

Estudio epidemiológico sobre leishmaniasis visceral en la región semiárida del occidente de Venezuela con especial referencia a la detección de infecciones inaparentes

Epidemiological study on visceral leishmaniasis in the semiarid region of western Venezuela with special reference to inapparent infections

Néstor Añez^{1*}, Agustina Rojas¹, Ery Vargas-Díaz², Vicente Medina², Gladys Crisante¹ & José Yancarlos Yépez²

"A VICENTE MEDINA *In Memoriam*"

RESUMEN

Se registra un estudio epidemiológico sobre leishmaniasis visceral (LV) llevado a cabo en localidades de la región semiárida noroccidental de Venezuela, donde previamente se había detectado casos activos de esta dolencia. Un total de 1036 individuos sin manifestaciones clínicas aparentes (SMCA) domiciliados en 25 localidades, y 67 perros, de 8 localidades, fueron examinados por métodos serológicos (TAD, IFI, ELISA) y ensayos de PCR. Los resultados revelan una seropositividad a la presencia de anticuerpos circulantes anti-*Leishmania infantum* (= *L. chagasi*) del 16,9% y 76,1% en humanos asintomáticos y perros, respectivamente. Los hallazgos serológicos fueron corroborados por la reactividad a la prueba de PCR, arrojando valores de 17,7% en humanos y 29,9% en caninos. Se demuestra la alta prevalencia de infecciones inaparentes por *L. infantum* en individuos asintomáticos, resultando más frecuentes y ampliamente distribuidas que las infecciones activas. Se discute su rol en la dinámica de transmisión de la LV. Se propone considerar el perro como factor importante en el mantenimiento de *L. infantum* como fuente de infección humana, corroborando su rol de reservorio de LV en el semiárido venezolano. Se identifican 12 especies flebotominas entre 6000 especímenes colectados en 12 localidades, detectándose un franco predominio de *Lutzomyia evansi* (66,6%) sobre *Lu. longipalpis* (14,9%). Se detecta en ambas especies infección natural por *L. infantum*, utilizando ensayos de PCR. Se concluye que la asociación de personas con LV, activas o SMCA; perros infectados con *L. infantum* y *Lu. evansi*, presente en todas las localidades; aunada a las pobres condiciones sanitarias y/o nutricionales, son factores de riesgo suficientes para explicar la alta endemividad de la LV en la región semiárida del occidente de Venezuela.

Palabras clave: Leishmaniasis visceral, epidemiología, región semiárida, Venezuela

SUMMARY

An epidemiological study on visceral leishmaniasis (VL) in the semiarid region of western Venezuela, where some acute cases have been previously reported, is recorded. A total of 1036 symptomless people's sera samples from 25 villages, and 67 dogs from 8 different localities, were tested by using 3 different serologic methods (DAT, IFAT, ELISA) and the polymerase chain reaction assay (PCR). Serological tests revealed 16.9% and 76.1% seropositive to *Leishmania infantum* in asymptomatic humans and dogs, respectively. In addition, a PCR assay detected the presence of *L. infantum*-specific DNA in 17.7% of the symptomless sampled individuals and in 29.9% of the tested dogs. The combined analyses of serologic and molecular findings demonstrate the presence of subclinical or inapparent VL infections in local people from this part of western Venezuela. The observed prevalence of VL in asymptomatic people is by itself a matter of concern from the epidemiological point of view. The present results also serve to call the attention to the presence of infected dogs as a risk factor in the maintenance of *L. infantum* as a source for infection to humans in the studied semiarid region. A total of 12 sand fly species were identified from 6000 specimens collected in 12 sampled villages, with a predominance of *Lu. evansi* (66.6%) over *Lu. longipalpis* (14.9%). In both sand fly species natural infection by *L. infantum* was detected using a PCR assay. It is concluded that the association among VL infected people, *L. infantum*-infected dogs and the presence of *Lu. evansi*, together with the observed poor sanitary and/or nutritional conditions, are risk factors to explain the high endemicity by VL at the semiarid region of western Venezuela.

