

ESTUDIO SEROLÓGICO DE *Leishmania infantum* EN PERROS DE NORESTE UGANDA

Máster Universitario en Zoonosis y Una Sola Salud

Universidad Autònoma de Barcelona

Curso académico 2018-2019



Jorge Duarte Rodríguez

Tutoras: Laia Solano Gallego y Maria Magdalena Alcover Amengual



Foto: *Queen Elisabeth National Park*. Fuente extraída de: <https://utopica.travel/lugares/africa/queen-elizabeth/>

ESTUDIO SEROLÓGICO DE *Leishmania infantum*
EN PERROS DEL NORESTE DE UGANDA

Este trabajo se realizó como trabajo final del Máster Universitario en Zoonosis y Una Sola Salud de la Universidad Autónoma de Barcelona, durante el curso académico 2018-2019. El contenido del mismo lo realizó el estudiante Jorge Duarte Rodríguez bajo la supervisión y tutoría de las Dr. Laia Solano Gallego y Dr. Maria Magdalena Alcover Amengual.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quisiera expresar mi gratitud hacia mis tutoras, la Dr. Laia Solano Gallego y la Dr. Maria Magdalena Alcover Amengual por ofrecerme la orientación necesaria para realizar este trabajo y por su tiempo dedicado en la corrección del mismo. Agradecer al veterinario clínico de la asociación Daktari Jesús Muro por la recogida de muestras y datos proporcionado a este trabajo, y al investigador Dr. Oscar Cabezon de la UAB por facilitarnos la información necesaria para llevar a cabo el estudio. Asimismo, especial agradecimiento a Marta Baxarias por su completa disponibilidad y ayuda constante durante todo el proceso, y finalmente a Lourdes Alarcón por su incalculable ayuda en el laboratorio.

ÍNDICE

Lista de acrónimos y abreviaturas

1. Resumen	1
2. Introducción	2
2.1 El parásito - Revisión histórica	2
2.2 Ciclo biológico y transmisión	3
2.3 Manifestaciones clínicas	4
2.4 Diagnóstico	7
2.5 Tratamiento	9
3. Objetivos	9
4. Materiales y métodos	9
4.1 Seroprevalencia de leishmaniosis canina en el noroeste de Uganda mediante muestras de suero	9
4.2 Evaluación de los papeles Whatman como alternativa a las muestras de suero	14
5. Resultados	17
5.1 Análisis descriptivo de los sueros inactivados de perros estudiados	17
5.2 ELISA en muestras en papel Whatman	18
6. Discusión	24
7. Conclusión	27
8. Bibliografía	28
9. Anexos	34

LISTA DE ACRÓNIMOS Y ABREVIATURAS

ADN: Ácido desoxirribonucleico

CAE: Conducto auditivo externo

CC: Condición corporal

C/E: Castrado/esterilizado

C/P: Canino por propietario

DAT: Direct agglutination test

EDTA: *Ethylenediaminetetraacetic acid*

ELISA: *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*

FAST: Prueba de aglutinación rápida

H₂SO₄: Ácido sulfúrico

IFAT: Prueba de anticuerpos de inmunofluorescencia

IFI: Inmunoflorescencia indirecta

LC: Leishmaniosis cutánea

LMC: Leishmaniosis mucocutánea

LV: Leishmaniosis visceral

LV: Leishmania visceral

MC: Manifestaciones clínicas.

OD: Densidad óptica

PBS: *Phosphate buffered saline*

PCR: *Polymerase chain reaction*

QENP: *Queen Elizabeth National Park*

1. RESUMEN

La Leishmaniosis visceral humana causada por *Leishmania donovani* es una enfermedad antroponótica endémica en muchos países de África oriental. Sin embargo, se desconoce si animales domésticos o salvajes pueden tener un papel en esta infección. El principal objetivo de este estudio fue detectar anticuerpos frente a *Leishmania infantum* en sueros de perros del noroeste de Uganda mediante ELISA indirecto y evaluar los factores de riesgo. Para ello, se analizaron muestras de suero del año 2017 y muestras de suero impregnadas en papel de filtro Whatman nº3 del 2018. El trabajo de campo se llevó a cabo en los Parques Nacionales de *Elizabeth Queen (QENP)*, *Mgahinga*, *Budongo* y en los distritos de *Kasese*, *Kapchorwa*, *Buliisa*, *Masindi*, *Kibingo*, *Hoima* y *Kanungu*. Las muestras de suero del 2017 fueron todas negativas. La seroprevalencia global obtenida de las muestras impregnadas en papel filtro fue del 50.8%, siendo los distritos de Karusandara y Kilembe los que obtuvieron una mayor proporción de perros seropositivos. Entre los datos de frecuencia analizados, no se encontró ninguna asociación estadísticamente significativa entre las variables estudiadas. Si bien, se observaron valores estadísticamente significativos con respecto a porcentajes de positividad registrados por localidad y condición corporal de los perros muestreados. Los resultados del presente estudio sugieren el posible carácter endémico de la leishmaniosis canina en el noreste de Uganda. No obstante, estudios futuros son necesarios para determinar la prevalencia real de esta infección y su correación con otras tripanosomiasis en todo el país y evaluar el verdadero rol de los perros como reservorios a la leishmaniosis en esta área geográfica.

2. INTRODUCCIÓN

La *Leishmania* es un parásito protozoo que pertenece a la familia *trypanosomatidae*, responsable de la Leishmaniosis tanto humana como animal. Según los últimos estudios realizados globalmente, esta parasitosis en personas se distribuye en 98 países de todos los continentes, excepto Australia, y se reportan anualmente 2 millones de casos nuevos de las diferentes presentaciones clínicas conocidas: Leishmaniosis cutánea (LC), mucocutánea (LMC) y visceral (LV) (Alvar *et al.*, 2012; World Health Organization, 2018).

Los países de África oriental como Sudán, Sudán del Sur, Etiopía, Kenia, Uganda y Somalia componen unas de las áreas geográficas más afectadas por la LV humana, causada por la especie *Leishmania donovani*. Existen actualmente alrededor de 20 especies de *Lleishmania* que pueden infectar al hombre, las cuales son transmitidas por cerca de 30 especies de pequeños insectos hematófagos de los géneros *Phlebotomus* y *Lutzomyia* que circulan en áreas del Viejo y Nuevo Mundo, respectivamente. Cabe resaltar que la leishmaniosis visceral humana o kala-azar se reportó por primera vez en el noreste de Uganda en el año 1950 (Olobo-Okao and Sagaki, 2014; World Health Organization, 2018).

Existen excepciones en la vía de transmisión de la *Leishmania* aunque son casos raros como son la transmisión venérea, transmisión congénita e infección por transfusión de sangre (Chongo Alfaro and Echegoyen, 2010) La mayoría de las veces la enfermedad es transmitida al hombre a través los animales (zoonosis), aunque en algunos casos se transmite entre los propios seres humanos (antroponosis). Como ejemplo podemos exponer que la LV causada por la *Leishmania infantum* la forma zoonótica de la enfermedad en la cual el perro es el reservorio principal y se encuentra mayoritariamente en la cuenca mediterránea, China, Medio Oriente y Sudamérica. (Ready, 2014) La forma antroponótica es causada por *L. donovani* que prevalece en el este de África y en el Subcontinente Indio (Van Griensven *et al.*, 2010; Olobo-Okao and Sagaki, 2014).

2.1 El parásito - Revisión Histórica

En el año 1901, W.B. Leishman identificó ciertos organismos en *frotis* procedentes del bazo de un paciente fallecido, presuntamente, por una enfermedad que

se caracterizó por debilidad general, episodios de fiebre irregulares, anemia severa, atrofia muscular e inflamación excesiva del bazo. Inicialmente, estos microorganismos fueron considerados como tripanosomas, pero, en el año 1903, Charles Donovan los describió como nuevos organismos. Por otro lado, el kala-azar, también conocida como *Leishmania* visceral, fue descubierta por Major Ross, quien nombró al agente causal *Leishmania donovani*. En cuanto a las diferentes especies de *Leishmania* éstas son morfológicamente muy similares, aunque se pueden diferenciar analizando su composición isoenzimática, mediante análisis de secuencia de ADN y utilizando anticuerpos monoclonales (Olobo-Okao and Sagaki, 2014).

2.2 Ciclo Biológico y Transmisión

El ciclo de vida de este parásito es digenético, alternando entre dos formas morfológica y bioquímicamente distintas, la forma promastigote, flagelada y extracelular, que se multiplica y se desarrolla en el tracto digestivo del vector de estas infecciones; y la forma amastigote, no flagelada e intracelular, que se replica en los macrófagos del hospedador (Carvalho Riverón, 2011).

En cuanto a la transmisión de la *Leishmania*, ésta se inicia cuando la hembra de flebótomo ingurgita sangre de un vertebrado junto con macrófagos infectados con amastigotes de *Leishmania*. Éstos se multiplican y se transforman en promastigotes en el tubo digestivo del díptero (metaciclologénesis). Los promastigotes pasan a la probóscide del insecto para su posterior inoculación a otro hospedador. Este ciclo tiene una duración de 4 a 10 días (Muskus and Marín Villa, 2002; Nathan, 2006).

Cuando la hembra de flebótomo vuelve a ingurgitar sangre de un vertebrado, inocula los promastigotes que son fagocitados por los macrófagos del tejido conectivo. En el interior de los lisosomas de éstos, se produce la transformación a amastigote y su posterior multiplicación. En la transformación de promastigote a amastigote influyen varios factores, siendo los más importantes la temperatura (35°C) y el pH. Los amastigotes se replican en los macrófagos, los destruyen e infectan progresivamente un número siempre mayor de fagocitos. La diseminación del parásito en el organismo del hospedador y el desarrollo de la enfermedad dependen del tipo y de la eficiencia de la respuesta inmunitaria del hospedador infectado. Sólo las hembras de flebótomo se alimentan de sangre, y, por tanto, son las únicas transmisoras de la infección (Carvalho Riverón, 2011).

La LV, causada principalmente por *L. donovani* y transmitida tanto por *Phlebotomus orientalis* como por *Phlebotomus Martini*, es altamente endémica en África Oriental. *Phlebotomus orientalis* está muy extendido en los países del este de África y se considera como el principal vector de la LV tanto para la forma antroponótica como zoonótica (Al-Salem, 2016). En cuanto a *P. orientalis* cabe resaltar su correlación con estaciones secas y con la presencia de bosques, que forman parte de una vegetación abundante en Sudán y en las zonas bajas de Etiopía.

