

SEROPREVALENCIA DE LA LEISHMANIASIS VISCERAL CANINA MEDIANTE ELISA CON rK39 EN FOCOS ENDÉMICOS DE VENEZUELA

Seroprevalence of Canine Visceral Leishmaniasis by rK39-ELISA in Endemic Foci in Venezuela

Dennis A. Lugo*, María E. Ortega-Moreno*, Vestalia Rodríguez*, Doris C. Belizario*, Wilmen A. Galindo*, Maira Cabrera González*, Olga Zerpa**, Martín A. Sánchez*¹

*Instituto de Biomedicina Dr. Jacinto Convit. Universidad Central de Venezuela - Ministerio del Poder Popular para la Salud (UCV-MPPS). San Nicolás a Providencia. Parroquia San José. Caracas 1010A, Venezuela.

**Instituto Médico la Floresta, Av. ppal. de la Floresta con Calle Santa Ana; Caracas 1060, Venezuela

Correo-E: martinsanchez1@gmail.com

Recibido: 13/11/14 - Aprobado: 15/07/15

RESUMEN

En el presente trabajo se presenta la seroprevalencia de la leishmaniasis visceral canina (LVC), zoonosis causada por *Leishmania infantum/chagasi*. Se realizaron pruebas serológicas y examen clínico a 15.822 perros de 13 entidades federales endémicas para la leishmaniasis visceral en Venezuela, en el periodo 2004-2012. Los sueros fueron analizados mediante ELISA con el antígeno recombinante rK39. Los resultados muestran que 14,8% de la población de caninos son positivos para LV. Los estados Lara (19%) y Guárico (18%) mostraron una mayor prevalencia de la enfermedad. Sin embargo, para los años 2010-2012, la prevalencia de la LVC para las entidades federales como Anzoátegui, Aragua, Carabobo, Cojedes, Nueva Esparta y Sucre se mantuvieron entre un 3% y un 31%. Los caninos seropositivos (67,1% machos y 32,9% hembras) tenían edades promedio de $4,8 \pm 2,9$ años. El 81% de los caninos seropositivos encontrados en estas zonas, no presentó signos clínicos característicos de LVC, mientras que la clínica presentada por el resto fueron ulceraciones cutáneas (8,5%), alopecia (9,4%) y onicogriphosis (19,2%). Este reporte muestra la distribución geográfica (tanto en zonas rurales como urbanas) y características

ABSTRACT

This study discloses the seroprevalence of canine visceral leishmaniasis (CVL), a zoonotic disease caused by *Leishmania infantum/chagasi*. In this study, serological tests and clinical examinations were performed in 15,822 dogs from 13 federal entities endemic for visceral leishmaniasis in Venezuela, during the period 2004-2012. Serum samples were analysed by ELISA against the recombinant antigen rK39. Results demonstrated a prevalence of 14.8% of positive dogs for VL. Lara (19%) and Guárico (18%) states showed the highest seroprevalence of the disease. However, for the years 2010-2012, the prevalence of CVL for federal entities as Anzoátegui, Aragua, Carabobo, Cojedes, Nueva Esparta, and Sucre remained between 3% and 31%. The seropositive canines (67.1% males and 32.9% females) average 4.8 ± 2.9 years of age and 81% of the dogs found in these endemic areas did not show clinical signs characteristic of LVC, while clinical symptoms presented by the rest were skin ulceration (8.5%), alopecia (9.4%) and onychogryphosis (19.2%). This report demonstrates the geographical distribution (both rural and urban) and most striking clinical features of parasitized dogs in different endemic regions of the country, in order

¹ A quien debe dirigirse la correspondencia (To whom correspondence should be addressed)

clínicas más resaltantes de perros parasitados en las diferentes regiones endémicas del país, con el fin de tomar medidas estratégicas que fortalezcan los programas de control y prevención de esta zoonosis problema de salud pública.

(Palabras clave: Estudios seroepidemiológicos perro; endemia; leishmaniasis; elisa; leishmaniasis; zoonosis)

to take strategic actions to strengthen the control and prevention programs of this public health problem.

(Key words: Seroepidemiologic studies; dogs, endemics, leishmaniasis, elisa, leishmaniasis; zoonoses)

INTRODUCCIÓN

La leishmaniasis visceral (LV) o *kala-azar* es una enfermedad zoonótica considerada un problema de salud pública a nivel mundial. Es producida por un protozoo del género *Leishmania* de la familia Trypanosomatidae. Estos parásitos digenéticos, presentan dos estadios durante su ciclo de vida: el promastigote, forma extracelular flagelada y una forma redondeada intracelular aflagelada, la cual se denomina amastigote [1,2], ésta se multiplica en células mononucleares fagocíticas. La forma promastigote es transmitida a algunos mamíferos, entre ellos los humanos, por la picadura del insecto vector del género *Lutzomyia* en América y *Phlebotomus* Europa, Asia y África [3-6].

En América, la LV fue descrita por primera vez en 1913 por Migone en La Asunción, Paraguay, en un paciente proveniente de Mato Grosso, Brasil [7]. En Venezuela, Martínez y Pons en 1941, dan a conocer el primer caso autóctono de LV humana procedente del estado Guárico [8]; años después, Medina en 1960, describió el primer hallazgo para Venezuela, de perros infectados con *Leishmania* [9]. Posteriormente, Torrealba en 1970, publica una inspección de 112 perros en zonas rurales del estado Guárico, de los cuales, aproximadamente el 10% estaba infectado con esta parasitosis [10], así mismo se reporta en el 2003, de un total de 3.025 perros, un 13,2% fueron seropositivos a Leishmaniasis visceral canina (LVC) en diferentes focos endémicos del país [11].