Key word: Visceral leishmaniasis, epidemiology, semiarid region, Venezuela

¹ Investigaciones Parasitológicas "J.F.Torrealba", Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de Los Andes, Mérida, 5101, Venezuela

² Unidad de Medicina Tropical y Parasitología "J.V.Scorza", Centro de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Experimental "Francisco de Miranda", Coro, Falcón, Venezuela

*Autor para correspondencia: nanes@ula.ve

INTRDUCCIÓN

La leishmaniasis visceral (LV), causada por *Leishmania infantum*, es una enfermedad ampliamente distribuida en, al menos, 60 países de las regiones tropicales y subtropicales, afectando gran parte de la población humana por lo que es considerada uno de los mayores problemas de salud pública existente en la actualidad. Lo anterior parece sustentarse en la alta endemicidad de la LV y en registros de incidencias de alrededor de 5×10^5 nuevos casos por año, lo cual ubican a la LV como la tercera causa de muerte o discapacidad en la población mundial después de la malaria y la TBC (WHO, 1996; Desjeux, 2001).

En Venezuela se reconocen en el presente tres focos endémicos de LV en las regiones central, oriental y occidental, habiéndose registrado en la última década cerca de 500 casos y una letalidad alrededor del 8% (Felicangeli *et al.*, 1999; Zerpa *et al.*, 2000; Ortiz *et al.*, 2003). Sin embargo, la cifra mencionada pareciera ser una subestimación sobre la casuística real de esta parasitosis si se considera la presencia de factores de riesgo en diversas regiones del territorio venezolano, agregándose a esto la existencia de infecciones asintomáticas o inaparentes en la población humana expuesta (Zerpa *et al.*, 2000). Sustentando la afirmación anterior, debe agregarse que infecciones inaparentes han sido previamente señaladas en malaria (Baliraine *et al.*, 2009; Diallo *et al.*, 2012); enfermedad de Chagas (Garnham, 1980; Añez *et al.*, 2001; 2011); leishmaniasis cutánea (Follador, 2002) y recientemente en LV (Almeida-Felipe *et al.*, 2011) coincidiendo los autores sobre la importancia bioepidemiológica de tales infecciones. El objetivo del presente trabajo es la detección de infecciones inaparentes por *Leishmania infantum* (= *L. chagasi*) en 1036 individuos asintomáticos y 67 perros provenientes de localidades rurales de la región semiárida del occidente de Venezuela. La existencia de infecciones inaparentes fue evidenciada evaluando los niveles de anticuerpos (Ac) circulantes anti-*Leishmania* por métodos serológicos, complementado con la detección y amplificación de ADN específico de *Leishmania* por ensayos de PCR en muestras de suero. Asimismo, el estudio incluye el registro de especies flebotomias y la detección, mediante ensayos de PCR, de la presencia de ADN de *Leishmania* en especímenes infectados capturados en diferentes localidades de los estados Falcón y Lara.

En todos los casos los individuos estudiados fueron muestreados en localidades con factores de riesgo similares a los detectados en los lugares de procedencia de pacientes con LV, previamente diagnosticados con infección activa, los cuales fueron tomados como referencia para el presente estudio e incluidos con propósitos comparativos.