Por otro lado, *P. martini* se ha reportado en Uganda, Kenia, Somalia, Sur de Sudán y Etiopía, donde la humedad alta se combina con temperaturas moderadas. El área de distribución de la leishmaniosis está condicionada no sólo por la presencia del flebótomo, sino por su abundancia y por su afinidad con algunas especies de vertebrados (Reithinger, Brooker and Kolaczinski, 2007; Al-Salem *et al*, 2016).

2.3 Manifestaciones Clínicas

Leishmaniosis humana

Inicialmente, debemos considerar que se dan una diversidad de manifestaciones clínicas que se pueden presentarse en un paciente con leishmaniosis. Existen varios factores directos, como la inmunocompetencia y características genéticas de la persona, así como la especie de *Leishmania* responsable de la infección, que pueden afectar al tipo de manifestación clínica. Cada una de las especies de *Leishmania* presentan en cierto modo un tropismo diferente por determinadas partes del organismo infectado. Las distintas manifestaciones clínicas de la enfermedad son las que nos permiten clasificarla en LV, en LC y en LMC, las cuales resultan de la replicación del parásito en los macrófagos del sistema fagocitonuclear, dermis y mucosa naso-orofaríngea, respectivamente (Herwaldt, 1992). La LV está causada principalmente por *L. donovani* en el este de África y en la India. Sin embargo, en Europa, norte de África, oriente medio, Asia y Latinoamérica, la LV está causada por *L. infantum* (Chappuis *et al.*, 2007).

La LV o kala-azar es la forma más grave de leishmaniosis, pues podría ser mortal en pocos meses en ausencia de tratamiento médico. El periodo de incubación puede variar desde 10 días hasta 1-2 años, y el inicio de la enfermedad suele ser gradual.

Este tipo de *Leishmania* involucra a todo el sistema retículo-endotelial y se caracteriza por espasmos irregulares, fiebre, pérdida de peso, anemia, hepato y esplenomegalia, aunque también se han observado complicaciones cutáneas tardías.

La LC está causada por las especies en el Viejo Mundo siguientes: *L. major* y *L. tropica*; y en el Nuevo Mundo se distinguen dos subgéneros: *L. leishmania* (incluye entre otras, *L. mexicana*, *L. amazonensis* y *L. chagasi*) y *L. viannia* (incluye *L. panamensis*, *L. braziliensis* y *L. guyanensis*). Dentro de las infecciones por *Leishmania*, la LC es la más común en el hombre y su periodo de incubación es bastante variable, entre 1 a 3 meses, tiempo al final del cual aparece, en la mayoría de los casos, una lesión ulcerosa de 0,5 a 10 cm. de diámetro, recubierta de una costra y de borde saliente escamoso. Aunque no representa riesgo de muerte para el paciente, las epidemias de las formas cutáneas son un problema importante en algunos países y son difíciles de controlar (Arenas *et al.*, 2017).

La LMC, también conocida como “espundia”, es característica de las selvas tropicales amazónicas y está causada principalmente por *L. braziliensis*. Al inicio de la enfermedad, la manifestación es exclusivamente cutánea, con lesiones únicas o múltiples y, en la mayoría de los casos, es autolimitante. No obstante, entre un 20 y 50% de los casos, al cabo de un cierto tiempo aparecen lesiones granulomatosas hemorrágicas en la mucosa nasal, mucosa gingival y rinofaríngea, con una evolución a necrosis extendida, las lesiones típicas de mutilaciones (Gramiccia and Gradoni, 2005; Gregory *et al.*, 2008; Kolaczinski *et al.*, 2008; Kumar and Nylén, 2012; Rohousova *et al.*, 2015).

Leishmaniosis canina

Cuenta con un espectro de manifestaciones clínicas que van desde infección subclínica o enfermedad leve autolimitante hasta enfermedad grave, que incluso en ocasiones pueden causar la muerte del animal (Rio *et al.*, 2018). En comparación con los humanos, los caninos parecen ser más susceptibles a la infección por *Leishmania infantum*. Éstos desarrollan una enfermedad moderada en la mayoría de los casos (Gramiccia, 2011; Velez *et al.*, 2019). Los perros pueden manifestar una evolución crónica de la enfermedad, caracterizada por signos viscero-cutáneos, que se producen en menos del 50% de los animales infectados. Por otra parte, puede ocurrir una infección

subclínica, sin signos clínicos macroscópicos evidentes en el paciente. Sobre este punto, es importante tener en cuenta que dichos animales si son seropositivos, sean éstos enfermos o aparentemente sanos, pueden considerarse como infecciosos para los vectores flebótomos responsables de la transmisión de esta infección (Molina *et al.*, 1994; Cavalcanti *et al.*, 2012).

Existen tres características patogénicas principales que ocurren en perros infectados. Los macrófagos son las células diana del parásito, como hemos descrito anteriormente. Estos macrófagos se convierten en el sitio de replicación del parásito. En segundo lugar, tanto el establecimiento de la enfermedad como la evolución de la misma depende del huésped (la respuesta inmunitaria, la presencia de co-infecciones, y la edad, entre otros factores). En tercer lugar, una vez establecida, la infección suele persistir en los tejidos, ya que los amastigotes de *Leishmania* tienden a localizarse en todos los tejidos donde existen células monocitos-macrofágicas en números altos (Paltrinieri *et al.*, 2010).

Los signos clínicos más frecuentes son los cutáneos como las dermatitis exfoliativas, ulcerativas, nodulares, papulares y pustulosas; aunque también es común la pérdida de peso, linfadenopatía y esplenomegalia. (Gállego, 2004; Solano-Gallego *et al.*, 2011; Noli and Saridomichelakis *et al.*, 2014; Saridomichelakis and Koutinas, 2014).

También pueden manifestarse signos clínicos del sistema gastrointestinal, como nódulos orales (Blavier *et al.*, 2001); alteraciones del sistema cardiovascular, como miocarditis, vasculitis, trombosis venosa y, en algunos casos, hipertensión (Koutinas *et al.*, 2001; Cortadellas *et al.*, 2006; Petanides *et al.*, 2008; Bourdeau *et al.*, 2014); del sistema respiratorio como neumonía; y del sistema esquelético, tales como lesiones óseas proliferativas y líticas (Agut, 2003). En cuanto a los ojos, se pueden observar las siguientes alteraciones: glaucoma, coriorretinitis, hemorragia retiniana con desprendimiento y atrofia (Cortadellas *et al.*, 2008; Peña *et al.*, 2008). En el sistema nervioso central se pueden encontrar signos indicativos de lesiones intracraneales o espinales (Viuelas *et al.*, 2001; Cauduro *et al.*, 2011; José-López, 2012; José-López *et al.*, 2014).

En cuanto a la bioquímica clínica sanguínea de rutina, en algunos casos podría ser la única indicación de la enfermedad en perros aparentemente sanos (infección subclínica). Los hallazgos más frecuentes incluyen: anemia leve normocrómica,

normocítica no regenerativa, aumento total de concentración de proteínas séricas con gamma y beta globulinemia. Se puede observar disminución de la albúmina y cociente albúmina/globulina y proteinuria glomerular (Koutinas *et al.*, 1992; Ciaramella *et al.*, 1997; Solano-Gallego *et al.*, 2001; Corona *et al.*, 2004; Plevraki *et al.*, 2006; Shaw, 2009).

Anormalidades adicionales, menos comunes y que podrían interpretarse de manera contradictoria e inespecíficas, pueden incluir alteraciones hematológicas como leucocitosis leve o leucopenia, neutrofilia o neutropenia, eosinofilia o eosinopenia, linfocitosis o linfopenia, monocitocis o monocitopenia y, por último trombocitopenia (Ciaramella *et al.*, 1997; Koutinas *et al.*, 2001; Gaskin *et al.*, 2002; Corona *et al.*, 2004; Petanides *et al.*, 2008). Además, se pueden observar alteraciones del perfil de coagulación, tiempo de sangrado prolongado, aumento de tiempo de coagulación, disminución de la agregación plaquetaria, disminución del factor de Von Willebrand y aumento del fibrinógeno (Corona *et al.*, 2004; Petanides *et al.*, 2008). Las anomalías inmunológicas pueden incluir anticuerpos antinucleares positivos (Ciaramella *et al.*, 1997). En endocrinología, también se ha documentado disminución de la T4 basal (Saridomichelakis *et al.*, 2013).

2.4 Diagnóstico

Para el diagnóstico serológico pueden considerarse la prueba de aglutinación directa (DAT). Esta prueba fue la primera desarrollada para su utilización en campo, es simple, barata y confiable, ya que presenta una alta sensibilidad y especificidad comprobada.(Travi *et al.*, 2018). La DAT se basa en la aglutinación de los promastigotes de *Leishmania coomassini trypsinized* por anticuerpos anti – *Leishmania*.

Otra prueba utilizada para el diagnóstico de *Leishmania* en perros es la prueba de detección de aglutinación rápida (FAST) que consiste en una modificación del DAT basada en una sola dilución de suero por encima del punto de corte de los sueros normales. Requiere tiempos de incubación más cortos y se ha optimizado para detectar grandes poblaciones de perros.

La prueba de anticuerpos de inmunofluorescencia (IFAT) contra los promastigotes de *Leishmania* es el método serológico cualitativo de referencia

actualmente para el diagnóstico de CVL. La especificidad y sensibilidad son cercanas al 100% en animales sintomáticos (Paltrinieri *et al.*, 2016). Algunas limitaciones notables son la reactividad cruzada con otros patógenos como los tripanosomas y la sensibilidad significativamente menor para identificar perros asintomáticos en comparación con ELISA (Solano-Gallego *et al.*, 2014).

La prueba de ELISA es otra de las pruebas que mas se utilizan en la rutina diagnóstica de la Leishmania. Una de las ventajas importantes es que permite analizar grandes cantidades de muestras utilizando microplacas recubiertas de antígeno y un espectrofotómetro que determina los títulos de anticuerpos por densidad óptica. El potencial para la cuantificación absoluta de anticuerpos hace que ELISA sea una herramienta poderosa que es menos susceptible al sesgo del operador. Uno de sus puntos fuertes es la posibilidad de utilizar combinaciones de antígenos múltiples, lo que aumenta la sensibilidad y/ o especificidad del método (Santarém *et al.*, 2010).

Pruebas mas sencillas como las que se basan en pruebas principalmente en pruebas inmunocromatográficas cualitativas que se leen a simple vista. Estas pruebas presentan una aplicación mas adaptada al trabajo en el campo, ya que cuenta con un diseño fácil de usar. . La mayoría de los kits comerciales disponibles actualmente utilizan unos pocos antígenos recombinantes validados como rK39, rK26 y rKE16. La rK es la comunmente utilizada.