Varios estudios han demostrado que los perros domésticos son los reservorios principales para la *L. infantum/chagasi*. Los perros infectados desarrollan la LVC [5, 12, 13], infección crónica de la que un gran porcentaje no presenta signos clínicos (asintomáticos), manteniendo la infección en un estado subclínico que puede durar un largo

período de tiempo sin evolucionar a una enfermedad activa. Sin embargo, la progresión de la enfermedad genera la aparición de signos clínicos y el deterioro de la inmunidad (sintomáticos), que eventualmente conlleva a la muerte del animal [5, 13, 14].

El cuadro clínico de la LVC está caracterizado por una gran diversidad de signos y lesiones que dependen del estado inmune del animal, del grado de infección, del tiempo de evolución de la enfermedad y de los órganos afectados [5, 11, 15]. Las características clínicas pueden incluir: dermatitis, alopecia, ulceración cutánea, onicogriposis, problemas de locomoción, anorexia, pérdida de peso, linfadenopatía, caquexia, lesiones oculares, esplenomegalia, hepatomegalia e insuficiencia renal [14, 16, 17]. En la fase terminal de la enfermedad puede producirse nefritis, paresias, parálisis, hiperestesia e hipoestesia con congestión de las meninges, caquexia y muerte del perro. Sin embargo, se ha reportado que más de la mitad de los animales infectados son asintomáticos [14, 18], pero son capaces de transmitir el parásito al vector [19,20], representando un grave problema ya que contribuye con el mantenimiento del ciclo de vida de la *Leishmania* y la transmisión a humanos.

Actualmente, en el diagnóstico serológico se detectan anticuerpos anti-leishmania, lo cual constituye una evaluación temprana, rápida, fácil, efectiva que es utilizada tanto para el diagnóstico en humanos como en perros. Entre las pruebas de diagnóstico usadas se dispone de la inmunofluorescencia indirecta (IFI), la prueba de aglutinamiento directo (DAT) y las pruebas inmunoenzimáticas como el ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) [12, 21]. Esta última puede ser fácilmente aplicada a un gran número de muestras y posee un alto nivel de especificidad y sensibilidad [22-24]. Si bien las pruebas convencionales de ELISA utilizan parásitos completos o fracciones de antígenos del parásito, son muy sensibles y pueden resultar poco específicas

debido a las reacciones cruzadas con otras especies del parásito u otros tripanosomátidos como *T. cruzi*, más si se trata de zonas en las cuales ambas enfermedades pueden coexistir. Este inconveniente se sobrepone con el uso de antígenos recombinantes, como el rK39, que ha demostrado ser una herramienta altamente específica para la detección de perros infectados con *L. infantum/chagasi*, con un índice de alrededor del 97% de especificidad y sensibilidad [12, 24-27].

El presente trabajo evaluó la seroprevalencia de la LVC en los focos endémicos de Venezuela, relacionando la seropositividad al ELISA-rK39 con la presencia o no de signos clínicos en estos caninos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los sueros y los datos clínicos de los caninos estudiados fueron tomados por cada uno de los servicios de dermatología sanitaria regionales, conjuntamente con la coordinación regional de zoonosis adscrita al Ministerio del Poder Popular para la Salud (MPPS) en los diferentes focos endémicos en los estados del país evaluados, en el marco del Programa Control de la LV en Venezuela [28]. Las muestras fueron enviadas y procesadas en el Laboratorio de Inmunología II del Instituto de Biomedicina Dr. Jacinto Convit, Caracas, Dto. Capital, excepto para las muestras del estado Nueva Esparta, las cuales fueron procesadas en el Laboratorio de Leishmaniasis de la Corporación de Salud (CORPOSALUD) del MPPS-Nueva Esparta. Todos los métodos la recolección de datos y las muestras biológicas fueron realizados bajo consentimiento informado de los dueños de los perros, siguiendo las regulaciones éticas instauradas para el uso de animales de laboratorio establecidas en la Ley de Protección Animal y de acuerdo con el Código de Ética para la Vida del Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación (MPPCTI) [29]. La manipulación de los animales muestreados se llevó a cabo siguiendo los procedimientos incluidos en el Capítulo 3 del mencionado código de ética [29]. El consentimiento informado y la información recolectada por el estudio realizado en el estado Nueva Esparta, fue elaborado por el proyecto “Leishmaniasis Visceral Canina: Estudio Epidemiológico e Inmunológico en Focos Endémicos del estado Nueva Esparta del Principal Reservorio de la Enfermedad en Venezuela”, de acuerdo con los lineamientos del Código de Ética

para la Vida del MPPCTI y aprobado por el Comité de Bioética del Instituto de Biomedicina UCV-MPPS.

Área de Estudio, Población de Animales y Toma de las Muestras Serológicas

Para la realización del estudio, se utilizaron 15.822 perros de diferentes regiones endémicas para la LVC en Venezuela, entre los años de 2004 al 2012 (Cuadro 1).

