diagnosis of the disease was accomplished in order to be able to process an increasing number of samples simultaneously with more objective results.

KEY WORDS:

Epidemiology. Leishmaniosis.
Indirect Enzyme Immuno Adsorption.
Diagnostic.

1. INTRODUCCION

La Leishmaniosis es una enfermedad parasitaria, producida por un protozoo del Phylum Protozoa, familia Trypanosomatidae, y género Leishmania, que en sus distintas especies puede infestar al hombre y otros animales domésticos, sobre todo al perro, el cual actúa como reservorio de las diferentes especies.

Tiene una distribución prácticamente mundial afectando, sobre todo, a los países de la Ribera Mediterránea, Centro y Suramérica, Africa Oriental y algunas regiones Asiáticas (Fig. 1).

La transmisión se realiza a través de vectores, insectos hematófagos del género Phlebotomus, o especies afines, aunque también se ha discutido el posible papel de otros vectores pasivos como garrapatas o pulgas de los perros.

En España la enfermedad se desarrolla en toda la geografía excepto en la cornisa Cantábrica y Galicia, aumentando la incidencia en las Regiones Mediterráneas (Fig. 2).

En cuanto a la distribución estacional, la mayor incidencia se presenta en primavera-verano y la menor en invierno (Fig. 3 y gráfico n.º 1), coincidiendo como es lógico con los ciclos de mayor actividad biológica de los vectores intermedios.

Por aptitudes, los perros de guarda y defensa, como Pastor Alemán, Dogo, Dobermann, Boxer, Mastin, etc. son los que nos dan un mayor número de

positividades, siendo ostensiblemente menor en los perros de caza estudiados, Podenco, Setter, Pointer, Perdiguero, así como en los perros de compañía, Caniche, Collie, Terrier, Mestizos, etc. (Fig. 4), debido en el caso de estos últimos al menor riesgo de exposición a las picaduras de los vectores, que los animales que desarrollan una actividad en el campo.

Dentro del grupo de guarda y defensa, hemos observado una mayor incidencia de la enfermedad en los perros de pelo corto, como es lógico.

El estudio de la incidencia según edades ha sido más incompleto por falta de datos, si bien no parece haber diferencias significativas entre los distintos grupos de edades, exceptuando a los menores de un año, donde la prevalencia de positivos es claramente más pequeña (Fig. 5).

* Cte. de San. (Veterinaria).

** Farmacéutica Civil.

Servicio de Microbiología y Análisis Clínicos.
Centro Militar de Veterinaria, Madrid.

En relación al sexo, no hemos observado diferencias tangibles entre machos y hembras afectando a ambos por igual (Fig. 6).

Con motivo de este estudio epidemiológico, así como al incremento de casos que están apareciendo en nuestro país, hemos optado por poner a punto una técnica que fuera lo suficientemente sensible, específica, rápida y que procesara un gran número de muestras a la vez, para así poder tener un control más fidedigno y llegar a un diagnóstico precoz para el control de dicha enfermedad.

La técnica que reúne estas características es el E.I.A. indirecto que a continuación desarrollamos.



Figura 1

2. MATERIAL Y METODOS

2.1. Material y reactivos

a) Material de Laboratorio

- Placas de poliestireno de 96 pocillos de fondo plano para ELISA. BIOREBA.
- Pipetas multicanal Microtiter S8/200-DYNATECH.
- Sonicator VIBRA-CELL.
- Lavador de placas DENLEY WELL-WASH III.
- Membrana de diálisis MEDICELL INTERNACIONAL.
- Fotocolorimetro TITRTEK MULTISKAN PLUS MKII.

b) Soluciones química

- Tampón fosfato:
 - Cloruro sódico 7,650 g.
 - Fosfato disódico 0,724 g.