En las pruebas descritas anteriormente se pueden usar líquidos biológicos distintos, como plasma, suero, sangre entera o sangre adsorbida en papel de filtro. La especificidad de los kits comerciales suele ser alta (> 90%), a diferencia de la sensibilidad, que puede ser muy variable (30% -90%) y un motivo de preocupación tanto para aplicaciones clínicas como epidemiológicas (Laurenti *et al.*, 2014).

En el caso de lesiones cutáneas o mucocutáneas, sospechosas de leishmaniosis, el primer paso es tratar de determinar la presencia de amastigotes por microscopia, mediante la tinción de Giemsa de las lesiones cutáneas. La observación microscópica de aspirados de linfonódulo o médula ósea es una de las técnicas más utilizadas tanto en humanos como en perros. El cultivo y la identificación de la especie de *Leishmania*, mediante técnicas como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y/o el análisis de

isoenzimas, puede aportar datos importantes para el tratamiento y pronóstico de la enfermedad.

2.5 Tratamiento

El tratamiento frente a la leishmaniosis es bastante difícil, teniendo en cuenta la complejidad de la enfermedad, el estado del paciente, las manifestaciones clínicas, la especie de *Leishmania* y, por último, pero no menos importante, la localización geográfica. Sumado a esto, debe tenerse en cuenta el número de casos con co-infección de otras enfermedades. A lo largo del tiempo se han desarrollado diversos tratamientos basados en quimioterapia, quimioterapia combinada, inmunoterapia e inmunoquimioterapia. En el caso de la leishmaniosis canina, el tratamiento farmacológico de primera línea más utilizado es una combinación de antimonio de meglumina y alopurinol. Sin embargo, a pesar de que la mayoría de los perros se recuperan clínicamente con esta terapia, generalmente no se logra una completa eliminación del parásito y los perros infectados pueden recaer, por lo cual, un seguimiento de los perros post-tratamiento es muy importante para evitar la reaparición de la enfermedad (Carvalho Riverón, 2011).

3. OBJETIVOS

El primer objetivo de este estudio fue detectar anticuerpos frente a antígeno de *L. infantum* mediante técnica de ELISA en suero de perros provenientes del noroeste de Uganda, así como evaluar factores de riesgo. El segundo objetivo del estudio fue evaluar el uso de suero impregnado en utilización de en papeles Whatman n°3 (papel filtro) para la detección de anticuerpos frente *L. infantum* mediante técnica de ELISA.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Seroprevalencia de leishmaniosis canina en el noroeste de Uganda mediante el estudio de muestras de suero

Área de estudio

Las muestras que fueron analizadas en este trabajo proceden de varias localidades del suroeste de Uganda (Figuras 1 y 2). Los distritos de los cuales provienen las muestras son: Kisoro, Kasese, Capchorwa, Buliisa, Masindi, Kibingo y Hoima. Además de cada distrito, se recogieron muestras de diferentes subdistritos (“subcounty”), municipios (“parish”) y poblados (“village”) (Tabla 1).

Se considera al distrito como la división más importante con relación al resto de subdivisiones, sean estas: subdistrito, municipio o poblado respectivamente. En relación a los parques nacionales, corresponden a tres distritos diferentes.

Tabla 1. Organización por distrito, subdistrito, municipio y poblado de los cuales provienen las muestras analizadas de suero.

Distrito	Parque Nacional	Subdistrito	Municipio	Poblado
Kisoro	Mgahinga		Kisoro Rushoroza	Rwerere Kinyamaseke
Kasese	Queen Elisabeth	Mukunyu		Kisinga
Buliisa	Budongo		Nyabyeya	Nyabigoma Kanyege
				Rwengabi
Hoima				Njakafunjo
Kapchorwa				Maram

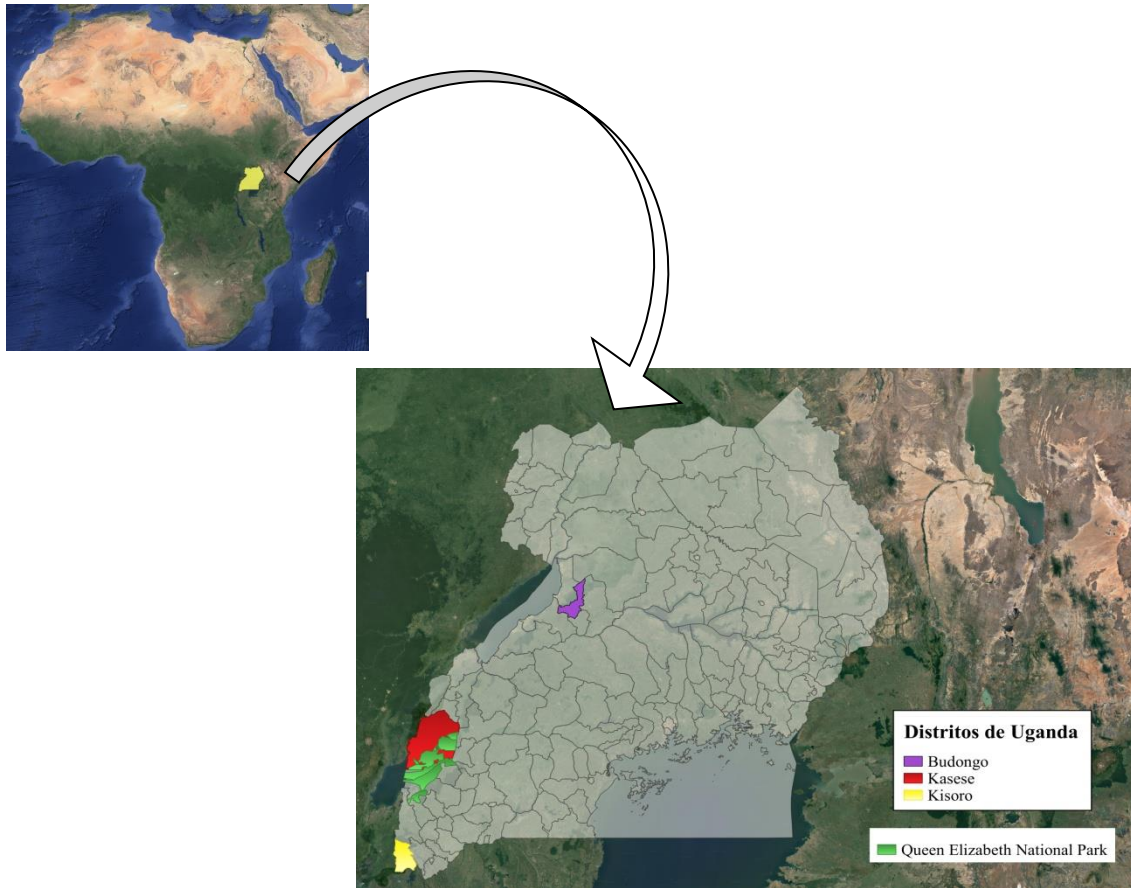


Figura 1. Mapa de Uganda, África. Distritos donde se muestreó en este estudio.

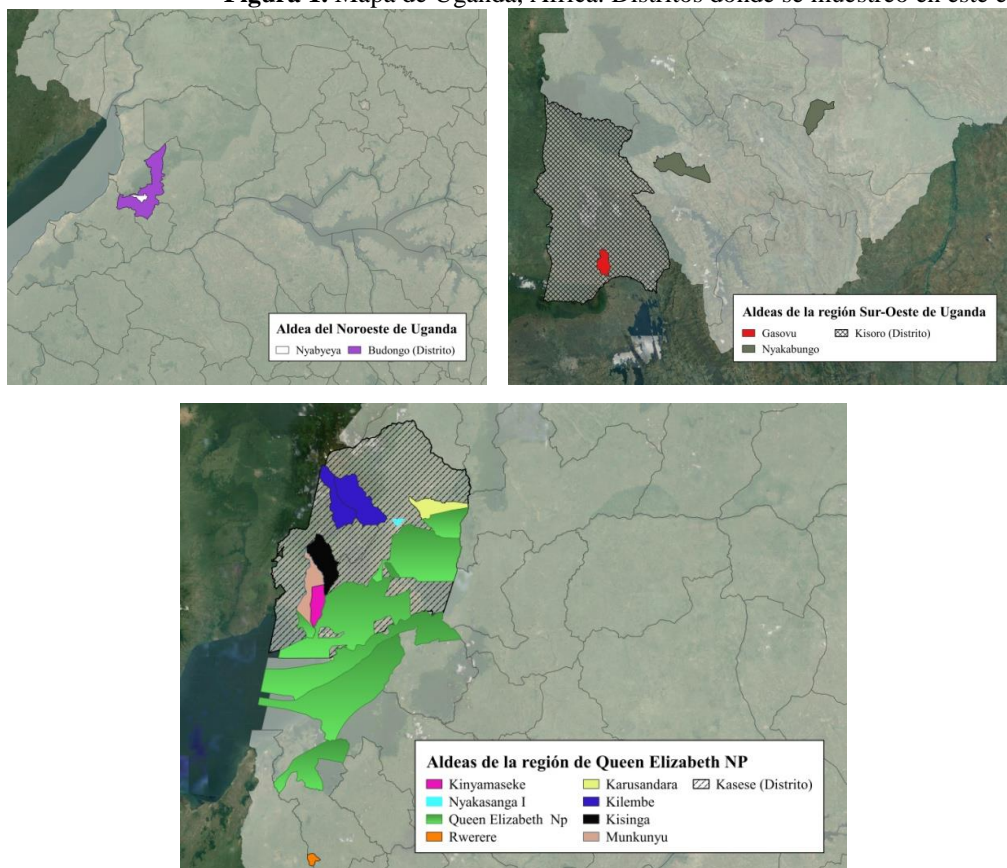


Figura 2. Mapa de las distintas aldeas donde se recogieron las muestras.

Recogida de muestras

Para este estudio se utilizaron muestras de suero de perros (*Canis familiaris*) provenientes de diferentes localidades de Uganda. Un total de 271 muestras fueron procesadas y analizadas. Las muestras fueron sometidas a un proceso de inactivación por calor a 58°C durante 60 minutos previo al envío a España. Las muestras corresponden al año 2017. Éstas fueron debidamente identificadas con el código CF (*Canis Familiaris*) seguido del año, representado por los dos últimos números **2017** quedando finalmente asentada en la base de datos **CF17-001**. Las muestras fueron registradas en una base de datos Excel, con datos de localización, cantidad de animales por propietario (inclusive ganado: cabras, ovejas y vacas), sexo, edad, raza, condición corporal, estado sanitario, castrado/esterilizado y manifestaciones clínicas (Tabla 2).