Muestras de suero

La información de cada animal fue registrada en variables independientes: género, edad, presencia de ectoparásitos (pulgas y garrapatas) y condición clínica (ulceración cutánea, alopecia, adenomegalia, onicogriphosis, hepatomegalia y esplenomegalia). Las muestras de sangre completa fueron colectadas por venopunción de la vena cefálica o vena yugular y colocadas en tubos sin anticoagulante y centrifugadas a 380 g por 10 min. Se tomaron alícuotas de 0,5 mL de los sueros y se guardaron a -20°C, para su posterior estudio.

Prueba de ELISA específica contra recombinante rK39 de *Leishmania*

Las pruebas de ELISA fueron realizadas según protocolos descritos previamente [30-32]. Se sensibilizaron placas de poliestireno con 40 ng/pozo con antígeno recombinante rK39 y se incubaron con las muestras de sueros diluidas (1/100). Posteriormente, se colocó un anticuerpo secundario contra IgG canina conjugado a peroxidasa, se reveló con peróxido de hidrógeno y orto-fenilendiamina. Se

Cuadro 1. Áreas endémicas estudiadas de Leishmaniasis Visceral Canina en Venezuela, periodo 2004 a 2012

Estados	Municipios	Área Endémica	Perros Examinados
Anzoátegui	9	36	508
Aragua	8	16	596
Bolívar	4	5	37
Carabobo	6	18	362
Cojedes	2	4	49
Falcón	1	1	8
Guárico	8	41	1.764
Lara	4	32	644
Monagas	1	1	97
Nva. Esparta	9	86	11.142
Sucre	4	16	591
Trujillo	2	2	10
Yaracuy	2	2	14
Total	60	260	15.822

estableció positividad a partir de 0,060 de densidad óptica, determinado con un punto de corte o *cut-off* (promedio \pm 2 desviaciones estándares) de densidad óptica obtenida con las muestras de 25 caninos controles sanos provenientes de cada foco endémico y no endémico para LV [30-32].

Análisis Estadístico

Las variables independientes, resultado del examen clínico y de las pruebas del diagnóstico por ELISA (rK39), fueron tabuladas y analizadas mediante estadística descriptiva, a través del *software* de Microsoft Excel versión 14.0 para Windows.

RESULTADOS

Del total de muestras (15.822) analizadas, 2.339 (14,8%) resultaron positivas por ELISA rK39, siendo las entidades federales más afectadas los estados Lara y Guárico con 19% y 18%, respectivamente (Figura 1), seguidas por los estados Anzoátegui (16%), Aragua (13%), Nueva Esparta (13%), Trujillo (10%), Sucre (9%), Yaracuy (7%), Carabobo (5%) y Cojedes (3%). Las muestras de perros recolectadas de los estados Monagas, Bolívar y Falcón, no dieron positividad a ELISA-rK39. Para las otras 11 entidades federales que conforman a Venezuela, no se poseen registros de toma de muestras de caninos, enviadas para su procesamiento mediante ELISA-rK39 a las diferentes instituciones involucradas en este estudio.

De los 2.339 caninos seropositivos (Cuadro 2), 67,1% eran machos, con edades comprendidas entre 1,8 y 7,7 años (edad promedio: $4,75 \pm 2,95$ años de edad). Las sintomatologías clínicas, más comunes fueron onicogriposis (19,2%) y ulceración cutánea (8,5%); sólo 0,68% de los perros enfermos presentó hepato/esplenomegalia. Por otro lado, el 14,1% de los perros con LVC, presentó ectoparásitos como garrapatas y/o pulgas.

El comportamiento de la enfermedad en este periodo de estudio (Cuadro 3), mostró que las entidades con mayor prevalencia de perros infectados (de los focos endémicos de los estados Lara, Nueva Esparta y Guárico), fueron las más afectadas durante todo el periodo, manteniéndose entre 9% y 23% la población de caninos infectados. Los focos del estado Lara tuvieron un mayor repunte de la enfermedad, con 20% para los años 2010 y 2011. La mayor ocurrencia de LVC para los focos en el estado Nueva Esparta se presentó entre

el periodo 2004-2007; posteriormente, decayó 12,5% para el 2011 y aumentó 5,5% para el último año de estudio. Por otro lado, durante los años 2008-2009, los focos de los estados Carabobo (16,9%) Por otro lado, se observa un incremento en la prevalencia de los focos de Carabobo (16,9%) y Sucre (11,6%) durante los años 2008 y 2009, y en los focos de Anzoátegui (31,2%) y Aragua (16,7%), en el año 2012. De los estados Bolívar, Cojedes, Falcón, Monagas, Trujillo y Yaracuy, el estudio se realizó en diferentes periodos de años, dando negativo para la LVC en los focos de los estados Bolívar, Falcón y Monagas, mientras que Trujillo y Yaracuy, en 2006-2007, mostraron 10% y 7%, respectivamente, de caninos con LV.

DISCUSIÓN

Las áreas de estudio que han sido reportadas como focos endémicos para la LV humana en Venezuela, con más de un caso anual, se encuentran en los estados Anzoátegui, Carabobo, Falcón, Guárico, Lara, Nueva Esparta, Portuguesa, Sucre y Trujillo [33]. Por este motivo, en el año 2003 en Venezuela se implementó un programa de control de leishmaniasis visceral [11, 28, 34], con el propósito de tratar de diagnosticarla precozmente, por medio de la vigilancia epidemiológica activa, con el fin de tomar las medidas de control pertinentes, como el control de vectores y la eliminación de los perros infectados que pudieran contribuir a disminuir la transmisión a otros perros y a los humanos [28, 35, 36].