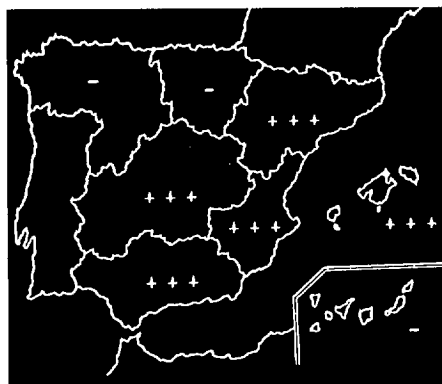


Figura 2

- Fosfato monopotásico 0,210 g.
- Agua destilada hasta 1 l.
pH = 7,2
- Tampón carbonato:
 - Carbonato sódico 1,59 g.
 - Bicarbonato sódico 2,93 g.

- Agua destilada hasta 1 l.
pH = 9,6
- Tampón citrato:
 - Acido cítrico 2,14 g.
 - Fosfato disódico 3,54 g.
 - Agua destilada hasta 400 ml.
pH = 5
- Solución de PBS-Tween:
 - PBS 1 l.
 - Tween 20 0,5 ml.
- Solución de frenado:
 - Acido Sulfúrico d = 1,84 83,5 ml.
 - Agua destilada hasta 1 l.
- Solución cromógena:
 - Ortofenilendiamina (OPD) 12 mg.
 - Tampón citrato 15 ml.
 - Peróxido de hidrógeno (30%) 12 µl.

2.2. Métodos

2.2.1. Obtención del antígeno de Leishmanias

Partimos de una cepa de Leishmania Donovanii Infantum, mantenida en nuestro laboratorio desde 1984. Esta cepa se conserva en congelación profunda en Nitrógeno líquido a -192°C en un medio que contiene un 90% de suero fetal de Ternera y un 10% de DMSO. En estas condiciones la cepa se mantiene durante años. Para su empleo, hay que proceder a su descongelación rápida y lavado con PBS estéril para eliminar el DMSO y su actividad tóxica sobre el parásito.

Para conseguir una buena revitalización es conveniente, según nuestras experiencias, realizar 1 ó 2 pases en un agar que contenga un 20% de sangre desfibrinada de conejo, manteniendo

DISTRIBUCION ESTACIONAL		I	P	V	O
POSITIVOS 158	N.º	11	44	56	47
	%	6,96	27,84	35,44	29,74
NEGATIVOS 420	N.º	17	154	128	121
	%	4,04	36,66	30,47	28,80
SOBRE EL % TOTAL DE ANALISIS	(+) <ul style="list-style-type: none"> — 11 — 44 — 56 — 47 	1,90	7,61	9,6	8,13
		17	154	128	121
	(-) <ul style="list-style-type: none"> — 17 — 154 — 128 — 121 	2,94	26,64	21,14	20,93

Figura 3

cada pase 4 ó 5 días a 25°C. Cuando el crecimiento es óptimo procedemos a sembrar en medio sintético 199, al cual se le añade un 10% de suero de ternera, un 0,5% de una mezcla de antibióticos que contiene 5000 UI/ml de penicilina y 5000 µg/ml de streptomina, ajustando el pH a 7,2 con bicarbonato sódico.

Este cultivo se mantiene a 25°C durante 5 ó 6 días, observando el crecimiento de las Leishmanias macroscópicamente por la formación de copos blancos que tienden a sedimentarse, y microscópicamente mediante la observación de los frascos de cultivo en microscopio invertido.

Cuando se tiene un buen crecimiento, lo cual se produce a los 5 ó 6 días, se centrifugan a 1000-1200 r.p.m. durante unos 30'. El sedimento de Leishmanias se lavan 3 ó 4 veces con PBS para eliminar todos los restos de medio de cultivo, centrifugando siempre como máximo a 1000-1200 r.p.m. durante 30', ya que a un mayor número de r.p.m. hay alteraciones morfológicas del parásito, como rotura de fragelos, membranas.

El sedimento de Leishmanias procedente del último lavado lo resuspendemos en una pequeña cantidad de PBS y procedemos a su ruptura sonicándolas con 4 ciclos de 30" de intensidad media en baño de hielo, observando microscópicamente su desintegración.