En cuanto a manifestaciones clínicas, se registraron animales que durante la toma muestras, presentaban algún tipo de lesiones y/o características de consideración como: heridas cutáneas- incluyendo lesiones descamativas, heridas en conducto auditivo externo (CAE), alopecia- además fueron considerados en este apartado animales en gestación. El resto de perros se consideraron como aparentemente sanos.

Tabla 2. Disposición de datos recogidos de Uganda. C/P= canino por propietario. Edad <2 años= joven >2 años= adulto. CC= condición corporal, 1= caquexia 2= bajo peso 3=ideal, 4= sobrepeso, 5= obeso. C/E= castrado/esterilizado. MC= manifestaciones clínicas. NA= sin dato.

ID	Localidad	C/P	Raza	Sexo	Edad	CC	C/E	MC
CF17001	Kisoro	3	NA	Macho	Joven	Bajo peso	No	No

ELISA (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*)

Técnica

El análisis de los sueros obtenidos se llevó a cabo en el laboratorio del Departamento de Medicina y Cirugía animal de la Universidad Autónoma de Barcelona. Dicho proceso siguió el protocolo ya establecido para la prueba de ELISA (Solano-Gallego *et al.*, 2014).

Posteriormente a antigenar la placa, se preparó en placa de ELISA una dilución de 1/800 del suero problema con PBS-Tween20 0.05% + 1% leche. Tras una incubación

a 37°C por 1 hora, se procedió a los lavados: 3 lavados con 200µl PBS-Tween20 0.05% y un último lavado con PBS. Después, se incubó de nuevo con 100µl/pocillo de Proteína A conjugada (dilución 1:30000), por 1 hora a 37°C. Se repitió el proceso de los cuatro lavados comentados anteriormente. Las placas se revelaron agregando solución de sustrato o-fenilendiamina (OPD) y el tampón de sustrato (*SIGMAFAST OPD*, Sigma Aldrich). La reacción se detuvo con 50µl de H₂SO₄ 2.5M/l. Los valores de absorbancia se leyeron a 492nm en un lector automático (*ELISA Reader Anthos 2001*) (Figura 3).

Para todas las placas se usó el suero de un perro enfermo con una infección confirmada como control positivo (calibrador) y el suero de un perro sano como control negativo. Además, todas las muestras se analizaron por duplicado.

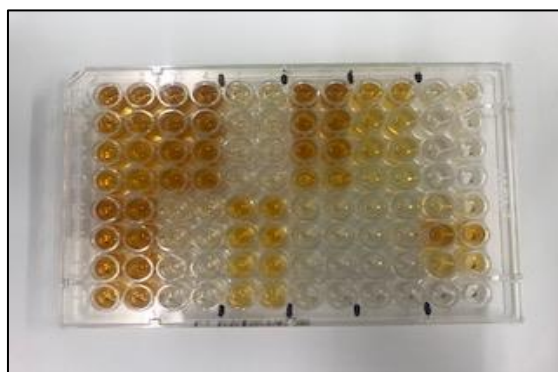


Figura 3. Placa de ELISA parada.

Interpretación de los resultados de ELISA

Para las muestras analizadas, se utilizaron los valores de referencia establecidos previamente (Solano-Gallego *et al.*, 2014). El resultado se cuantificó como unidades ELISA (EU) relacionadas con el suero canino positivo utilizado como calibrador y establecido arbitrariamente en 100 EU. El valor límite se estableció en 35 U (media + 4 desviación estándar SD de valores de 80 perros de área no endémica). La interpretación de los resultados del ELISA fue la siguiente:

El % de positividad se calculó siguiendo la siguiente fórmula:

$$X = \frac{\text{Media OD de las muestras} - \text{Media de control de conjugado}}{\text{Media del calibrador} - \text{Media del control de conjugado}}$$

donde:

X= % de positividad

OD= densidad óptica

- Negativo: <35%
- Positivo bajo: 35-150%
- Positivo medio: ≥ 150 -300%
- Positivo alto ≥ 300 %

4.2 Evaluación de los papeles Whatman como alternativa a las muestras de suero

Localización del estudio

Las muestras de este grupo provienen de áreas correspondientes al Parque Nacional *Queen Elisabeth* (Figura 2). Se trata de uno de los parques más importantes de Uganda, con una extensión de 1.978 km² situado a 400 km al suroeste de Kambala.

Recogida de muestras

Se utilizaron sangre entera y suero sanguíneo de caninos (*Canis familiaris*) recogidos en el año 2018. Identificadas con un código correspondiente a la especie CF (*Canis Familiaris*), seguido el número 18 haciendo referencia al año CF18-001. Un total de 65 muestras fueron procesadas y analizadas. Correspondiéndose 54 muestras de suero y 11 de sangre. Todas las muestras fueron remitidas en bolsas de plástico (*ciplot*) debidamente identificadas. Las muestras fueron registradas en una base de datos Excel tal como las muestras de suero del año 2017 (Tabla 2).

Los papeles filtro Whatman utilizados para el trabajo fueron de forma circular de 15cm de diámetro (*GE Healthcare Whatman™ Grade 589/3 quantitative filter paper circles*). Para la recogida de muestras dispusieron de dos a tres gotas de sangre entera/suero (aproximadamente 15μL) siguiendo la siguiente disposición: sangre en la parte superior del papel y suero en la parte inferior. El disco de papel contenía la descripción de la muestra, con el sistema de código descrito anteriormente (Figura 4).

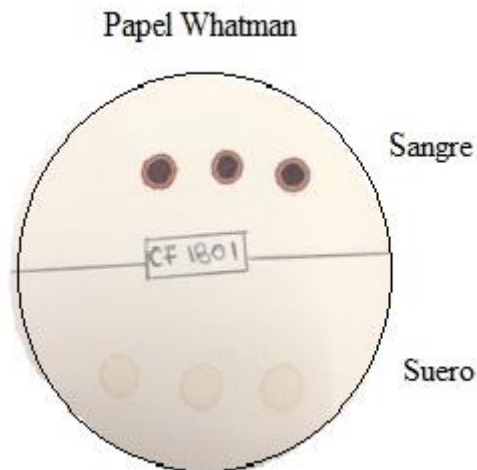


Figura 4. Disposición de las muestras de sangre/suero en el papel de filtro Whatman n°3

Papel filtro Whatman n° 3

Técnica

La técnica utilizada siguió el mismo principio que el descrito para las muestras de suero, pero teniendo en cuenta que estas muestras de sangre y suero vinieron depositadas en papel de filtro y que éste tiene una absorbancia de aproximadamente 15µl por cada disco recortado (*punch*) (Fisa *et al.*, 1992). Para ello se colocaron 50µl de PBS-Tween20 0.05% + 1% leche en tubos Eppendorf individualmente con los discos recortados y se dejaron en agitación a temperatura ambiente durante toda la noche (Figura 5). La técnica de ELISA se realizó como previamente descrito en el apartado anterior. La dilución utilizada del papel de filtro fue de 1/50. Se preparó una dilución de 1/50 del preparado con papel de filtro, la cual se añadió 100µl en los pocillos de la placa de ELISA con PBS-Tween20 0.05% + 1% leche.

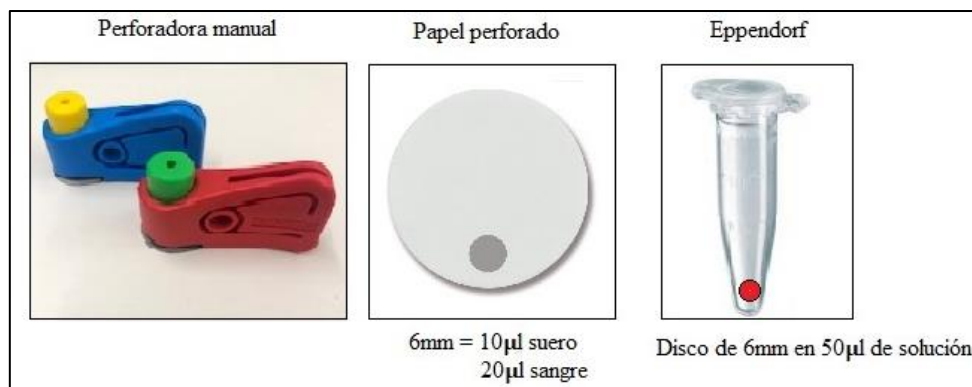


Figura 5. Utensilios utilizados para la realización del ELISA con papeles Whatman n°3. El volumen total recogido de cada tubo Eppendorf con un disco de 6mm corresponde a 10µl de volumen para los sueros y 20µl de volumen para sangre. Consiguiendo una dilución final 1/50

Los valores de absorbancia se leyeron a 492 nm en un lector automático (ELISA Reader Anthos 2001). Todas las placas incluyeron el suero de un perro enfermo con una infección confirmada como control positivo (calibrador) y el suero de un perro sano como control negativo. Todas las muestras de la placa se analizaron por duplicado.

Determinación del *cut-off*

Para la determinación del *cut-off* se utilizó la metodología de la curva de característica operativa del recepto (*ROC Curve*) (Hajian-Tilaki, 2018). utilizando el software *SPSS Statistics* (SPSS Inc, 2008). Se utilizaron 20 sueros caninos positivos, y 30 sueros de perros seronegativos de Catalunya.

De los resultados obtenidos, se escogió el valor límite de 27.15% (sensibilidad=100%; especificidad=100%) como *cut-off* (Anexos 1 y 2). Las muestras de suero y sangre se clasificaron como positivo alto cuando tenían un porcentaje de positividad (% p) igual o superior a 100%, positivo se clasificaron como % p igual o mayor que 27% y menor que 100%. Finalmente, las muestras negativas fueron aquellas con porcentaje inferior al 27%.

Análisis Estadístico

Los datos fueron analizados utilizando el software SPSS *Statistics* (SPSS Inc, 2008) y el R (i386 3.5.1) También se utilizó *el GraphPad Prism 5* (GraphPad Software, Inc.5.00) para la realización de gráficos.

Las variables independientes fueron localidad, raza, edad, sexo, condición corporal, animales castrados/esterilizados, presencia de ectoparásitos y manifestaciones clínicas del animal.

Se distribuyeron los animales entre 2 grupos de edad: adultos (>2 años) y jóvenes (≤ 2 años) para transformar ésta variable numérica en categórica. Igualmente, se distribuyeron los animales en 3 grupos dependiendo de su condición corporal: bajo peso, ideal y sobrepeso, para reducir el número de grupos. Para el estudio de variables categóricas, se utilizaron tablas de contingencia de las variables de exposición por Chi-cuadrado de Pearson (X^2) y el test exacto de Fisher.