La OMS no recomienda el tratamiento de perros infectados, por la posibilidad de generar cepas de *Leishmania* resistentes que luego podrían infectar a las poblaciones humanas [26]. En este reporte se encontró que todos los focos endémicos de las diferentes entidades federales para LV humana presentan LVC. Los focos de los estados Nueva Esparta, Guárico y Lara, en los últimos 10 años presentaron una tasa promedio de 2,4; 0,3 y 0,4 de LV humana por cada 100.000 habitantes en la población [33]. En cuanto a la enfermedad en caninos, también se encontró que los focos de Guárico y Lara presentan una alta prevalencia de LVC. En este sentido, el clima y la vegetación predominante en ambos estados, pudiera ser un factor contribuyente al establecimiento de focos endémicos. En Lara, la temperatura varía de acuerdo con la zona y la altitud. En las zonas de piedemonte y bosque espinoso tropical donde se ha identificado

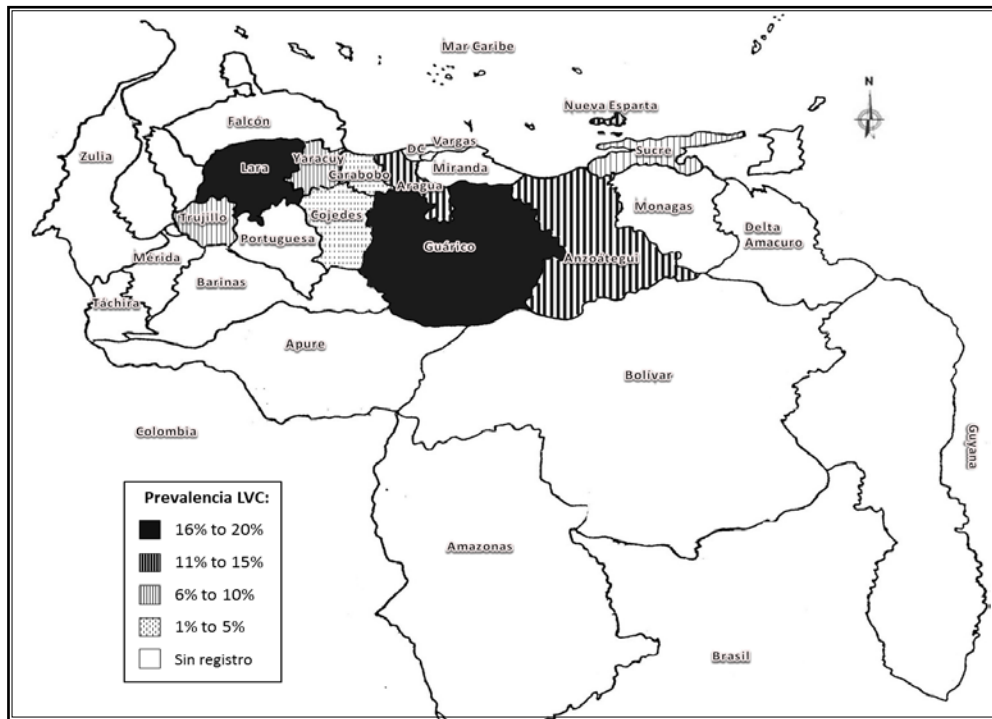


Figura 1. Distribución geográfica de la prevalencia de la leishmaniasis visceral canina en Venezuela para el periodo 2004-2012

Cuadro 2. Descripción de la población canina seropositiva a ELISA-rK39 en 13 entidades federales de Venezuela

VARIABLES	n	%
Perros examinados	15.822	
Positivo a ELISA.-rK39	2.339	14,78
Sexo:		
Machos	1.569	67,06
Hembras	770	32,94
Relación Machos/Hembras	2:1	
Edad:		
Promedio (años ± DE)	4,75 ± 2,95	
Edad más frecuente	2	
Presencia de ectoparásitos (pulgas y/o garrapatas)	330	14,11
Signos clínicos:		
Úlceras cutáneas	199	8,51
Alopecia	220	9,41
Onicogrifosis	448	19,15
Linfadenopatía	75	3,21
Hepatomegalia	16	0,68
Esplenomegalia	16	0,68

DE: Desviación Estándar

el vector *L. pseudolongipalpis*, la temperatura media anual es de 24°C y la precipitación anual es de 250 a 500 mm, con periodos bien marcados de sequía y lluvia. Así mismo, en Guárico, las temperaturas oscilan entre 24 y 37°C con pluviosidad anual que puede fluctuar entre 929 a 1.423 mm [37, 38]. Igualmente en Nueva Esparta, el clima de bosque espinoso asociado a las estacionalidad de las precipitaciones, pudiera favorecer el establecimiento de los focos geográficamente distribuidos en las zonas de piedemonte [12]. Si bien la co-infección con otras flagelosis pudiera representar un factor de riesgo para LVC, a pesar de no contar con controles para determinar otras parasitosis hemáticas en todas las áreas de estudio, en Nueva Esparta, un análisis de 140 sueros caninos positivos a *Leishmania infantum* resultaron entre un 1,8% de positividad para *T. evansi* y *T. gondii*, además de un 17% fue positivo para *T. cruzi*, mediante la técnica de MABA, utilizando antígenos crudos. En el mismo análisis, se corroboró mediante ELISA específica para antígenos de *T. cruzi*, que esos perros eran negativos para Chagas, por lo que la co-infección con otras parasitosis hemáticas es muy baja [39].

