Prevalencia de la infección por *Leishmania* spp. en un área periurbana de Altigracia de Orituco, estado Guárico, Venezuela

Irma F. Agrela* & Erlinda Sánchez

Leishmania infantum es el agente etiológico de la leishmaniasis visceral (LV). Sin embargo, tanto en el Viejo Mundo como en el Nuevo Mundo (América Central), este protozooario ha sido involucrado en casos de leishmaniasis cutánea atípica (LCA). Evidencias clínicas, parasitológicas, moleculares y entomológicas han demostrado que una situación similar está ocurriendo en un área periurbana de Altigracia de Orituco (Guárico, Venezuela). Con la finalidad de contribuir al entendimiento de este nuevo escenario epidemiológico, se realizó un estudio transversal en el cual se determinó la reactividad a la prueba de leishmanina [Leishmanin skin test (LST)] y la seroprevalencia a antígenos crudos de *Leishmania* spp. y al antígeno específico rK39 mediante la prueba de ELISA en una muestra de ocho casos de LCA detectados en el periodo 1997-2000, en sus cohabitantes (n=15) y en una muestra de 233 de la comunidad igualmente expuestas a riesgo. La dermoprevalencia resultó ser de 31,6% (67/212). El 28,8% (67/233) resultó positivo a la prueba de ELISA usando promastigotas de *L. infantum* (= *L. chagasi*) y 13,3% (31/233) poseían anticuerpos anti-*L. braziliensis*. Así mismo, la prueba de ELISA usando el antígeno rK39 resultó positiva en uno de los ocho casos estudiados y en dos de sus cohabitantes; así como también en 13,7% (32/233) de los individuos residentes en la comunidad. Los resultados obtenidos indican la circulación de especies del subgénero *Leishmania* y del subgénero *Viannia* en el área en estudio y que la presencia de anticuerpos anti-*Leishmania* en general se encontró asociada a la edad y al tiempo de residencia en la zona.

Palabras clave: leishmaniasis cutánea atípica, ELISA, rK39, prueba de leishmanina, Venezuela.

INTRODUCCIÓN

Leishmania infantum puede ocasionar una gran variedad de cuadros clínicos que van desde infecciones subclínicas hasta leishmaniasis visceral (LV) caracteriza por pérdida de peso, fiebre, anemia y hepatoesplenomegalia y puede ser fatal si no es tratada en forma adecuada. En el continente Europeo, Medio Oriente y Centroamérica, esta especie de *Leishmania* es responsable tanto de leishmaniasis visceral (LV) como de una forma de infección cutánea no ulcerativa denominada leishmaniasis cutánea atípica (LCA) (Gramiccia *et al.*, 1987; Zeledón *et al.*, 1989; Ponce *et al.*, 1991; Frank *et al.*, 1993; Hatam *et al.*, 1997; Noyes *et al.*, 1997; Belli *et al.*, 1999). Tanto en Centroamérica

como en el Mediterráneo, las cepas de *L. infantum* que causan LV y LCA parecen ser genéticamente similares (Noyes *et al.*, 1997; Belli *et al.*, 1999; Mauricio *et al.*, 1999) lo cual sugiere que el parásito no es un factor determinante en el curso clínico de la infección. Diferentes estudios han sugerido que el curso de la infección puede estar influido por una combinación compleja de factores, entre los que destacan la constitución genética y el estado inmunológico del hospedador (Campos-Ponce *et al.*, 2005; Rodríguez *et al.*, 2007) así como también por factores ambientales (Convit *et al.*, 2005).

De manera similar, en Altigracia de Orituco, estado Guárico, Venezuela desde 1996 se vienen registrando casos de leishmaniasis cutánea (LC) con lesiones no ulcerativas, pequeñas y muy infiltradas por monocitos y linfocitos; el agente responsable ha podido mantenerse en el laboratorio a través de pasas

Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de Carabobo-Sede Aragua; Maracay, Venezuela

*Autor de correspondencia: agrelairma@yahoo.es

en animales susceptibles y los estudios moleculares realizados a los parásitos aislados a partir de los casos de LC reportados en el área demuestran que tanto *L. infantum* (= *L. chagasi/L. infantum*) (De Lima *et al.*, 2009) como *L. braziliensis* (Rodríguez *et al.*, 1998) están presentes en Altagracia de Orituco.

Por otra parte, la zona difiere ecológicamente de los focos de leishmaniasis cutánea conocidos en Venezuela, los cuales se ubican en áreas boscosas con elevada humedad relativa; los estudios entomológicos realizados en el área, muestran la predominancia de *Lutzomyia evansi* (42,3%) y *Lutzomyia longipalpis* (22,2%) (Feliciangeli, 1999; De Lima *et al.*, 2009) vectores de *L. infantum* (= *L. chagasi*) en Venezuela (Feliciangeli *et al.*, 1999) y Colombia (Corredor *et al.*, 1989; Travi *et al.*, 1990; Morrison *et al.*, 1995) con muy escasa presencia de los vectores probados de *L. mexicana* y *L. brasiliensis* tales como *Lutzomyia ovallesi*, *Lutzomyia gomezi* y *Lutzomyia panamensis* (De Lima *et al.*, 2009).