Se compararon los resultados del ELISA (% de positividad) por zonas, sexo, edad, condición corporal, animales castrados/esterilizados, presencia de ectoparásitos y manifestaciones clínicas del animal usando Mann-Whitney (2 grupos) y Kruskal-Wallis (>2 grupos).

Se estudió la normalidad mediante el test de Shapiro-Wilk y se definió $P < 0.05$ como significativo.

5. RESULTADOS

5.1. Análisis descriptivo de los sueros inactivados de perros estudiados

De 271 muestras analizadas todas resultaron negativas.

La distribución geográfica de las muestras, la mayoría proviene del distrito de Mukunyu (42.8%), seguido de Kisinga (26.2%) y Kisoro (15.5%). En las muestras analizadas se observó una mayor proporción de perros machos (81.4%) que hembras (18.6%). Del total, el 99.6% corresponden a perros no castrados, desconociéndose el

estado de 27 animales muestreados. Se registró un 41.7% de animales con bajo peso, seguido de un 40% de animales con condición corporal ideal, un 15.6% de caquéticos y un 2.8% de animales con sobrepeso. De manera general, el 74.2% de animales muestreados fueron menores de 2 años. Del total de caninos muestreados, el 12.5% presentó manifestaciones clínicas, de las cuales se destacan: heridas cutáneas, incluyendo lesiones descamativas (n=6), heridas en CAE (conducto auditivo externo) (n=8) y alopecia (n=18). Además, un único caso de gestación fue reportado. Por lo que respecta a la raza canina, el 99.6% de los animales de este estudio fueron de raza mestiza (locales).

Dentro del total de muestras analizadas, se registraron las siguientes variables sin datos disponibles: edad (n=27), condición corporal (n=91), sexo (n=24) y raza (n=31).

5.2 ELISA en muestras en papel Whatman

Descripción clínica

La mayor cantidad de muestras resultaron de la localidad de Nyakasanga (20%; n=13), seguida por Kinyamaseke (18.5% n=12). Por otro lado, de Mukunyu fue donde se recogieron menos muestras, únicamente 3 (4.6%).

Para este grupo de muestras, hemos estudiado un mayor número de perros machos (69.2%, n=45) que de hembras (30.8%, n=20); y una mayor proporción de animales jóvenes <2 años (62.1%, n=36) que de adultos >2 años (37.%, n=22).

La localidad donde se muestrearon más perros jóvenes fue en Kinyamaseke (n=12), donde además, no se muestrearon perros adultos. Todos los animales estudiados fueron de raza mestiza; y únicamente 2 fueron castrados.

Se observó un 48.7% de animales con condición corporal ideal (n=19), seguido de un 25.6% de animales con bajo peso (n=10), un 20.5% con sobrepeso (n=8) y un 5.1% de animales caquéticos (n=2). Las localidades donde se muestrearon más animales con caquexia y bajo peso fueron Hyammamba (bajo peso 60%, caquexia 20%)) y Mukunyu (bajo peso 66.6%, ningún animal con caquexia). Los animales con sobrepeso provinieron sobre todo de Kilembe (n=3) y Karusandara (n=3).

Con respecto a los animales con manifestaciones clínicas, hemos encontrado del total de animales muestreados (n=65) solo 3 presentaron algún tipo de anormalidad. Se describieron dos animales con TVT y un único animal con sarna.

Interpretación de los datos serológicos

Para interpretar los resultados, se siguieron los valores de referencia establecidos anteriormente. Además, por lo que respecta a la condición corporal, los animales se reagruparon esta vez según: bajo peso (caquécticos junto con bajo peso), ideal o sobrepeso.

Del total de muestras analizadas (n=65) se detectaron anticuerpos en un 50.8% (n=33) y un 49.2% (n=32) fue negativo. De aquellos positivos, el 9.1% (n=3) correspondieron a positivos altos. Las localidades donde hubo una mayor prevalencia en general fueron: Karusandara (80%) y Kilembe (77.7%). La mayoría de perros seropositivos entraron dentro de la categoría “ideal” (n=19), no obstante, la categoría que obtuvo un porcentaje más elevado de seropositivos fue la de “sobrepeso”, con un 87.5% de su total.

La seropositividad según el sexo fue: machos 48.8% (n=22) y hembras 50% (n=11). De ellos, el 58.3% estaban castrados. Un total de 52.7% de los perros seropositivos fueron jóvenes ≤ 2 años (n=18). Del total de perros que mostraron tener parásitos (n=48), el 47.9% (n=23) fueron seropositivos. Cuarenta y ocho perros recibieron tratamiento antiparasitario (ivermectina), de los cuales 23 resultaron seropositivos (47.9%). Los perros que no presentaron ectoparásitos (n=17) se observó seropositivos en un 58.8% (n=10) (Tabla 3).

Tabla 3. Resultados de seroprevalencia frente a *L. infantum* en base a la distribución geográfica, edad, sexo, condición corporal, castrados/esterilizadas manifestaciones clínicas, presencia de ectoparásitos y tratamiento antiparasitario. ¹Intervalo de confianza. ²Nivel de confianza=95%. *Tratamiento antiparasitario con ivermectina. **NA= Sin dato

SEROPREVALENCIA					
		Nº perros	Nº positivos	% Total	IC ¹ (95% CL ²)
Localización geográfica	Kasese Camp School	8	5	62.5	24-91
	Kasese Nsakasanga	5	2	40	0.5-85
	Kilembe	9	7	77.7	40-97
	Karusandara	5	4	80	28-99
	Nyakasanga	13	5	38.5	14-68
	Hyammamba Division	10	3	30	0.6-65
	Kinyamaseke Town	12	5	41.6	15-72
	Mukunyu	3	2	66.7	0.9-99
Sexo	Macho	45	22	48.8	33-64
	Hembra	20	11	55	31.77
Edad	Joven	36	19	52.7	35-69
	Adulto	22	10	45.4	24-67
Condición corporal	Bajo peso	12	4	33.3	10-65
	Ideal	19	11	57.8	33-79
	Sobrepeso	8	7	87.5	47-99
	NA**	26			
Animal Castrado	Si	62	33	53.2	40-66
	No	3			
Manifestaciones Clínicas	Si	3	1	3	0.1-91
	No	62	32	51.6	
Presencia de ectoparásitos	Si	48	23	47.9	33-62
	No	17	10	58.8	32-81
Tratamiento antiparasitario*	Si	48	23	47.9	33-62
	No	17	10	58.8	32-81
TOTAL		65	33	50.8	38-63

Se debe mencionar que la variable raza fue eliminada del análisis estadístico ya que todos los perros muestreados correspondían a mestizos (Tabla 4). La seroprevalencia de *L. infantum* en base a las variables estudiadas y a la localización geográfica se muestran en la tabla 4 y 5. Entre estas variables registradas no se encontró ninguna asociación estadísticamente significativa con la seroprevalencia de la infección, a excepción de las comentadas a continuación.

Tabla 4. Seroprevalencia de *L. infantum* según variables de sexo, edad, raza, condición corporal, presencia de ectoparásitos, animal castrado/esterilizado y tratados con antiparasitario, agrupados por localización geográfica. *One-sided 97.5% confidence interval.

		Kaseese Base Camp School			Kaseese Nsakasanga			Kilembe			Karusandara		
		n	n.pos (%)	IC (95%)	n	n.pos (%)	IC (95%)	n	n.pos (%)	IC (95%)	n	n.pos (%)	IC (95%)
Sexo	Macho	4	3(75)	19-99	3	1(33.3)	0.1-91	5	5(100)	48-100*	4	3(75)	19-99
	Hembra	4	2(50)	0.6-93	2	1(50)	0.1-99	4	2(50)	0.6-93	1	1(100)	0.2-100*
Edad	≤2	4	2(50)	0.6-93	4	1(25)	0.7-81	4	4(100)	40-100	2	1(50)	0.1-99
	>2	3	2(66.8)	0.9-92	0	—	—	5	3(60)	15-95	3	3(100)	29-100*
	NA	1	1(100)	0.2-100*	1	1(100)	0.2-100*	0	—	—	0	—	—
Raza	Mestiza	8	5(62.5)	24-91	5	2(40)	0.5-85	9	7(77.8)	40-97	5	4(80)	28-99
Condición corporal	1	—	—	—	—	—	—	0	—	—	0	—	—
	2	—	—	—	—	—	—	0	—	—	0	—	—
	3	—	—	—	—	—	—	6	5(83.3)	36-100	0	—	—
	4	—	—	—	—	—	—	4	2(50)	0.6-93	3	3(100)	29-100*
	NA	8	5(62.5)	24-91	5	2(40)	0.5-85	0	—	—	2	1(50)	0.1-99
Presencia de ectoparásitos	Si	6	5(83.3)	35-99	3	—	—	7	6(85.7)	42-100	2	1(50)	0.1-99
	No	2	—	—	2	—	—	2	1(50)	0.1-99	3	3(100)	29-100*
Castrado/Esterilizado	Si	8	5(62.5)	24-91	4	2(50)	0.6-93	9	—7(77.8)	—40-97	5	4(80)	28-99
	No	0	—	—	1	—	—	0	—	—	0	—	—
Tratamiento antiparasitario*	Si	7	4(57.1)	18-90	4	2(50)	0.6-93	9	7(77.8)	40-97	5	4(80)	28-99
	No	1	—	—	1	—	—	0	—	—	0	—	—
TOTAL		8	5(62.5)	24-91	5	2(40)	0.5-85	9	7(77.7)	40-97	5	4(80)	28-99

Tabla 5. Seroprevalencia de *L. infantum* según variables de sexo, edad, raza, condición corporal, presencia de ectoparásitos, animal castrado/esterilizado y tratados con antiparasitario, agrupados por localización geográfica. **One-sided 97.5% confidence interval*.