Los perros que viven en zonas endémicas de LV, sobre todo los perros cazadores y de guardia que pasan

Cuadro 3. Prevalencia de casos de Leishmaniasis Visceral Canina en 13 estados de Venezuela

Entidad Federal	2004-2005				2006-2007				2008-2009				2010-2011				2012			
	Examinados		Positivo		Examinados		Positivo		Examinados		Positivo		Examinados		Positivo		Examinados		Positivo	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
Anzoátegui	274	23	8,4	77	17	22,1	95	11	11,6	46	5	10,9	16	5	31,2					
Aragua	191	30	15,7	274	27	9,9	62	10	16,1	57	8	14,1	12	2	16,7					
Bolívar	32	0	0,0	5	0	0,0	0	0	0,0	0	0	0,0	0	0	0,0					
Carabobo	160	0	0,0	78	4	5,1	89	15	16,8	35	2	5,7	0	0	0,0					
Cojedes	0	0	0,0	0	0	0,0	30	1	3,3	19	1	5,3	0	0	0,0					
Falcón	0	0	0,0	8	0	0,0	0	0	0,0	0	0	0,0	0	0	0,0					
Guárico	275	60	21,8	858	172	20,1	190	18	9,5	271	41	15,1	170	40	23,5					
Lara	402	68	16,9	53	9	16,9	85	10	11,8	35	7	20,0	69	8	11,6					
Monagas	0	0	0,0	0	0	0,0	95	0	0,0	2	0	0,0	0	0	0,0					
Nva. Esparta	468	91	19,4	5.168	1016	19,7	3.269	382	11,7	1.538	111	7,2	699	89	12,7					
Sucre	87	4	4,6	104	10	9,6	215	25	11,6	175	15	8,6	10	0	0,0					
Trujillo	0	0	0,0	10	1	10,0	0	0	0,0	0	0	0,0	0	0	0,0					
Yaracuy	0	0	0,0	14	1	7,1	0	0	0,0	0	0	0,0	0	0	0,0					
Total	1.889	276	14,6	6.649	1257	18,9	4.130	472	11,4	2.178	190	8,7	976	144	14,7					

la noche al aire libre, están expuestos a ser picados por vectores de *Lutzomyia* infectados [26]. Aunque actualmente está en discusión cómo los perros infectados con *Leishmania* intervienen en el incremento de la Leishmaniasis humana (35), no se puede descartar el factor de riesgo que representan estos perros infectados, especialmente los asintomáticos.

Si bien puede definirse a la LV como una endemia rural ésta puede desplazarse a zonas urbanas marginales. En Venezuela, en 1998 se publicó el primer reporte epidemiológico de LV urbana en el estado Carabobo (40). En este trabajo se encontraron perros infectados tanto en focos endémicos rurales, como urbanos de las diferentes entidades federales de Venezuela, en concordancia con lo reportado por otros autores para los focos de los estados Nueva Esparta, Carabobo, así como para otras entidades [10, 11, 40-44], indicando un alerta para los sectores que presentan reservorios y/o al vector involucrado en la eco epidemiología de la *Leishmania*.

El 81% de los caninos encontrados en los diferentes focos endémicos no presentaron signos clínicos característicos para LVC; sin embargo, el resto de los caninos seropositivos (19%) presentaron al menos un signo clínico, entre ellos: ulceración cutánea (Figura 2A-B), alopecia (Figura 2C) y onicogriposis, Caquexia (Figura 2D) (Figura 2E). Aunque, algunas evidencias indican que el 15% de animales infectados son capaces de recuperarse sin tratamiento [45], debe ser considerado como una señal de alerta de los signos clínicos para LVC, ya que estos son variables y pueden pasar desapercibidos, confundiendo con otros tipos de enfermedades infecciosas causadas por otros parásitos [6, 11, 46].

El periodo de incubación de la LV en el perro varía de 2 a 12 meses y la vida media de un canino que la padezca es de 2,5 años [46, 47]. Esto es de sumo cuidado e importancia ya que las mascotas se convierten en reservorios del parásito en ambientes domésticos, generando un factor de riesgo para las personas que conviven con ellos, especialmente personas con compromiso inmunológico o niños menores a 10 años, grupo en el cual se reportan la mayoría de los casos de LV humana [11, 35, 40-50].