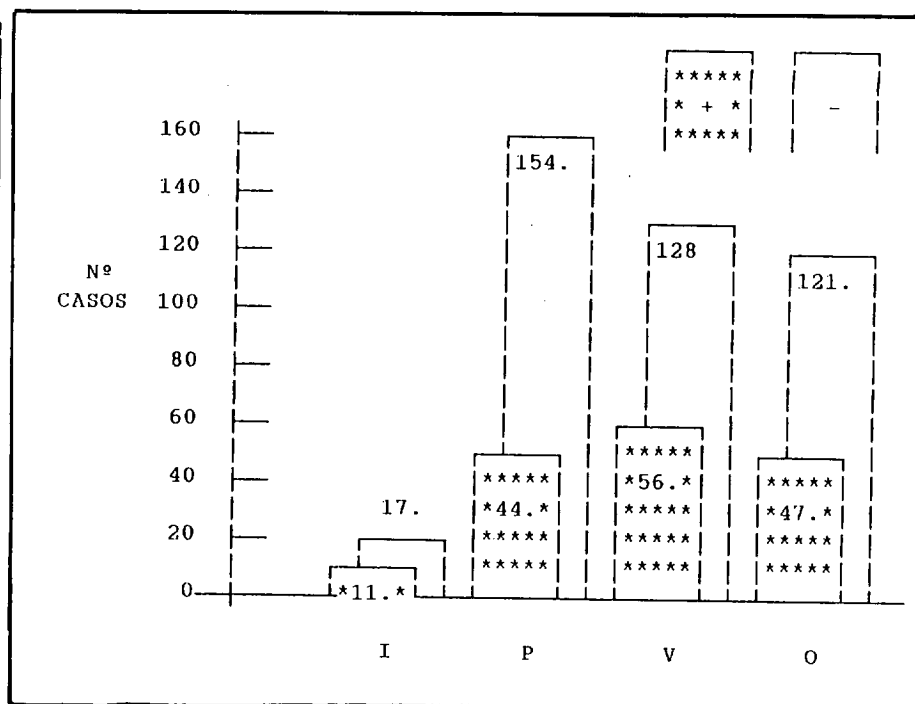


Gráfico 1

Una vez rotas las Leishmanias hacemos una última centrifugación que ya puede ser de 2500-3000 r.p.m., durante unos 15', quedándonos con el sobrenadante o fracción soluble, haciendo una diálisis del mismo frente a agua destilada durante 24 horas.

Este antígeno soluble es el que utilizamos para la sensibilización de las placas, según el método descrito a continuación, realizando previamente

una determinación de proteínas totales por el método de Lowry o bien por el método de Bradford.

2.2.2. Fijación del antígeno a las placas y optimización de técnica

Una vez obtenido el antígeno se procede a su titulación para determinar la cantidad óptima de antígeno a añadir en cada pocillo realizando al mismo tiempo la titulación del conjugado.

Para estas titulaciones utilizamos sueros testigos positivos y negativos diluidos al 1/100 en PBS Tween, haciendo diluciones tanto del antígeno como del conjugado, viendo a que concentración de antígeno y de conjugado, las diferencias de D.O. entre suero positivo y negativo son mayores. Vemos que la mayor diferencia se produce cuando hay una concentración de antígeno de 2 µg/pocillo y el conjugado va diluido al 1/500, utilizando como conjugado el RAD/PO de Nordic.

Una vez hechas las titulaciones sensibilizamos las placas añadiendo a cada pocillo 2 µg de antígeno diluidos en 100 µl de tampón carbonato. Las placas se mantienen durante 24 h. a 4°C, lavándolas a continuación con una solución de PBS-Tween 20 al 0,05%, realizando 4 lavados de 300 µl por pocillo.