El propósito de este trabajo fue determinar la prevalencia de la infección por *Leishmania* spp. entre los pobladores del área periurbana de Altagracia de Orituco, Edo. Guárico-Venezuela, donde se detectaron esos casos atípicos, para un mejor entendimiento de la dinámica de la transmisión de la leishmaniasis cutánea en este foco. El protocolo del estudio, en los aspectos éticos, fue aprobado por la Comisión de Bioética y Bioseguridad del Fondo Nacional de Ciencia y Tecnología (FONACIT).

MATERIALES Y MÉTODOS

Área de estudio

El estudio fue realizado en la localidad de Altagracia de Orituco, estado Guárico, Venezuela (9°52'N; 66°10'W, 429 m snm); ecológicamente se encuentra ubicada en una zona de transición entre el bosque seco tropical y muy seco tropical (Ewel & Madriz, 1968).

Para 1997, la tasa de incidencia anual de leishmaniasis cutánea en Altagracia de Orituco, estado Guárico resultó de 75 casos por cada 100.000 habitantes, la mayoría de los casos reportados eran procedentes del Barrio Peña de Mota. La población de este sector, de aproximadamente 2.000 habitantes, fue convocada a una reunión, en la cual se les informó sobre la enfermedad, su modo de transmisión, prevención y

control así como también sobre el propósito del estudio a realizar. Las personas enroladas o sus representantes legales voluntariamente accedieron a participar en el mismo a través de consentimiento escrito.

Grupos de estudio

La muestra objeto de estudio estuvo compuesta por tres grupos: Grupo (1): 8/11 casos diagnosticados clínicamente como leishmaniasis cutánea 'atípica', por criterios clínico-epidemiológicos, confirmados parasitológicamente y tratados por el Servicio de Dermatología Sanitaria entre 1997-2000, los cuales pudieron ser recuperados cuando se realizó este estudio. Grupo (2): 15 miembros de las familias de estos casos (cohabitantes), quienes compartían el domicilio con los primeros. Grupo (3): 233 individuos que habitaban en las casas cercanas a las de los pacientes, todos mayores de cinco años y no incluidos en los dos primeros grupos.

Después de aplicar una encuesta para recolectar datos demográficos y sobre el conocimiento del vector, se realizó el examen dermatológico en busca de lesiones y/o cicatrices, se realizó la prueba de leishmanina (LST) y se tomó una muestra de sangre de aproximadamente 3 mL por punción venosa utilizando material estéril descartable. Cada muestra sanguínea fue colocada en un tubo de ensayo sin anticoagulante, debidamente rotulado y luego centrifugado a 2.000 rpm durante 10 minutos. Las muestras séricas obtenidas fueron almacenadas a -20°C hasta el momento de la realización de las pruebas serológicas.

Prueba de la leishmanina (LST)

El antígeno fue preparado por el personal del Instituto de Biomédicina usando promastigotas de *Leishmania pifanoi* los cuales fueron mantenidos en medio mínimo esencial suplementado con 2,2 g/L de bicarbonato, 2,5% de suero fetal bovino, 100.000 ng/L de estreptomycin y 100.000 U/L de penicilina. Cuando los promastigotas alcanzaron la fase logarítmica de crecimiento fueron recogidos y lavados dos veces con solución buffer fosfato salino 0,02 M pH 7,4 (BFS) estéril, luego resuspendidas en BFS a razón de 6,5 x 10⁶ promastigotas/mL. La suspensión obtenida fue esterilizada en autoclave (120°C y 15lb durante 15 minutos) y finalmente, envasada en ampollas estériles, sometidas a análisis bacteriológicos y micológicos y almacenadas a 4°C hasta su uso.

Ambos, antígeno y control (diluyente, BFS estéril) fueron aplicados intradérmicamente, a razón 0,1 mL en la cara anterior de cada antebrazo. El diámetro de la induración en el lugar de la inoculación se midió 48-72 horas después de la aplicación. La prueba se consideró positiva si el promedio de los dos diámetros perpendiculares de la induración resultasen mayores o iguales a 5 mm (WHO, 1996).

Estudio serológico

Las muestras séricas fueron analizadas mediante tres pruebas de ELISA junto con sueros controles. Los sueros controles negativos fueron obtenidos a partir de personas sanas las cuales no habían visitado zonas endémicas de leishmaniasis mientras que el suero de pacientes con diagnóstico clínico y parasitológico de leishmaniasis visceral y leishmaniasis cutánea fueron utilizados como controles positivos.