		Nyakasanga			Hyammamba Division			Kinyamaseke Town			Mukunyu		
		n	n.pos (%)	IC (95%)	n	n.pos (%)	IC (95%)	n	n.pos (%)	IC (95%)	n	n.pos (%)	IC (95%)
Sexo	Macho	11	4(36.3)	11-69	7	3(42.9)	10-82	10	5(50)	18-81	1	—	—
	Hembra	2	1(50)	0.1-99	3	4(66.7)	22-95	2	—	—	2	2(100)	0.2-100*
Edad	≤2	4	2(50)	0.6-93	3	2(66.7)	0.9-99	12	5(41.6)	15-72	3	2(66.7)	0.9-99
	>2	4	1(25)	0.7-81	7	1(14.2)	0.04-58	0	—	—	0	—	—
	NA	5	2(40)	0.5-85	1	2(100)	16-100*	0	—	—	0	0	—
Raza	Mestiza	13	5(38.5)	13-69	10	3(30)	0.6-65	12	5(41.6)	15-72	3	2(66.7)	0.9-99
Condición corporal	1	0	—	—	2	1(50)	0.1-99	0	—	—	—	—	—
	2	0	—	—	6	1(16.7)	0.04-64	2	1(50)	0.1-99	2	1(50)	0.1-99
	3	1	1(100)	—	2	1(50)	0.1-99	9	3(33.3)	07-70	1	1(100)	0.2-100*
	4	1	1(100)	—	0	—	—	1	1(100)	0.2-100*	—	—	—
	NA	11	3(27.2)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Presencia de ectoparásitos	Si	10	3(30)	0.6-65	10	3(30)	0.6-65	9	3(33.3)	07-70	1	1(100)	0.2-100*
	No	3	2(66.8)	0.9-99	0	—	—	3	2(66.6)	09-99	2	1(50)	0.1-99
Castrado/Esterilizado	Si	12	5(41.6)	15-72	10	3(30)	0.6-65	11	5(45.5)	16-76	3	2(66.7)	0.9-99
	No	1	—	—	0	—	—	1	—	—	0	—	—
Tratamiento antiparasitario*	Si	13	5(38.5)	14-68	8	3(37.5)	0.8-75	11	5(45.4)	16-76	3	2(66.7)	0.9-99
	No	0	—	—	0	—	—	1	—	—	0	—	—
TOTAL		13	5(38.5)	14-68	10	3(30)	0.6-65	12	5(41.6)	15-72	3	2(66.7)	0.9-99

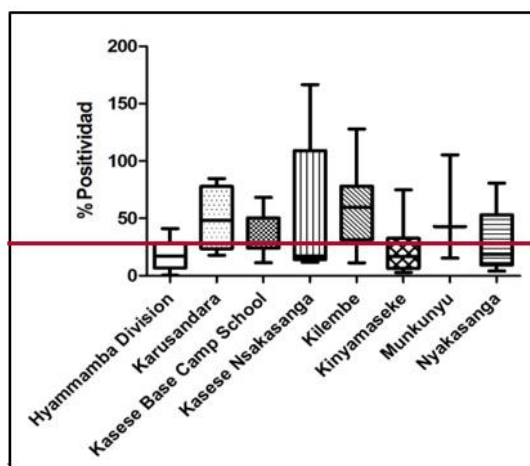


Figura 6. Niveles de positividad de anticuerpos frente a *L. infantum* clasificado por zonas geográficas Hyammabama Division < Karusandara (Mann-Whitney: $W=7$. $P=0.028$), Hyammabama Divisi < Kilembe (Mann-Whitney: $W=11$. $P=0.004$), Kilembe > Kinyamaseke (Mann-Whitney: $W=88$. $P=0.015$), Hyammamba Division < Kasese Base School (Mann-Whitney: $W=18$. $P=0.054$), Kilembe > Nyakasanga (Mann-Whitney: $W=88$. $P=0.051$)

Hyammamba division presentó menor porcentaje de seropositividad que Karusandara (Mann-Whitney: $W=7$. $P=0.028$). Por otro lado, Kilembe presentó mayor porcentaje de positividad que Hyammamba division (Mann-Whitney: $W=11$. $P=0.004$) y que Kinyamaseke (Mann-Whitney: $W=88$. $P=0.015$).

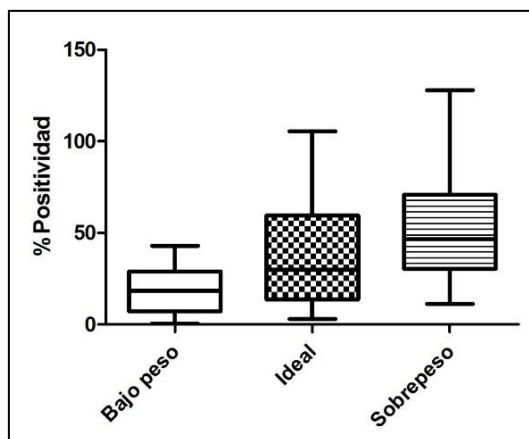


Figura 7. Niveles de positividad de anticuerpos frente a *L. infantum* clasificado por condición corporal

Se vio una relación estadísticamente significativa entre las siguientes variables de condición corporal y seropositividad: los animales con un “bajo peso” obtuvieron un porcentaje de seropositividad menor que aquellos animales con “sobrepeso” (Kruskal-

Wallis: 7.18. df=2. P=0.028). Según el diagrama de cajas realizado (Figura 7) se puede observar, en cuanto a la seropositividad: Bajo peso < Ideal < Sobre peso.

Por último, se observó una tendencia (media=37.6%) en los animales castrados a ser más seropositivos (Mann-Whitney: W=32. P=0.056). No obstante, hay que tener en cuenta que únicamente 3 perros fueron no castrados.

6. DISCUSIÓN

En el presente estudio la seroprevalencia frente a *L.infantum* en perros de la región Oeste de Uganda, fue del 50.8% mediante ELISA indirecto. El único estudio previo en perros conocido en Uganda. realizado en el año 2011. reportó una seroprevalencia de 19.6% para *Leishmania* sp. en un total de 92 perros testeados en los Parques Nacionales de *Queen Elizabeth (QENP)*. *Bwindi Impenetrable* y *Mgahinga Gorilla* (Millán *et al.*. 2013). Los resultados se obtuvieron mediante ELISA competitivo con un intervalo de confianza al 95% (12.3–29.2) (Millán *et al.*. 2013). Por lo que respecta a los resultados del QENP en concreto se reportó una seroprevalencia de 19.2% en 26 perros totales muestreados (IC95% de 7.9-38.3) (Millán *et al.*. 2013). Estos resultados pueden ser comparados con los obtenidos en el presente estudio en área geográfica correspondientes al parque nacional *Queen Elizabeth* donde se observó una seroprevalencia total de 50.8% (IC95% 38-63) de un total de 65 perros muestreados.

No existen más datos previos sobre seroprevalencia de leishmaniosis canina en este país o zonas limítrofes con las que comparar (Rohousova *et al.*, 2015). No obstante otros autores han reportado seroprevalencias también elevadas en otros países de África tales como Senegal. En concreto, entre el 2005 y 2008 se reportó mediante confirmación molecular un 46.3% de positividad en perros del país (Faye *et al.*, 2010) .

Considerando que no se dispone de mucha información sobre la prevalencia de la enfermedad en el noroeste de Uganda podemos mencionar que la mayoría de casos que afectan a personas se han registrado en la región del Este del país. Datos recogidos. según los registros hospitalarios del condado de Pokot (distrito de Amudat) indican una cifra del 17% de prevalencia de LV (kala-azar) en el año 2006. aunque se desconoce la prevalencia real de la enfermedad en esta zona (Odoch and Olobo. 2013). Existen

escasos estudios sobre prevalencia de leishmaniosis humana en países de África, la mayoría de los cuales son observacionales (Reithinger. Brooker and Kolaczinski. 2007; Sunyoto *et al.*. 2018).

Con respecto a los datos del presente estudio podemos concluir que Uganda es un país endémico para esta enfermedad en perros. Si bien la seroprevalencia de la enfermedad no presentó relación estadísticamente significativa respecto a las variables estudiadas, si se observó una relación estadísticamente significativa entre los porcentajes de seropositividad de las muestras y la condición corporal del animal. Así los animales con un bajo peso (22.3%) obtuvieron un porcentaje de seropositividad menor que aquellos animales registrados con sobrepeso.

En relación a los datos de frecuencia observados, no se registró correlación estadísticamente significativa entre la seropositividad y el sexo de los perros muestreados. Un estudio previo (Miranda *et al.*, 2008) sobre la caracterización del sexo, la edad y la raza para una población de perros enfermos con leishmaniosis reveló que la población de perros enfermos (n=39) fue del 61%, la proporción de perros machos en la población enferma fue significativamente mayor que la proporción de hembras. En relación a la posible concordancia entre la edad y la prevalencia de la enfermedad. Esta asociación tampoco fue estadísticamente significativa en el presente estudio. No obstante, se observó una tendencia respecto a la seroprevalencia en animales jóvenes menores de 2 años con un 52.7% (n=19) de positivos. Los animales jóvenes son inherentemente más sensibles a la enfermedad, motivo por el cual esta podría desarrollarse a una edad más temprana. Por otro lado el sistema inmunológico disminuye cuando se presenta otra infección concomitante (Miranda *et al.*, 2008).

Por lo que respecta a las muestras recogidas en tubos EDTA (n= 271) que resultaron completamente negativas al ELISA se planteó la posibilidad de la existencia de un error en el proceso manual de inactivación al que fueron sometidas previo envío a España. Se ha considerado esta hipótesis en vista al aspecto gelificante de los sueros utilizados al momento de realizar la prueba. ya que esta característica está asociada a una temperatura superior a la establecida durante el proceso de inactivación. Las muestras biológicas de sangre y/o suero deben inactivarse a temperatura de 58°C por 15 a 60 min dependiendo de la especie (Soltis *et al.*. 1979).

Un factor que no se ha tenido en cuenta en este trabajo es la posesión de ganado de los propietarios de los perros muestreados en el año 2017 que fueron aproximadamente la mitad de ellos. Sería interesante evaluar la seroprevalencia de estos animales, ya que pueden actuar de igual manera como reservorios de la enfermedad. En un estudio realizado en el noroeste de Etiopía se reportó una proporción importante de ganado ovino y caprino seropositivo para antígenos contra *L. donovani*. (Rohousova *et al.*, 2015) Además de actuar como reservorios también podrían estar actuando como huéspedes alternativos y proteger en cierta manera a las personas que se encargan de cuidar al ganado (Kolaczinski *et al.*, 2007)

Finalmente, si bien la seroprevalencia de *L. intantum* en el presente estudio se consideró elevada, esfuerzos adicionales deberían considerarse para obtener unos resultados más concluyentes. Especialmente se ha reconocido la existencia de reacción cruzada entre los diferentes géneros de protozoos pertenecientes al orden Trypanosomatida tales como la *Leishmania* spp. y *Trypanosoma* spp. en perros. Las técnicas de diagnóstico para estas enfermedades pueden dar resultados inconcluyentes debido a que estos géneros de protozoo comparten antígenos muy similares, incluso a veces idénticos (Zanette *et al.*, 2013). Es decir, existe serocorreación cruzada entre diferentes especies de *Leishmania* y entre especies de *Leishmania* y *Trypanosoma* (Troncarelli *et al.*, 2009).