Al comienzo del estudio, después de fijado el antígeno, añadíamos a cada pocillo 150 µl de BSA al 5%, para tapizar el espacio no ocupado por el antígeno y evitar así posteriores fijaciones inespecíficas, pero al realizar un ELISA sobre estas placas, observamos que algunos sueros nos daban muy positivos por ELISA, mientras que por

	N.º DE ANIM.	% SOBRE EL N.º TOTAL	+	%	-	%
GUARDA Y DEFENSA	378	65,39	172	45,50	206	54,49
CAZA	131	22,66	20	15,26	111	84,73
CIA-OTROS	69	11,93	7	10,1	62	89,85

Figura 4

EDADES (años)	N.º DE ANIM.	% SOBRE EL N.º TOTAL	+	%	-	%
< 1	37	16,08	5	13,51	32	86,48
1 y 2	72	31,30	22	30,55	50	69,44
3, 4 y 5	55	23,91	21	38,18	34	61,81
> 5	66	28,69	24	36,36	42	63,63
TOTAL	230	100	51	25,21	172	74,78

Figura 5

I.F.I. esos mismos sueros eran positivos débiles, por lo que pensamos que el BSA podía interferir en el color debido a la presencia de anticuerpos anti-BSA, posiblemente debidos a la vacunación de perros con vacunas obtenidas en cultivos de tejidos, con lo cual el BSA aumentaba el color de fondo en lugar de disminuirlo, que era el efecto buscado.

Para comprobar esto, se fijaron unas placas poniendo en unas columnas antígeno más BSA y en otras solamente BSA. Realizamos un ELISA sobre estas placas y se observó que el color que desarrollan muchos sueros en los pocillos en los que solamente se puso BSA es muy elevado, lo cual puede inducir a error.

Por todo esto, decidimos no tapizar con BSA y simplemente poner en unas columnas el antígeno diluido en tampón carbonato y en otras solamente tampón carbonato; de esta manera el color de fondo de los sueros en las columnas que únicamente llevan tampón carbonato disminuye hasta límites aceptables (0-0,1) D.O.

De todas formas la sensibilización de las placas se realizó de tal manera que en las columnas impares se puso el antígeno diluido en tampón carbonato y en las pares se puso sólo tampón carbonato para poder restar el color de fondo de cada suero aunque este no fuera muy elevado.

Para poder establecer una D.O. a partir de la cual se pudiera considerar que el suero de un perro es positivo frente a Leishmaniasis, hallamos las D.O. de 400 sueros negativos al 1/100 por I.F.I., tomados aleatoriamente. Según la distribución normal de frecuencias, el valor $x \pm 20$, nos da un error probable del 4,6% estando dentro de este valor, un 95,4% de las observaciones negativas, y tomando $x \pm 30$, la probabilidad de que una lectura negativa entre dentro de ese valor es del 99,7%, con un error probable de únicamente el 0,3%, como vemos en el gráfico n.º 2.

Con arreglo a estas consideraciones estadísticas, decidimos que todos aquellos sueros que nos den una densidad óptica mayor de $x + 30$ son positivos, y aquellos cuya D.O. sea menor de $x + 30$ son negativos.

El motivo de emplear los sueros diluidos al 1/100 es porque tomamos como referencia el título I.F.I. al 1/100 para considerar positivos y negativos.

No obstante, con aquellos sueros cuya D.O. estaban muy próximas tanto por arriba como por abajo al valor $x + 30$ se realizó una I.F.I. con diferentes diluciones del suero, para establecer exactamente hasta que título I.F.I. es positivo el suero problema.