Las pruebas de ELISA fueron desarrolladas usando promastigotas fijadas con formol al 1,5% perteneciente a *L. infantum* (MHOM/BR/PP75) y *L. braziliensis* (MHOM/BR/LTB300) y el antígeno recombinante rK39. El procedimiento que se siguió para el desarrollo de las pruebas de ELISA fue el propuesto por Badaró *et al.* (1996) y Qu *et al.* (1994). Las pruebas de ELISA fueron consideradas positivas si la densidad óptica resultasen iguales o superiores al valor promedio obtenido por sueros control negativos más tres desviaciones estándar. Estos valores correspondieron a 0,209 y 0,288 para los antígenos de promastigotas de *L. infantum* y *L. braziliensis* respectivamente y 0,273 para el antígeno rK39.

Análisis de los resultados

Los datos recopilados fueron analizados usando los programas estadísticos Epi info versión 6.04b y Stata. El porcentaje de individuos positivos (casos) y negativos (controles) a las pruebas realizadas fue comparado en relación con las variables en estudio (sexo, edad y tiempo de residencia en la zona). Para medir el grado de asociación entre variables continuas y los resultados de las pruebas inmunológicas se utilizó la prueba t de Student de dos colas. Finalmente, las variables categóricas fueron analizadas utilizando la razón de productos cruzados (OR).

RESULTADOS

Estudio de casos y cohabitantes

Desde 1997 hasta el 2000 se registraron 11 casos de LC en el barrio Peña de Mota, de los cuales se pudieron recuperar ocho casos (72,7%). Este grupo de personas estuvo constituido por tres hombres y cinco mujeres con edades comprendidas entre 7 y 35 años; todos ellos resultaron positivos a la LST y negativos a las pruebas de ELISA realizadas, con excepción de una niña de 7 años, quien resultó positiva a la prueba de ELISA usando el antígeno recombinante rK39. El grupo de cohabitantes estuvo constituido por cuatro (26,7%) hombres y 11 (73,3%) mujeres con edades comprendidas entre siete y 75 años. Cinco (33,3%) de ellos resultaron positivos a la LST; mientras que cuatro (26,6%) resultaron positivos a la prueba de ELISA usando promastigotas de *L. infantum*, 20% (3/15) de ellos poseían anticuerpos anti-*L. braziliensis* y 13,3% (2/15) tenían anticuerpos anti-rK39. La Tabla I muestra las características demográficas y los resultados de las pruebas realizadas a estos dos grupos.

Estudio de prevalencia

De los 233 individuos que participaron en el estudio 94 (40,3%) eran de sexo masculino y 139 (59,7%) eran de sexo femenino; siendo la edad promedio de 25,1 años; con una edad mínima de 4 años y la edad máxima fue de 85 años. El 50% de las personas tenía menos de 18 años y el 75% tenía menos de 34 años.

Un total de 212 personas de la comunidad fueron evaluadas mediante la prueba de leishmanina (LST) (36,8% hombres y 63,2% mujeres) resultando una dermoprevalencia de 31,6% (67/212). De los 78 hombres evaluados mediante la LST, 20 resultaron positivos (25,6%); mientras que 35,1% (47/134) de las mujeres examinadas resultaron reactivas a la LST. La razón de productos cruzados (OR) resultó ser 1,56 (IC 95%; 0,85-2,91); no obstante, esta diferencia no resultó estadísticamente significativa ($P=0,156$). Al comparar los diferentes grupos etarios con aquellos que tenían edades inferiores a 10 años, se observó que los individuos con edades comprendidas entre 31 y 40 años son los que tienen mayores posibilidades de resultar positivos a la LST (OR= 7,5; IC 95%= 2,43-23,14; $P=0,001$). De igual manera, cuando se comparó la reactividad a la LST con el tiempo de residencia en

Tabla I. Características demográficas y resultados de las pruebas realizadas a los casos (1-8) y los cohabitantes (9-23) de leishmaniasis cutánea presentados durante el período 1997-2000 en el Barrio Peña de Mota, Altagracia de Orituco, estado Guárico.

Nº	Sexo	Edad	Tiempo de residencia en la zona	Ocupación	LST (mm)	ELISA L. inf*	ELISA L. b*	ELISA rK39
1	F	7	7	Estudiante	25	0,137	0,177	0,278
2	F	10	10	Estudiante	11	0,111	0,171	0,120
3	M	13	13	Estudiante	10	0,114	0,126	0,167
4	M	11	11	Estudiante	10	0,056	0,058	0,210
5	F	30	8	Ama de casa	16	0,165	0,240	0,095
6	F	9	9	Estudiante	20	0,102	0,081	0,073
7	F	23	23	Ama de casa	10	0,116	0,174	0,211
8	M	35	23	Otros	25	0,169	0,258	0,079
9	F	54	30	Del hogar	0	0,134	0,167	0,126
10	F	10	1	Estudiante	20	0,209	0,205	0,222
11	M	8	8	Estudiante	2	0,144	0,083	0,221
12	M	56	30	Agricultor	9	0,167	0,258	0,159
13	M	8	8	Estudiante	0	0,149	0,136	0,095
14	F	26	26	Del Hogar	11	0,117	0,099	0,163
15	F	70	70	Del Hogar	4	0,526	0,611	0,128
16	F	10	10	Estudiante	3	0,147	0,232	0,119
17	M	16	16	Estudiante	2	0,167	0,105	0,073
18	F	75	54	Del Hogar	15	0,649	0,793	0,307
19	F	8	8	Estudiante	3	0,116	0,198	0,211
20	F	15	8	Estudiante	0	0,235	0,329	0,187
21	F	11	8	Estudiante	3	0,120	0,136	0,190
22	F	14	14	Estudiante	3	0,100	0,139	0,222
23	F	7	7	Estudiante	25	0,137	0,177	0,278