La variable sexo de los diferentes perros con LVC, no fue determinante debido a que la proporción de hembras y machos seropositivos fue similar. Por otro lado, se ha reportado que la edad es un indicador del grado de transmisión de la infección, siendo



Figura 2. Signos clínicos más comunes observados en caninos con LV en Venezuela. **A-B:** Úlceras cutáneas; **C:** Alopecia; **D:** Pérdida de peso; **E:** Onicogriposis; **F:** Esplenomegalia

la prevalencia de los casos con LVC mayor en animales de hasta tres años de edad [51]. La edad promedio encontrada en el presente trabajo para la población infectada fue de $4,75 \pm 2,95$ años, el cual es indicativo de que la prevalencia de la enfermedad está relacionada con perros jóvenes. En este sentido, son los perros adultos jóvenes los más expuestos a las picaduras del insecto vector pues tienden a ser “culturalmente” los más activos, ya que en las prácticas de tenencia y cuidado de los caninos en la población venezolana, se reporta que los cachorros y los perros de avanzada edad tienden a mantenerse más dentro del domicilio en las horas de alimentación del vector en comparación con los perros adultos jóvenes [15].

Los perros están jugando un papel dentro de la ecoepidemiología de la LV en Venezuela, con capacidad de establecer patrones zoonóticos silenciosos, gracias al vínculo que ellos poseen tanto con los humanos como con el hábitat silvestre. Los perros, generalmente, son escogidos como animales de compañía y/o de guardia pasando la noche al aire libre, aumentando la probabilidad de ser picados por los vectores infectados [50, 52]. Sin embargo, siendo el perro un animal de compañía y reservorio silencioso, puede generar brotes en cualquier región,

no solo en las zonas endémicas, debido a que sus dueños pueden migrar con estos animales de una región a otra, ocasionando brotes de LV en zonas no endémicas; por eso es importante conocer y manejar los diferentes factores que intervienen en la ecoepidemiología de la LV, para realizar una buena estrategia de control de esta enfermedad. En este sentido, aproximaciones como la educación continua y la vigilancia epidemiológica con participación de la comunidad en las áreas endémicas, podrían representar una herramienta de gran alcance en los programas de control con el fin de prevenir la enfermedad.

CONCLUSIONES

La LV canina es endémica en la mayor parte del país con una prevalencia del 14,8% de perros positivos en los focos endémicos estudiados. De las 13 entidades federales evaluadas del país, los estados con mayor prevalencia de LVC fueron los focos de los estados Lara (19%), Guárico (18%) y Anzoátegui (16%), durante los ocho años de estudio. Los perros jóvenes adultos entre 2-8 años de edad pueden ser los más susceptibles de adquirir la enfermedad. Variables como el sexo y la presencia o no de ectoparásitos no fueron factores de riesgo determinantes al no mostrar diferencias.

DECLARACIÓN DE CONFLICTO DE INTERÉS

Los autores declaran expresamente que no hubo conflicto de intereses durante el desarrollo de este trabajo.

APORTE DE LOS AUTORES AL TRABAJO

DAL, MEOM, VR, DCB, WAG, MCG, OZ y MAS: Fase experimental, análisis de los datos y edición del manuscrito.

AGRADECIMIENTOS

Al personal médico y técnico pertenecientes a los Servicios de Dermatología Sanitaria Regionales, Zoonosis Regional y Malariología Regional de las diferentes entidades federales incluidas en el estudio, por su diligencia en la recolección de las muestras de los caninos y por el reporte clínico de las diferentes

poblaciones de estudio. Financiado parcialmente por: FONACIT G-2005000375-MS, PEII 2012000976, CDCH-UCV PSU-09-7878-2009.

REFERENCIAS

1. Chang KP, Fong D, Bray RS. *Leishmania* sis. Amsterdam: Elsevier; 1985.
2. Mendoza-León A, Shaw JJ, Tapia FJ. A guide for the Cutaneous Leishmaniasis Connoisseur. En: Tapía FJ, Cáceres Dittmar G, Sánchez MA ed. Molecular and immune mechanisms in the pathogenesis of cutaneous Leishmaniasis. Austin: RG Landes Co. Bioscience Publishers; 1996; p.1-23.
3. Murray HW, Berman JD, Davies CR, Saravia NG. Advances in Leishmaniasis. *The Lancet*. 2005; 366:1561-77.
4. Guerin PJ, Olliaro P, Sundar S, Boelaert M, Croft SL, Desjeux P, Wasunna MK, Bryceson AD. Visceral Leishmaniasis: current status of control, diagnosis, and treatment, and a proposed research and development agenda. *The Lancet Infect Dis*. 2002; 2:494-501.
5. Sánchez MA, Díaz NL, Zepa O, Negrón E, Convit J, Tapia FJ. Organ-specific immunity in canine visceral Leishmaniasis: analysis of symptomatic and asymptomatic dogs naturally infected with *Leishmania chagasi*. *Am J Trop Med Hyg*. 2004; 70:618-24.
6. Vélez ID, Robledo S, Torres C, Carrillo L, López L, Muskus CE, Marin M, Zuleta M, Cardona EM, Contreras MA, Hoyos R, Mondragón K, Acosta LA, Cadena H, Vivero RJ, Valencia A, Rocha RL, Vélez A. Manual de procedimientos para el diagnóstico y control de la Leishmaniasis en Centroamérica. Colombia: PECET Medellín; 2010.
7. Migone LE. Un caso de Kalazar en Assunción (Paraguay). *Bull Soc Pathol Exot*. 1913; 6:118-20.
8. Martínez NA, Pons AR. Primer caso de kala-azar en Venezuela. *Gaceta Med Caracas*. 1941; 48:329-32.
9. Medina R, Romero J, Goldman C, Espin J. Comprobación del Primer Perro Infectado en Venezuela. *Gaceta Medica Caracas*. 1960; 441-47.
10. Torrealba J. Observaciones sobre diagnóstico, terapéutica y evaluación de la Leishmaniasis visceral humana y canina. Venezuela: Universidad de Carabobo; 1970. Tesis Doctoral. 367 pp.
11. Zepa O, Ulrich M, Borges R, Rodríguez V, Centeno M, Negrón E, Belizario D, Convit J. Epidemiological aspects of human and canine visceral Leishmaniasis in Venezuela. *Rev Panam Salud Pública*. 2003; 13:239-45.
12. Zepa O, Ulrich M, Negrón E, Rodríguez N, Centeno M, Rodríguez V, Barrios RM, Belizario D, Reed S,