Un estudio sobre la prevalencia de *trypanosoma* spp. en bovinos y asnos, reportó un 16.3% (IC95% 12.4-21.1) y 32.4% (IC95% 20.2-47.6) de seropositivos. Esto hace indicar que Uganda es una zona de alta endemia de trypanosoma, afectando en gran medida a varias especies de animales (Fèvre *et al.*, 2001).

Se ha demostrado también la protección antigénica cruzada entre *Leishmania* spp. y *Trypanosoma* spp. en humanos. La activación no específica de células T ocasionada por *Trypanosoma brucei* demostró conferir protección contra la leishmaniosis cutánea en estudios de laboratorio (Pereira *et al.*, 2018).

Además aspectos técnicos como el establecimiento del tamaño y tipo de muestra, método de recogida de muestras y conservación de la misma deberían perfeccionarse. Debido al presumible carácter endémico de la enfermedad en el noroeste y suroeste de Uganda, la aplicación de un monitoreo de trabajo de campo en la población de perros y

vectores (principalmente en zonas con grandes extensiones naturales y reservas de agua) debería considerarse.

7. CONCLUSIÓN

De los resultados expuestos en este trabajo, se ha concluido que la región noroeste de Uganda presenta áreas geográficas con elevada seroprevalencia de *Leishmania* canina. Deben dedicarse esfuerzos adicionales en el estudio de esta enfermedad para determinar la seroprevalencia real en la totalidad del país, así comprender el papel de los perros en la transmisión de la LV a personas sus factores de riesgo y las medidas de control a implementar más eficientes.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Agut, A. (2003) 'Clinical and radiographic study of bone and joint lesions in 26 dogs with leishmaniasis', *Veterinary Record*, 153(21), pp. 648–652. doi: 10.1136/vr.153.21.648.
- Al-Salem (2016) 'A review of visceral leishmaniasis during the conflict in South Sudan and the consequences for East African countries', *Parasites and Vectors*. Parasites & Vectors, 9(1), pp. 1–11. doi: 10.1186/s13071-016-1743-7.
- Alvar, J. *et al.* (2012) 'Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence', *PLoS ONE*, 7(5), pp. 1–12. doi: 10.1371/journal.pone.0035671.
- Arenas, R. *et al.* (2017) 'Leishmaniasis: A review', *F1000Research*, 6, pp. 1–15. doi: 10.12688/f1000research.11120.1.
- Blavier, A. *et al.* (2001) 'Atypical Forms of Canine Leishmaniosis', *Veterinary Journal*, 162(2), pp. 108–120. doi: 10.1053/tvjl.2000.0556.
- Bourdeau, P. *et al.* (2014) 'Management of canine leishmaniosis in endemic SW European regions: A questionnaire-based multinational survey', *Parasites and Vectors*, 7(1), pp. 1–14. doi: 10.1186/1756-3305-7-110.
- Carvalho Riverón, L. . (2011) *Mecanismos de acción de las 8-aminoquinolina marcadores de las resistencia de la Leishmania*. Universidad de Granada. España.
- Cauduro, A. *et al.* (2011) 'Paraparesis Caused by Vertebral Canal Leishmaniotic Granuloma in a Dog', *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 25(2), pp. 398–399. doi: 10.1111/j.1939-1676.2010.0668.x.
- Cavalcanti, A. *et al.* (2012) 'Canine cutaneous leishmaniasis caused by neotropical *Leishmania infantum* despite of systemic disease: A case report', *Parasitology International*, 61(4), pp. 738–740. doi: 10.1016/j.parint.2012.05.002.
- Chappuis, F. *et al.* (2007) 'Visceral leishmaniasis: What are the needs for diagnosis, treatment and control?', *Nature Reviews Microbiology*, pp. 873–882. doi: 10.1038/nrmicro1748.
- Chongo Alfaro, M. L. and Echegoyen, R. (2010) 'Leishmaniasis y transfusión . Artículo de revisión', 3(5), pp. 1–47.
- Ciamarella, P. *et al.* (1997) 'A retrospective clinical study of canine leishmaniasis in 150 dogs naturally infected by *Leishmania infantum*', *Veterinary Record*, 141(21), pp. 539–543. doi: 10.1136/vr.141.21.539.
- Corona, M. *et al.* (2004) 'Haemostatic Disorders in Dogs Naturally Infected by *Leishmania infantum*', *Veterinary Research Communications*, pp. 231–334. doi: 10.1023/b:verc.0000045439.46994.1f.

- Cortadellas, O. *et al.* (2006) 'Systemic hypertension in dogs with leishmaniasis: Prevalence and clinical consequences', *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 20(4), pp. 941–947. doi: 10.1892/0891-6640(2006)20[941:SHIDWL]2.0.CO;2.
- Cortadellas, O. *et al.* (2008) 'Glomerular filtration rate in dogs with leishmaniasis and chronic kidney disease', *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 22(2), pp. 293–300. doi: 10.1111/j.1939-1676.2008.0062.x.
- Epidemiología, C. N. de and Instituto de Salud Carlos, I. I. I. (2013) 'Protocolos de la Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica', *Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica*, pp. 341–360. Available at: <http://gesdoc.isciii.es/gesdoccontroller?action=download&id=08/07/2015-28724e36ba>.
- Esteva, L. (2017) 'The role of asymptomatics and dogs on leishmaniasis propagation', *Mathematical Biosciences*, 293, pp. 46–95. doi: 10.1016/j.mbs.2017.08.006.
- Faye, B. *et al.* (2010) 'Canine visceral leishmaniasis caused by *Leishmania infantum* in Senegal: Risk of emergence in humans.', *Microbes and Infection*, 12(14–15), pp. 1219–1225. doi: 10.1016/j.micinf.2010.09.003.
- Fèvre, E. M. *et al.* (2001) 'The origins of a new *Trypanosoma brucei rhodesiense* sleeping sickness outbreak in eastern Uganda', *Lancet*, 358(9282), pp. 625–628. doi: 10.1016/S0140-6736(01)05778-6.
- Fisa, R. *et al.* (1992) 'El diagnóstico serológico de la leishmaniosis canina en la comarca del Priorat (Tarragona)', *Clinica Veterinaria de pequeños animales*, 12(4), pp. 0231–236.
- Gállego, M. (2004) 'Emerging parasitic zoonoses: Leishmaniosis', *Zoonosis emergentes por patógenos parásitos: Las leishmaniosis*, 23(2), pp. 661–676.
- Gaskin, A. A. *et al.* (2002) 'Visceral leishmaniasis in a New York foxhound kennel', *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 16(1), pp. 34–44. doi: 10.1111/j.1939-1676.2002.tb01604.x.
- Gramiccia, M. (2011) 'Recent advances in leishmaniosis in pet animals: Epidemiology, diagnostics and anti-vectorial prophylaxis', *Veterinary Parasitology*, 181(1), pp. 23–30. doi: 10.1016/j.vetpar.2011.04.019.
- Gramiccia, M. and Gradoni, L. (2005) 'The current status of zoonotic leishmaniasis and approaches to disease control', *International Journal for Parasitology*. doi: 10.1016/j.ijpara.2005.07.001.
- Gregory, D. J. *et al.* (2008) 'Comparison of the effects of *Leishmania major* or *Leishmania donovani* infection on macrophage gene expression', *Infection and Immunity*, 76(3), pp. 1186–1192. doi: 10.1128/IAI.01320-07.
- Van Griensven, J. *et al.* (2010) 'Combination therapy for visceral leishmaniasis', *The Lancet Infectious Diseases*, 2(2), pp. 184–194. doi: 10.1016/S1473-3099(10)70011-6.

- Hajian-Tilaki, K. (2018) 'The choice of methods in determining the optimal cut-off value for quantitative diagnostic test evaluation', *Statistical Methods in Medical Research*, 27(8), pp. 2374–2383. doi: 10.1177/0962280216680383.
- Herwaldt, B. L. (1992) 'The Natural History of Cutaneous Leishmaniasis in Guatemala', *Journal of Infectious Diseases*, 165(3), pp. 518–527. doi: 10.1093/infdis/165.3.518.
- José-López, R. (2012) 'Presumed brain infarctions in two dogs with systemic leishmaniasis', *Journal of Small Animal Practice*, 53(9), pp. 554–557. doi: 10.1111/j.1748-5827.2012.01259.x.
- José-López, R. *et al.* (2014) 'Intramedullary spinal cord mass presumptively associated with leishmaniasis in a dog', *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 244(2), pp. 200–204. doi: 10.2460/javma.244.2.200.
- Kolaczinski, J. H. *et al.* (2007) 'Kala-azar control, Uganda', *Emerging Infectious Diseases*, 13(3), pp. 507–509. doi: 10.3201/eid1303.060706.
- Kolaczinski, J. H. *et al.* (2008) 'Risk factors of visceral leishmaniasis in East Africa: A case-control study in Pokot territory of Kenya and Uganda', *International Journal of Epidemiology*, 37(2), pp. 344–352. doi: 10.1093/ije/dym275.
- Koutinas, A. F. *et al.* (1992) 'Skin Lesions in Canine Leishmaniasis (Kala-Azar): A Clinical and Histopathological Study on 22 Spontaneous Cases in Greece', *Veterinary Dermatology*, 3(3), pp. 121–130. doi: 10.1111/j.1365-3164.1992.tb00158.x.
- Koutinas, A. F. *et al.* (2001) 'A randomised, blinded, placebo-controlled clinical trial with allopurinol in canine leishmaniosis', *Veterinary Parasitology*, 98(4), pp. 247–261. doi: 10.1016/S0304-4017(01)00399-5.
- Kumar, R. and Nylén, S. (2012) 'Immunobiology of visceral leishmaniasis', *Frontiers in Immunology*, 3(251), pp. 1–10. doi: 10.3389/fimmu.2012.00251.
- Laurenti, M. D. *et al.* (2014) 'Comparative evaluation of the DPP® CVL rapid test for canine serodiagnosis in area of visceral leishmaniasis', *Veterinary Parasitology*, 205(3–4), pp. 444–450. doi: 10.1016/j.vetpar.2014.09.002.
- Millán, J. *et al.* (2013) 'Serosurvey of Dogs for Human, Livestock, and Wildlife Pathogens, Uganda', *Emerging Infectious Diseases*, 19(4), pp. 680–682. doi: 10.3201/eid1904.121143.
- Miranda, S. *et al.* (2008) 'Characterization of sex, age, and breed for a population of canine leishmaniosis diseased dogs', *Research in Veterinary Science*, 85(1), pp. 35–38. doi: 10.1016/j.rvsc.2007.09.003.
- Molina, R. *et al.* (1994) 'Infectivity of dogs naturally infected with *Leishmania infantum* to colonized *Phlebotomus perniciosus*', *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 88(4), pp. 491–493. doi: 10.1016/0035-

9203(94)90446-4.