*L. inf= *Leishmania infantum*; L.b= *L. braziliensis*

la zona con aquellos que tenían menos de 10 años en la comunidad, se observó que las personas que tienen entre 31 y 40 años de residencia en la localidad tenían 5,65 veces más posibilidades de resultar positivos a la LST (IC 95%=1,91-16,7; $P=0,002$), seguidos por los que tenían entre 21 y 30 años en la comunidad (OR=2,37; IC 95%= 1,00-5,61; $P=0,05$).

El 28,8% (67/233) de las muestras séricas examinadas resultaron positivas a la prueba de ELISA usando promastigotas de *L. infantum* y 13,3% (31/233) de los sueros examinados resultaron positivos a la prueba de ELISA usando promastigotas de *L. braziliensis* mientras que 13,7% (32/233) de los individuos examinados mostraron reactividad ante el antígeno rK39. La Tabla II muestra la seroprevalencia a la infección por *Leishmania spp* entre los pobladores de la comunidad según sexo, edad y tiempo de residencia en la zona.

El análisis estadístico de los datos serológicos, demostró que la seropositividad a *L. infantum* y *L. braziliensis* no estaba asociada significativamente al sexo ($P= 0,14$ y $P= 0,55$ respectivamente); pero sí con la edad y el tiempo de residencia en la zona. Cuando se analizó los diferentes grupos de edad se encontró que los individuos mayores de 40 años son los que tienen más posibilidades de ser seropositivos a estos antígenos (OR= 2,32; $P= 0,041$ para *L. infantum* y OR=25,9; $P=0,001$ para *L. braziliensis*); así mismo, se encontró que el promedio de edad de los individuos seropositivos a *L. infantum* fue de 30,8 años mientras que los individuos seropositivos a *L. braziliensis* tenían una edad promedio 46,8 años encontrándose que existe una diferencia de ocho años entre los individuos seronegativos y los seropositivos a *L. infantum* y una diferencia de 25 años entre los seronegativos y los seropositivos a *L.*

Tabla II. Seroprevalencia a la infección por *Leishmania* spp. en pobladores de un foco periurbano de leishmaniasis cutánea de Altagracia de Orituco, estado Guárico Venezuela

	ELISA <i>L. inf</i> N° (%)	ELISA <i>L. b</i> N° (%)	ELISA rK39 N° (%)
Sexo			
Masculino (n=94) a	32 (34,1)	11 (11,7)	14 (14,9)
Femenino (n=139)	35 (25,2)	20 (14,4)	18 (12,9)
Edad			
<10 años (n=62)a	22 (35,5)	2 (3,2)	11 (17,7)
11-20 (n=61)	14 (22,9)	6 (9,8)	5 (8,2)
21-30 (n=45)	5 (11,1) b	1 (2,2)	2 (4,4)
31-40 (n=24)	3 (12,5) b	3 (12,5)	5 (20,8)
>40 (n=41)	23 (56,1) b	19 (46,3) b	9 (21,9)
Tiempo de Residencia en la zona			
<10 años (n=80)a	27 (33,7)	5 (6,3)	13 (16,3)
11-20 (n=60)	10 (16,7) b	4 (6,7)	5 (8,3)
21-30 (n=45)	5 (11,1) b	1 (2,2)	2 (4,4)
31-40 (n=20)	7 (35,0)	7 (35,0) b	4 (20,0)
>40 (n=28)	18 (64,3) b	14 (50,0) b	8 (28,6)

a Categoría de referencia

b Estadísticamente diferente al comparar con la categoría de referencia

L. inf= *Leishmania infantum*; *L. b*= *L. braziliensis*

braziliensis; para ambos antígenos, las diferencias en el promedio de edad entre seropositivos y seronegativos resultaron estadísticamente significativas ($t= 2,92$; $P= 0,004$ para *L. infantum* y $t=25,04$; $P=0,001$ para *L. braziliensis*). En relación con el tiempo de residencia en la zona se observó que los individuos con más de 40 años de residencia en la zona son los que tienen más probabilidades de ser seropositivos tanto a *L. infantum* (OR=3,53; $P= 0,006$) como a *L. braziliensis* (OR=15,0; $P= 0,001$). El análisis de los datos demostró una diferencia de 7,5 y 20,1 años entre los individuos seropositivo y seronegativos la prueba de ELISA usando *L. infantum* y *L. braziliensis* respectivamente en relación con el tiempo de residencia en la zona, estas diferencias resultaron ser altamente significativa para ambos grupos ($t= 3,03$; $P= 0,003$ para *L. infantum* y $t=6,44$; $P=0,001$ para *L. braziliensis*); así los individuos seropositivos a *L. infantum* tenían un promedio de 26,7 años viviendo en la zona mientras que los individuos seropositivos a *L. braziliensis* vivían en la zona desde hace 38,8 años.