	TOTALES	+	%	-	%
MACHOS	440	122	27.72	318	72.27
HEMBRAS	138	36	26.08	102	73.91

Figura 6

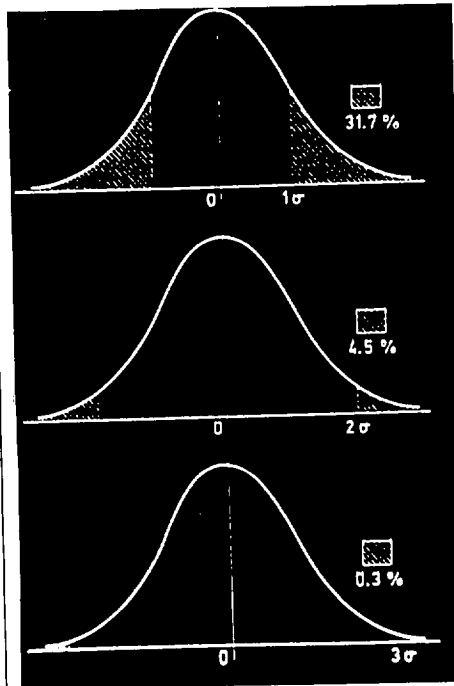


Gráfico 2

3. TECNICA

Las placas sensibilizadas se guardan a -20°C , conservándose durante varios meses a esta temperatura, descongelando cada día únicamente el número de placas necesarias según la cantidad de sueros problemas que hubiese que realizar.

La reacción principal consta de los siguientes pasos:

- Se hacen diluciones de los sueros al 1/100 en PBS-Tween.
- Se añaden 100 μl de cada dilución al pocillo correspondiente.
- Poner varios controles positivos, negativos, de fondo y blanco por cada placa.
- Incubar a 37°C durante 30', tapando

bien la placa con parafilm para evitar evaporaciones.

- Lavar con PBS-Tween, 4 lavados de 300 μl /pocillo.
- Se añaden 100 μl por pocillo de conjugado diluido al 1/500 en PBS-Tween.
- Incubar 30' a 37°C volviendo a tapar la placa con parafilm.
- Realizar otros 4 lavados de 300 μl /pocillo.
- Se añaden 150 μl /pocillo de sustrato cromógeno, cuya composición es la siguiente:

- * Tampón citrato-15 ml.
- * Ortófenilendiamina (OPD)-12 mg.
- * Peróxido de hidrógeno al 30%-12 μl .

- Esperar 5 min. a que se desarrolle color, guardando la placa en la oscuridad.
- Parar la reacción añadiendo 100 μl /pocillo de ácido sulfúrico 3 N.

La lectura de las placas se realizó con fotocolorímetro multicanal MULTISKAN PLUS MK II a 450 nm.

4. RESULTADOS Y CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos nos dan un valor de $x + 30$ de 0,553 considerando como positivos, como hemos explicado anteriormente, a aquellos cuya D.O. superasen este valor. En general se ha observado una estrecha correlación entre los sueros positivos por técnicas de Inmunofluorescencia y la técnica descrita, encontrándose que los sueros positivos con títulos I.F.I. superiores a 1/400, tenían por E.I.A. todos D.O. elevadas, mientras que los sueros negativos por I.F.I. nos daban unas D.O. por E.I.A. bajas. La utilización de E.I.A. es aconsejable por su facilidad para tratar un elevado número de sueros simultáneamente, así como su mayor objetividad, y sensibilidad para discriminar los valores dudosos.

BIBLIOGRAFIA

- 1.—ARAUJO, F.G. & MAYRINK, W. "FLUORESCENT antibody test in visceral Leishmaniasis. Rev. Inst. Med. Trop. (S. Paulo) 10:41-45. 1968.
- 2.—BRAY, S.R. "Leishmania" Annual Review of Microbiology. 28: 189-217. 1974.
- 3.—RANQUE, J. y Col. "Diagnostic immunologique de la Leishmaniose viscerale" Ann. Soc. Belge. Med. Trop. 55(5):579-584. 1975.
- 4.—TESOURO DIEZ, M.A. "Aspectos clínicos y laboratoriales del Diagnóstico de la Leishmaniosis canina. Estudio epizootológico en la provincia de Madrid." Tesis doctoral Universidad Complutense de Madrid 1984".
- 5.—RODRIGUEZ SANCHEZ M. y Col. "Leishmaniosis Canina" AVEPA. 1:11-18 1981.
- 6.—JIMENEZ MAZZUCHELLY F. "Leishmaniosis Canina. Diagnóstico inmunológico. Adaptación y valoración del ELISA indirecto." Tesis doctoral Universidad Complutense de Madrid. Facultad de Veterinaria. 1987.
- 7.—SANCHEZ VIZCAINO-MARIANO CAMBRA. "Técnicas inmunoenzimáticas en Patología animal y vegetal. INIA. 1981.