- Convit J. Canine visceral Leishmaniasis on Margarita Island (Nueva Esparta, Venezuela). *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2000; 94:484-87.
13. Grimaldi Jr G, Tesh RB, McMahon-Pratt D. A review of the geographic distribution and epidemiology of Leishmaniasis in the New World. *Am J Trop Med Hyg.* 1989; 41:687-725.
14. Alvar J, Canavate C, Molina R, Moreno J, Nieto J. Canine Leishmaniasis. *Adv Parasitol.* 2004; 57:1-88.
15. Sánchez M, Tapia F. Inmunología de la Leishmaniasis Visceral Canina. *Bol Malariol Salud Ambient.* 2005; 45:81-88.
16. Koutinas AF, Polizopoulou ZS, Saridomichelakis MN, Argvriadis D, Fytianou A, Plevraki KG. Clinical considerations on canine visceral Leishmaniasis in Greece: a retrospective study of 158 cases (1989-1996). *J Am Anim Hosp Assoc.* 1999; 35:376-83.
17. Lombardo G, Pennisi MG, Lupo T, Chicharro C, Solano-Gallego L. Papular dermatitis due to *Leishmania infantum* infection in seventeen dogs: diagnostic features, extent of the infection and treatment outcome. *Parasites Vectors.* 2014; 7:120.
18. Solano-Gallego L, Morell P, Arboix M, Alberola J, Ferrer L. Prevalence of *Leishmania infantum* infection in dogs living in an area of canine Leishmaniasis endemicity using PCR on several tissues and serology. *J Clin Microbiol.* 2001; 39:560-3.
19. Guarga JL, Lucientes J, Peribáñez MA, Molina R, Gracia MJ, Castillo JA. Experimental infection of *Phlebotomus perniciosus* and determination of the natural infection rates of *Leishmania infantum* in dogs. *Acta Trop.* 2000; 77:203-7.
20. Pennisi MG. Leishmaniosis of companion animals in Europe: An update. *Vet Parasitol.* 2015; 208:35-47.
21. Reed S. Diagnosis of Leishmaniasis. *Clin Dermatol.* 1996; 14:471-8.
22. Scalone A, De Luna R, Oliva G, Baldi L, Satta G, Vesco G, Mignone W, Turilli C, Mondesire RR, Simpson D, Donoghue AR, Frank GR, Gradoni L. Evaluation of the *Leishmania* recombinant rK39 antigen as a diagnostic marker for canine Leishmaniasis and validation of a standardized enzyme-linked immunosorbent assay. *Vet Parasitol.* 2002; 104:275-85.
23. Schallig HD, Canto-Cavaleiro M, Silva ES. Evaluation of the direct agglutination test and the rK39 dipstick test for the sero-diagnosis of visceral Leishmaniasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2002; 97:1015-18.
24. Terán-Ángel G, Rodríguez V, Silva R, Zepa O, Schallig H, Ulrich M, Cabrera M. Non invasive diagnostic tools for visceral Leishmaniasis: A comparison of the immunoserological tests DAT, rK26 and rK39. *Biomedica.* 2010; 30:39-45.
25. Goto Y, Howard RF, Bhatia A, Trigo J, Nakatani M, Netto EM, Reed SG. Distinct antigen recognition pattern during zoonotic visceral Leishmaniasis in humans and dogs. *Vet Parasitol.* 2009; 160:215-20.
26. WHO. Control of the Leishmaniases. Suiza: WHO. 2010.
27. Peixoto HM, Fernandes MR, Sierra GA. Serological diagnosis of canine visceral Leishmaniasis in Brazil: systematic review and meta-analysis. *Trop Med Int Health.* 2015; 20:334-52.
28. Zepa O, Ulrich M, Convit J, Benítez M, Blanco B, Feliciangeli D, Negrón E, Rodríguez N, Sánchez M, Tapia F, García B. Programa Control de la Leishmaniasis Visceral en Venezuela. Venezuela: Instituto de Biomedicina. 2003.
29. Ministerio del Poder Popular para la Ciencia, Tecnología e Industrias Intermedias. Código de Ética para la Vida. Caracas; 2010.
30. Ulrich M, Rodríguez V, Centeno M, Convit J. Differing antibody IgG isotypes in the polar forms of leprosy and cutaneous Leishmaniasis characterized by antigen-specific T cell anergy. *Clin Exp Immunol.* 1995; 100:54-8.
31. Rodríguez V, Ulrich M, Centeno M, Zepa O. Antígenos recombinantes en el diagnóstico de Leishmaniasis visceral humana y canina. *Acta Científica Venezuela.* 2002; 53:213.
32. Rodríguez V, Zepa O, Reed S, Ulrich M. Caracterización parcial de la reactividad serológica del antígeno rK26 de *Leishmania chagasi*. *Acta Científica Venezuela.* 2004; 55:210.
33. MPPS, SAIB, UI, Jed. Informe de la Tasa de Incidencia de Leishmaniasis visceral. Venezuela: Instituto de Biomedicina. 2011.
34. Feliciangeli M, De Lima H, Delgado O, Borges R, Zepa O, Mazzarri M, Dos Santos ML, Galindo W, García JG, Delgado de Villarreal D, Mendoza I, Moreno M, Castrillo A. Manual para la prevención y la atención del paciente con Leishmaniasis visceral en Venezuela. Maracay, Venezuela. 2010.
35. Otranto D, Dantas-Torres F. The prevention of canine Leishmaniasis and its impact on public health. *Trends Parasitol.* 2013; 29:339-45.
36. Sánchez M, Alfonzo E, Moreno M, García B, Salgado A, Zepa O. Impact of the control program on visceral Leishmaniasis in Nueva Esparta Estate Venezuela. 2013. Worldleish 5 Fifth World Congress Leishmaniasis, Pernambuco, Brasil (Abstr.).
37. Arrivillaga J. Identificación isoenzimática de *Lutzomyia pseudolongipalpis*, nueva especie vector de Leishmaniasis visceral en Venezuela. Nota técnica. *Revista Científica, FCV-LUZ.* 2009; 14:339-42.