De los 233 individuos examinados 32 poseían anticuerpos específicos contra el antígeno rK39 (13,7%). En relación con los individuos seropositivos

a este antígeno, se encontró que 14,9% eran hombres (14/94) y 12,9% eran mujeres (18/139); la posibilidad de encontrar un individuo del sexo femenino entre los seropositivos a este antígeno fue 1,18 veces mayor que en el grupo masculino; sin embargo, esta diferencia no resultó ser estadísticamente significativa ($P=0,67$). Por otra parte, no se encontró diferencias estadísticamente significativas al comparar la edad ($t= 1,42$; $P= 0,16$) y el tiempo de residencia ($t=1,58$; $P=0,12$) con el resultado de la prueba de ELISA usando el antígeno rK39. Para ambas variables se observó una diferencia de cinco años entre los individuos seropositivos y los seronegativos este antígeno. Tampoco se encontraron diferencias significativas al analizar tanto los diferentes grupos de edad como las diferentes categorías del tiempo de residencia en la zona con la seropositividad al antígeno rK39; aún cuando, se observó que la razón de productos cruzados (OR) incrementa con la edad (OR= 0,4; 0,2; 1,2; 1,3) y con el tiempo de residencia en la zona (OR= 0,5; 0,2; 1,2; 2,1).

Los resultados obtenidos durante el análisis serológico de las 233 muestras examinadas en las tres pruebas de ELISA usando tres antígenos diferentes se muestran en la Tabla III. Es importante destacar que

ninguna de las muestras examinadas resultó positiva a los promastigotas de *L. braziliensis* y al antígeno rK39. Por otra parte, del total de personas positivas a la LST (n=67), 16 poseían anticuerpos anti-*Leishmania infantum* y 12 tenían anticuerpos anti-*L. braziliensis* mientras que nueve de ellos resultaron positivos a la prueba de ELISA usando el antígeno rK39.

DISCUSIÓN

La presencia de individuos positivos a las diferentes pruebas inmunológicas realizadas usando antígenos de *Leishmania* indica la circulación de este protozooario en la zona en estudio. Aunque los resultados obtenidos demuestran que la positividad a la LST y a las pruebas de ELISA llevadas a cabo no estaba asociada significativamente al sexo, se encontró asociación estadística entre la positividad a las diferentes pruebas inmunológicas con la edad y con el tiempo de residencia en la zona; sugiriendo que son los individuos de mayor edad y los que tienen mayor tiempo de residencia en la zona quienes tienen mayores probabilidades de infectarse con este protozooario. Esto es consistente con las observaciones de otros investigadores tanto en focos de leishmaniasis cutánea (Scorza *et al.*, 1983; Jorquera *et al.*, 1998) como de leishmaniasis visceral (Corredor *et al.*, 1989; Delgado *et al.*, 1998).

Adicionalmente, el análisis de los datos demostró que las personas más jóvenes y con menos tiempo de residencia en la zona tienen mayores probabilidades de ser seropositivas a los antígenos de *L. infantum* en comparación con las personas seropositivas a *L. braziliensis*, lo cual sugiere una exposición más temprana a los antígenos de *L. infantum*.

Por otra parte, el desarrollo de este estudio demostró que existe una elevada correspondencia entre la seropositividad a los promastigotas de *L. infantum* y *L. braziliensis* ya que de los 31 sueros que resultaron positivos a la prueba de ELISA usando promastigotas de *L. braziliensis* sólo tres personas resultaron negativas tanto a la prueba de ELISA usando promastigotas de *L. infantum* como a la prueba de ELISA con el antígeno rK39. Dicha correspondencia está relacionada con la existencia de antígenos de reacción cruzada entre ambas especies. Es un hecho ampliamente aceptado que las pruebas serológicas que usan como antígeno el parásito intacto o un lisado obtenido a partir de ellos tienen severas limitaciones en términos de especificidad y reproducibilidad (Badaró *et al.*, 1983; Harith *et al.*, 1986; Scott *et al.*, 1991). La especificidad de las pruebas serológicas para el diagnóstico de la Leishmaniasis se ha incrementado usando proteínas específicas derivadas del parásito; tales como la molécula rK39.