Muskus, C. E. and Marín Villa, M. (2002) 'Metacyclogenesis: a basic process in the biology of *Leishmania*', *Biomedica : revista del Instituto Nacional de Salud*, 22, pp. 167–177. doi: 10.7705/biomedica.v22i2.1156.

Nathan, C. (2006) 'Neutrophils and immunity: Challenges and opportunities', *Nature Reviews Immunology*, pp. 173–182. doi: 10.1038/nri1785.

Noli, C. and Saridomichelakis, M. N. (2014) 'An update on the diagnosis and treatment of canine leishmaniosis caused by *Leishmania infantum* (syn. *L.-chagasi*)', *Veterinary Journal*, 202(3), pp. 425–435. doi: 10.1016/j.tvjl.2014.09.002.

Odoch, W. D. and Olobo, J. O. (2013) 'Prevalence of kala-azar infection in Pokot county, Amudat district, Northeastern Uganda', *Open Journal of Epidemiology*, 3(4), pp. 203–208. doi: 10.4236/ojepi.2013.34029.

Olobo-Okao, J. and Sagaki, P. (2014) 'Leishmaniasis in Uganda: Historical account and a review of the literature', *Pan African Medical Journal*, 18(16), pp. 1–7. doi: 10.11604/pamj.2014.18.16.1661.

Paltrinieri, S. *et al.* (2010) 'Guidelines for diagnosis and clinical classification of leishmaniasis in dogs', *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 236(11), pp. 1184–1191. doi: 10.2460/javma.236.11.1184.

Paltrinieri, S. *et al.* (2016) 'Laboratory tests for diagnosing and monitoring canine leishmaniasis', *Veterinary Clinical Pathology*, 45(4), pp. 552–578. doi: 10.1111/vcp.12413.

Peña, M. T. *et al.* (2008) 'Histopathological Features of Ocular Leishmaniosis in the Dog', *Journal of Comparative Pathology*, 138(1), pp. 32–39. doi: 10.1016/j.jcpa.2007.09.004.

Pereira, L. *et al.* (2018) 'Coinfection With *Trypanosoma brucei* Confers Protection Against Cutaneous Leishmaniasis', *Frontiers in immunology*, 9(2855), pp. 1–9. doi: 10.3389/fimmu.2018.02855.

Petanides, T. A. *et al.* (2008) 'Factors associated with the occurrence of epistaxis in natural canine leishmaniasis (*Leishmania infantum*)', *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 22(4), pp. 866–872. doi: 10.1111/j.1939-1676.2008.0129.x.

Plevraki, K. *et al.* (2006) 'Effects of allopurinol treatment on the progression of chronic nephritis in canine leishmaniosis (*Leishmania infantum*)', *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 20(2), pp. 228–233. doi: 10.1892/0891-6640(2006)20[228:EOATOT]2.0.CO;2.

Ready, P. D. (2014) 'Epidemiology of visceral leishmaniasis', *Clinical Epidemiology*, 4(6), pp. 147–154. doi: 10.2147/CLEP.S44267.

- Reithinger, R. (2007) 'Visceral leishmaniasis in eastern Africa - current status', *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 101(12–4), pp. 1169–1170. doi: 10.1016/j.trstmh.2007.06.001.
- Riera, C. *et al.* (1999) 'Serological and parasitological follow-up in dogs experimentally infected with *Leishmania infantum* and treated with meglumine antimoniate', *Veterinary Parasitology*, 84(1–2), pp. 33–47. doi: 10.1016/S0304-4017(99)00084-9.
- Rohousova, I. *et al.* (2015) 'Exposure to *Leishmania* spp. and sand flies in domestic animals in northwestern Ethiopia', *Parasites and Vectors*, 8(1), pp. 1–10. doi: 10.1186/s13071-015-0976-1.
- Santarém, N. *et al.* (2010) 'Application of an improved enzyme-linked immunosorbent assay method for serological diagnosis of canine leishmaniasis', *Journal of Clinical Microbiology*, 48(5), pp. 1866–1874. doi: 10.1128/JCM.02402-09.
- Saridomichelakis, M. N. *et al.* (2013) 'Thyroid function in 36 dogs with leishmaniosis due to *Leishmania infantum* before and during treatment with allopurinol with or without meglumine antimonate', *Veterinary Parasitology*, 197(1–2), pp. 22–28. doi: 10.1016/j.vetpar.2013.04.038.
- Saridomichelakis, M. N. and Koutinas, A. F. (2014) 'Cutaneous involvement in canine leishmaniosis due to *Leishmania infantum* (syn. *L. chagasi*)', *Veterinary Dermatology*, 25(2), pp. 61–71. doi: 10.1111/vde.12105.
- Shaw, S. E. (2009) 'Canine leishmaniosis in the United Kingdom: A zoonotic disease waiting for a vector', *Veterinary Parasitology*, 163(4), pp. 281–285. doi: 10.1016/j.vetpar.2009.03.025.
- Solano-Gallego, L. *et al.* (2001) 'Evaluation of the efficacy of two leishmanins in asymptomatic dogs', *Veterinary Parasitology*, 102(1–2), pp. 163–166. doi: 10.1016/S0304-4017(01)00527-1.
- Solano-Gallego, L. *et al.* (2011) 'LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniosis', *Parasites and Vectors*, 4(86), pp. 1–16. doi: 10.1186/1756-3305-4-86.
- Solano-Gallego, L. *et al.* (2014) 'Serological diagnosis of canine leishmaniosis: Comparison of three commercial ELISA tests (Leiscan®, ID Screen® and *Leishmania* 96®), a rapid test (Speed Leish K®) and an in-house IFAT', *Parasites and Vectors*, 7(11), pp. 1–10. doi: 10.1186/1756-3305-7-111.
- Soltis, R. D. *et al.* (1979) 'The effect of heat inactivation of serum on aggregation of immunoglobulins.', *Immunology*, 36(1), pp. 37–45.
- SPSS Inc (2008) 'SPSS statistics for windows, version 17.0', *Chicago: SPSS Inc.*
- Sunyoto, T. *et al.* (2018) 'Uncharted territory of the epidemiological burden of cutaneous leishmaniasis in sub-Saharan Africa-A systematic review', *PLoS neglected*

tropical diseases, 12(10), pp. 1–20. doi: 10.1371/journal.pntd.0006914.

Travi, B. L. *et al.* (2018) ‘Canine visceral leishmaniasis: Diagnosis and management of the reservoir living among us’, *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 12(1), pp. 1–13. doi: 10.1371/journal.pntd.0006082.

Troncarelli, M. Z. *et al.* (2009) ‘Leishmania spp. and/or Trypanosoma cruzi diagnosis in dogs from endemic and nonendemic areas for canine visceral leishmaniasis’, *Veterinary Parasitology*, 164(2–4), pp. 118–123. doi: 10.1016/j.vetpar.2009.06.027.

Velez, R. *et al.* (2019) ‘Seroprevalence of canine Leishmania infantum infection in the Mediterranean region and identification of risk factors: The example of North-Eastern and Pyrenean areas of Spain’, *Preventive Veterinary Medicine*, 162(October 2018), pp. 67–75. doi: 10.1016/j.prevetmed.2018.10.015.

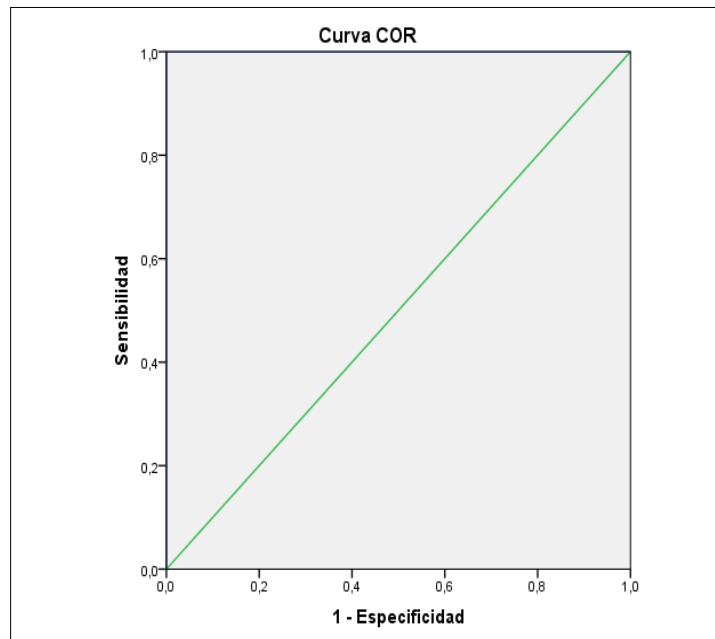
Viuelas, J. *et al.* (2001) ‘Meningeal leishmaniosis induced by Leishmania infantum in naturally infected dogs’, *Veterinary Parasitology*, 101(1), pp. 23–27. doi: 10.1016/S0304-4017(01)00413-7.

World Health Organization (2018) ‘WHO bi-regional consultation on the status of Leishmaniasis control and surveillance in East Africa’, *WHO*, pp. 1–41.

Zanette, M. F. *et al.* (2013) ‘Toxoplasma gondii , Neospora caninum and Babesia canis to Leishmania infantum chagasi tests in dogs’, *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, (February), pp. 7–9.

9. ANEXOS

Resumen de procesamiento de casos	
Outcome	N válido (por lista)
Positivo ^a	20
Negativo	30
Los valores más grandes de la(s) variable(s) de resultado de prueba indican una prueba mayor para un estado real positivo.	
a. El estado real positivo es 1.	



Anexo 1. Resultados obtenidos con la *ROC curve*. Punto de corte. positivas arriba de la línea. muestras negativas. debajo de la línea. Positivos (n=20) Negativos (n=30).

Anexo 2. Valor de corte obtenido. *ROC curve*. Sensibilidad de 100% y Especificidad de 100%

Coordenadas de la curva

Positivo si es mayor o igual que	Sensibilidad	1 - Especificidad
7,5950	1,000	,167
10,6750	1,000	,133
13,1500	1,000	,100
14,6800	1,000	,067
16,6800	1,000	,033
27,1550	1,000	,000
40,9250	,950	,000
45,8750	,900	,000
47,3750	,850	,000
51,0650	,800	,000
61,8500	,750	,000