38. Feliciangeli MD, Delgado O, Suarez B, Bravo A. Leishmania and sand flies: proximity to woodland as a risk factor for infection in a rural focus of visceral Leishmaniasis in west central Venezuela. *Trop Med Int Health*. 2006; 11:1785-91.
39. Sanchez MA, Delgado O, Coraspe V, Rodriguez-Morales AJ, Moreno M, Toro JV, Alfonso E. Reactivity analysis to antigens of different zoonotic organisms in dogs with Visceral Leishmaniasis from La Guardia, Nueva Esparta State, Venezuela. 2009. Worldleish 4th World Congresss Leishmanaisis, Lucknow, India (Abstr.).
40. Aguilar CM, Fernández E, Fernández R, Cannova DC, Ferrer E, Cabrera Z, Souza WJ, Coutinho SG. Urban visceral Leishmaniasis in Venezuela. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1998; 93:15-6.
41. Alves WA, Bevilacqua PD. Reflexões sobre a qualidade do diagnóstico da leishmaniose visceral canina em inquéritos epidemiológicos: o caso da epidemia de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, 1993-1997. *Cad Sau de Pública*. 2004; 20:259-65.
42. Fernández J, Bello F, López MC, Moncada LI, Vargas JJ, Ayala MS, Nicholls RS, Lozano CA. Seroprevalencia de leishmaniasis visceral canina en la comuna 8 de Neiva y en cuatro municipios de Huila, Colombia. *Biomedica*. 2006; 26:121-30.
43. Sousa S, Lopes AP, Cardoso L, Silvestre R, Schallig H, Reed SC, Cordeiro da Silva A. Seroprevalence survey of *Leishmania infantum* infection in dogs from northeastern Portugal. *Acta Trop*. 2011; 120(1-2):82-7.
44. Duprey ZH, Steurer FJ, Rooney JA, Kirchhoff LV, Jackson JE, Rowton ED, Schantz PM. Canine visceral Leishmaniasis, United States and Canada, 2000-2003. *Emerg Infect Dis*. 2006; 12:440-6.
45. Alvar J. El protozoo. Las Leishmaniasis de la biología al control. España: Junta de Castilla de León. 1997. p.17-31.
46. Alvar J, Molina R, San Andrés M, Tesouro M, Nieto J, Vitutia M, González F, San Andrés MD, Boggio J, Rodriguez F, et al. Canine Leishmaniasis: clinical, parasitological and entomological follow-up after chemotherapy. *Ann Trop Med Parasitol*. 1994; 88:371-8.
47. Cairo J. Clinical aspects of canine Leishmaniasis. *Canis et Felis*. 1997; 29:53-63.
48. Bejarano E, Uribe S, Rojas W, Vélez I, Ferrer E, Cabrera Z. Visceral Leishmaniasis in Venezuela. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1998; 93:15-6.
49. Moreira Jr ED, Souza VMD, Sreenivasan M, Lopes NL, Barreto RB, De Carvalho LP. Peridomestic risk factors for canine Leishmaniasis in urban dwellings: new findings from a prospective study in Brazil. *Am J Trop Med Hyg*. 2003; 69:393-7.
50. Travi BL, Tabares CJ, Cadena H, Ferro C, Osorio Y. Canine visceral Leishmaniasis in Colombia: relationship between clinical and parasitologic status and infectivity for sand flies. *Am J Trop Med Hyg*. 2001; 64:119-24.
51. Moreno J, Alvar J. Canine Leishmaniasis: epidemiological risk and the experimental model. *Trends in Parasitol*. 2002; 18:399-405.
52. Vulpiani MP, Lannetti L, Paganico D, Lannino F, Ferri N. Methods of Control of the *Leishmania infantum* Dog Reservoir: State of the Art. *Vet Med Int*. 2011; 2011:1-13.