El potencial del antígeno rK39 en el serodiagnóstico de la leishmaniasis causada por *Leishmania* del complejo *donovani* ha sido ampliamente reportado y tanto su sensibilidad como especificidad en el diagnóstico de la LV ha sido señalada en diversos estudios (Reed *et al.*, 1990; Burns *et al.*, 1993; Qu *et al.*, 1994; Badaró *et al.*, 1996; Delgado *et al.*, 2001; Braz *et al.*, 2002; Carvalho *et al.*, 2003; Mandal *et al.*, 2008; Pedras *et al.*, 2008). Los resultados obtenidos demostraron la presencia de anticuerpos anti-rK39 entre los miembros de la comunidad evaluada y aunque se encontró que la seropositividad a rK39 no estaba asociada estadísticamente con el sexo, la edad, ni el tiempo de residencia en la zona, los resultados sugieren que los miembros de la comunidad evaluada independientemente del sexo, edad o tiempo de

Tabla III. Distribución de las 84 muestras seropositivas según la prueba de ELISA realizada a una muestra de 233 personas residentes en el Barrio Peña de Mota, estado Guárico; para el periodo 1997-2000, usando tres antígenos diferentes

Antígeno utilizado en la prueba de ELISA			Número de sueros positivos	%
Promastigotas de <i>L. infantum</i>	Promastigotas de <i>L. braziliensis</i>	Antígeno recombinante rK39		
-	-	+	14	6,0
-	+	-	3	1,3
+	-	-	29	12,4
+	-	+	10	4,4
+	+	-	20	8,6
+	+	+	8	3,4

residencia en el área se encontraban expuestos a la infección por *L. infantum*. Estos datos junto con los hallazgos recientemente publicados por De Lima *et al.* (2009), indican que esta especie de *Leishmania* es la responsable de las lesiones atípicas observadas en los casos de leishmaniasis cutánea reportados en la zona evaluada; tal como ocurre en Centroamérica (Zeledón *et al.*, 1989; Ponce *et al.*, 1991; Noyes *et al.*, 1997; Belli *et al.*, 1999).

Por otra parte, se ha señalado que existe una correlación positiva entre los niveles de anticuerpos anti-rK39 y la carga parasitaria en las personas afectadas lo cual indica que la positividad al rK39 está relacionada con infección activa (Singh *et al.*, 1995; Badaró *et al.*, 1996). Adicionalmente, Braz *et al.* (2002), encontró que los títulos de anticuerpo frente a este epítipo disminuyen significativamente con el tratamiento, esto sugiere que la prueba de ELISA usando el antígeno rK39 podría ser usada para predecir el curso de la infección y evaluar la efectividad de la terapéutica. En base a lo antes expuesto, la presencia de individuos seropositivos a este antígeno entre los miembros de la comunidad evaluada estaría en relación con infecciones recientes por *L. infantum* y aunque ningún caso de leishmaniasis visceral fue reportado en Altigracia de Orituco, estado Guárico durante la realización de este estudio, en diciembre de 2006 se confirmó un caso de leishmaniasis visceral procedente del área estudiada usando una prueba de ELISA con el antígeno rK39 (Archivos del Dpto. de Informática, Instituto de Biomédicina).

La predominancia de los vectores probados para *L. infantum* en el área evaluada, los hallazgos de De Lima *et al.* (2009) y los resultados aquí presentados permiten afirmar que los casos de leishmaniasis cutánea atípica fueron ocasionados por *L. infantum*, cuya transmisión en este foco estaría a cargo de *Lu. longipalpis* y/o *Lu. evansi*, y además la circulación de *L. braziliensis*, reportada previamente (Rodríguez *et al.*, 1998) posiblemente importada de la región de Guatopo (estado Miranda), limítrofe a Altigracia de Orituco (Pifano *et al.*, 1959).

AGRADECIMIENTOS

Los autores desean agradecer a los habitantes del Barrio Peña de Mota (Altigracia de Orituco, estado Guárico) por su valiosa colaboración durante el desarrollo de este estudio. Al Doctor Steven Reed quien

gentilmente cedió el antígeno recombinante rK39. A las Doctoras Urlich, M. y Zerpa O. del Instituto de Biomedicina (UCV, Caracas) por su orientación y la facilitación de los sueros controles y la leishmanina; al Sr. Arias F. y la Sra. Ramírez M. por su asistencia técnica durante las labores de campo y a la Doctora Martínez M. del Departamento de Parasitología (UC, Aragua) por su orientación durante el análisis de los resultados. Este trabajo fue financiado por la OPS/OMS aprobado durante la V Convocatoria del Programa de Pequeños Subsidios para la Investigación Operacional en Enfermedades Tropicales (TDR/OMS) N° ASC-00/00040-0.

Prevalence of infection by *Leishmania* spp. in a peri-urban area of Altigracia de Orituco, Guárico state, Venezuela

SUMMARY

Leishmania infantum is the etiological agent of the visceral leishmaniasis (VL). However, in the Old World as well in the New World (Central America), this protozoan has also been involved in cases of atypical cutaneous leishmaniasis (ACL). Clinical, molecular and entomological evidences have demonstrated that a similar situation is happening in a peri-urban area of Altigracia de Orituco (Guárico state, Venezuela). With the purpose of contributing to the understanding of such an epidemiological scenario, a cross-sectional study was carried out using the leishmanin skin test (LST) and screening for the seroprevalence to crude antigens of *Leishmania* spp. and rK39 by means of the ELISA test in cases of ACL reported in the period 1997-2000 (n=8), among their co-inhabitants (n=15) and in a randomly selected sample of 233 people. The seroprevalence was 31.6% (67/212); 28.8% (67/233) were positive to the ELISA test using promastigotes of *L. infantum* (= *L. chagasi*) and 13.3% (31/233) had antibodies anti-*L. braziliensis*. In addition, the test of ELISA using the antigen rK39 was positive in one out of the eight cases studied and in two out of their co-inhabitants; as well as in 13.7% (32/233) of the inhabitants of the community. The results obtained in this epidemiological study indicate the circulation of species of the sub-genus *Leishmania* as well as of the subgenus *Viannia*. The presence of antibodies anti-*Leishmania* in general was associated to the age and the time of residence in the zone.

Key words: atypical cutaneous leishmaniasis, ELISA, rK39, leishmanin, Venezuela

REFERENCIAS

- Badaró R., Reed S. G. & Carvalho E. M. (1983). Immunofluorescent antibody test in American Visceral Leishmaniasis: sensitivity and specificity of different morphological forms of two leishmania species. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **32**: 480-484.
- Badaró R., Benson D., Eulálio M., Freire M., Cunhas S., Netto E., Pedral-Sampaioi D., Madureira C., Burns J., Houghton R. & Reed S. (1996). rK39 a cloned antigen of *Leishmania chagasi* that predicts active visceral Leishmaniasis. *J. Inf. Dis.* **173**: 758-761.
- Belli A., García D., Palacios X., Rodríguez B., Valle S., Videá E., Tinoco E., Marín F. & Harris, E. (1999). Widespread atypical cutaneous Leishmaniasis caused by *Leishmania* (L) *chagasi* in Nicaragua. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **61**: 380-385.
- Braz R., Nascimento E., Martins D., Wilson M., Pearson R., Reed S. & Jerónimo S. (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. J. Trop. Med. Hyg.* **67**: 344-348.
- Burns J., Shreffler W., Benson D., Ghalib H., Badaró R. & Reed S. (1993). Molecular characterization of kinesin-related antigen of *Leishmania chagasi* that detects specific antibody in African and American Visceral Leishmaniasis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **90**: 775-779.
- Campos-Ponce M., Ponce C., Ponce E. & Maingon R. D. C. (2005). *Leishmania chagasi/infantum*: further investigations on *Leishmania* tropisms in atypical cutaneous and visceral leishmaniasis foci in Central America. *Exp. Parasitol.* **109**: 209-219.
- Carvalho S., Lemos E., Corey R. & Dietze R. (2003). Performance of recombinant K39 antigen in the diagnosis of Brazilian visceral leishmaniasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **68**: 321-324.
- Convit J., Ulrich M., Pérez M., Hung J., Castillo J., Rojas H., Vizquez A., Araya L. N. & De Lima H. (2005). Atypical cutaneous leishmaniasis in Central America: possible interaction between infectious and environmental elements. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **99**: 13-17.
- Corredor A., Gallego J., Tesh R., Morales A., Ferro C., Young D., Kreutzer R., Boshel J., Palau M., Caceres E. & Pelaez D. (1989). Epidemiology of visceral leishmaniasis in Colombia. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **40**: 480-486.
- Delgado O., Feliciangeli M., Gómez B., Alvarado J., García L. & Bello C. (1998). The reemergence of American visceral leishmaniasis in an old focus in Venezuela. I. Present situation of humans and canine infection. *Parasite.* **5**: 317-323.
- Delgado O., Feliciangeli M., Coraspe V., Silva S., Perez A. & Arias J. (2001). Value of dipstick based on recombinant rK39 antigen for differential diagnosis of American visceral leishmaniasis from other sympatric endemic diseases in Venezuela. *Parasite.* **8**: 355-357.
- De Lima H., Rodríguez N., Feliciangeli MD., Barrios MA., Sosa A., Agrelá I., Sánchez E. & Lopez O. (2009). Cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania chagasi/Le. infantum* in an endemic area of Guarico State, Venezuela. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **103**: 721-726.
- Ewel J. & Madriz A. (1968). *Zonas de vida de Venezuela. Memoria explicativa sobre el mapa ecológico*. Editorial Sucre. Caracas, Venezuela.
- Feliciangeli M., Rodríguez N., De Guglielmo Z. & Rodríguez A. (1999). The reemergence of American visceral leishmaniasis in an old focus in Venezuela. II. Vectors and Parasites. *Parasite.* **6**: 113-120.
- Feliciangeli M. (1999). Estudio integral de focos de Leishmaniasis visceral en Venezuela: Los vectores. Informe técnico del proyecto PCEE-VEN-96-002-006. World Bank, Convenio Gobierno de Venezuela. Caracas, Venezuela.
- Frank C., Hadziandoniou M., Pralong F., Garifallou A. & Rioux J. (1993). *Leishmania tropica* and *Leishmania infantum* responsible for cutaneous leishmaniasis in Greece: sixteen autochthonous cases. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **87**: 184-185.

- Gramiccia M., Gradoni L. & Pozio E. (1987). *Leishmania infantum sensu lato* as agent of cutaneous leishmaniasis in Abruzzi region (Italy). *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **81**: 235-237.
- Harith A., Kolk A. Y. & Kager P. (1986). A simple and economical direct agglutination test for serodiagnosis and sero-epidemiological studies of visceral leishmaniasis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **80**: 583-587.
- Hatam G., Hossein S. & Ardehali S. (1997). Dermatropic isolates of *Leishmania infantum* in Iran. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **91**: 440.
- Jorquera A., Ledezma E., De Sousa L., Garcia A., Sanchez J., Zerpa J., Gonzalez R. & O'Daly J. (1998). Epidemiologic characterization of American cutaneous leishmaniasis in an endemic region of eastern Venezuela. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **58**: 589-593.
- Mandal J., Khurana S., Dubey M. L., Bhatia P., Varma N. & Malla N. (2008). Evaluation of direct agglutination test, rK39 test and ELISA for the diagnosis of visceral leishmaniasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **79**: 76-78.
- Mauricio I. L., Howard M. K., Stothard J. R. & Miles M. A. (1999) Genomic diversity in *Leishmania donovani* complex. *Parasitology.* **119**: 237-246.
- Morrison A., Ferro C., Pardo R., Torres M., Devlin B., Wilson M. & Tesh R. (1995). Seasonal abundance of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) at an endemic focus of visceral leishmaniasis in Colombia. *J. Med. Entomol.* **32**: 538-548.
- Noyes H., Chance M., Ponce C., Ponce E. & Maingon R. (1997). *Leishmania chagasi*: genotypically similar parasites from Honduras cause both visceral and cutaneous leishmaniasis in humans. *Exp. Parasitol.* **85**: 264-273.
- Pedras M. J., De Gouvêa Viana L., De Oliveira E. J. & Rabello A. (2008). Comparative evaluation of direct agglutination test, rK39 and soluble antigen ELISA and IFAT for diagnosis of visceral leishmaniasis. *Trans R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **102**: 172-178.
- Pifano C., Alvarez A., Ortiz I., Dager C. & Scorza J. (1959). *Phlebotomus panamensis* Shannon 1926, transmisor de la leishmaniasis tegumentaria en Venezuela. *Gac. Med. Caracas.* **4**: 229-235.
- Ponce C., Ponce E., Morrison A., Cruz A., Krutzer R., McMahon-Pratt D. & Neva F. (1991). *Leishmania donovani chagasi*: New clinical variant of cutaneous leishmaniasis in Honduras. *Lancet.* **337**: 67-70.
- Qu J., Zhong L., Masoom-Yasinzai M., Abdur-Rab M., Aksu H., Reed S., Chang K., & Gilman-Sachs A. (1994). Serodiagnosis of Asian leishmaniasis with a recombinant antigen from the repetitive domain of *Leishmania kinesin*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **88**: 543-545.
- Reed S., Shreffler W., Burns J., Scott J., Orge M., Ghalib H., Sidding M. & Badaró, R. (1990). An improved serodiagnostic procedure for visceral leishmaniasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **43**: 632-639.
- Rodríguez N., De Lima H., Barrios M., De Guglielmo Z., Rodríguez A., Cardona M., Barrios R. & Barker D. (1998). *Genetic variability within L. (V.) braziliensis (Venezuelan strains) isolated from patients with cutaneous leishmaniasis*. Proceedings of IX International Congress of Parasitology. 859-867. Tokyo, Japón.
- Rodríguez B., Beatty R., Belli A., Barreto A., Palacios X., Marin F. & Harris E. (2007). Atypical cutaneous leishmaniasis cases display elevated antigen-induced interleukin-10. *Parasite Immunol.* **29**: 277-282.
- Scorza J., Valera M., Moreno E. & Jaimes R. (1983). Encuesta epidemiológica sobre leishmaniasis cutánea. Un estudio en Mérida, Venezuela. *Bol. Of. Sanit. Panam.* **95**: 118-133.
- Scott J., Shreffler W. & Ghalib H. (1991). A rapid and simple diagnostic test for active visceral leishmaniasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **44**: 272-277.
- Singh S., Gilman-Sachs, A., Chang K-P & Reed S. G. (1995). Diagnostic and prognostic value of rK39 recombinant antigen in indian leishmaniasis. *J. Parasitol.* **81**: 1000-1003.

- Travi B., Velez J., Brutus L., Segura I., Jaramillo C. & Montoya J. (1990). *Lutzomyia evansi* (Diptera: Psychodidae) an alternative vector of *Leishmania chagasi* in a Colombian focus of visceral leishmaniasis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **84**: 676-677.
- WHO (1996). *Manual of visceral leishmaniasis*. WHO/LEISH/96.40. Geneva, Switzerland.
- Zeledón R., Hidalgo H., Vásquez A. & Urbina A. (1989). Atypical cutaneous leishmaniasis in semiarid region of north-west Costa Rica. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **83**: 786.

Recibido el 27/02/2009
Aceptado el 22/06/2009