MATERIALES Y METODOS

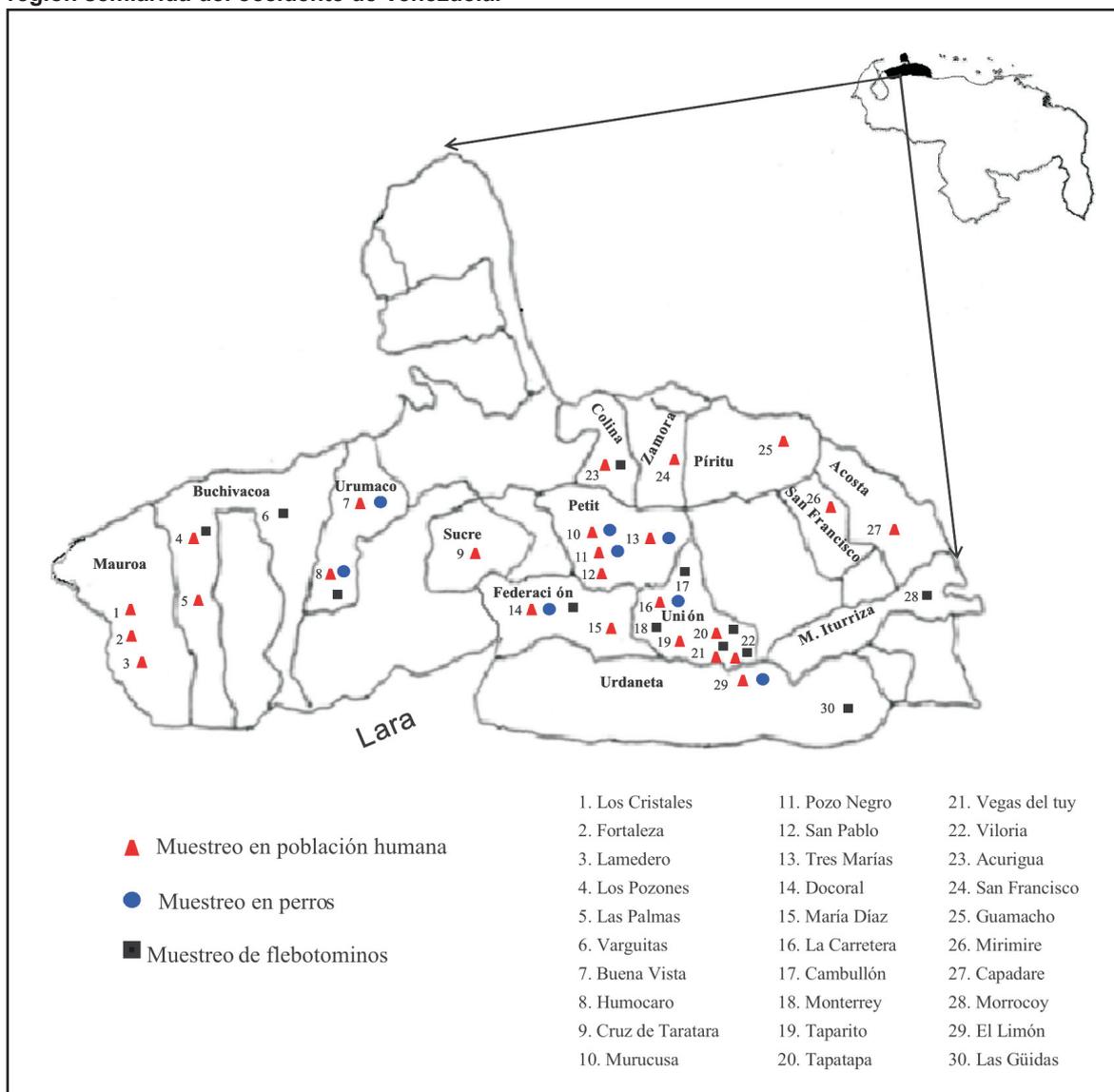
Area de estudio

Un total de 30 localidades ubicadas al noroeste de Venezuela fueron muestreadas en el presente estudio, 28 pertenecientes al estado Falcón ($10^{\circ} 18'08'' - 11^{\circ} 50'46''N$; $68^{\circ}14'28'' - 71^{\circ} 18'21''W$) y 2 en el territorio del estado Lara ($10^{\circ} 34'23''N - 69^{\circ} 41'53''W$). Las localidades estudiadas están comprendidas en el territorio ocupado por 14 municipios, 13 pertenecientes al estado Falcón y uno (Urdaneta) del estado Lara. Las mismas se encuentran ubicadas en altitudes comprendidas entre los 100 y 800 m.s.n.m.; con precipitaciones promedio entre 300 y 900 mm, humedad relativa cerca del 70% y temperatura promedio anual entre $22^{\circ}C$ y $28^{\circ}C$, siendo la zona de vida mayormente muestreada la correspondiente al bosque espinoso semiárido (Ewel *et al.*, 1976). La distribución geográfica, la identificación y ubicación por municipio de las localidades muestreadas para el estudio en la población humana, canina y flebotomina, se presentan en la Fig.1.

Población humana estudiada

Un total de 1036 individuos sin manifestaciones clínicas aparentes (SMCA), fueron muestreados en 25 de las 30 localidades arriba mencionadas con la finalidad de indagar sobre posible infección causada por *L. infantum*. La razón que justificó el presente estudio fue la detección previa de casos clínicos agudos de LV en niños de los municipios Mauroa, Buchivacoa, Urumaco, Federación y Unión del estado Falcón, además de un previo registro de alrededor del 20% de seropositividad en el municipio Urdaneta del estado Lara en el límite del mencionado municipio Unión (Vargas-Díaz *et al.*, 2004). El grupo estudiado estuvo constituido por 536 individuos del sexo femenino (51,7%) y 500 del sexo masculino (48,3%) con una relación de sexo hembra: macho de 1:0.9, siendo la edad promedio del grupo de 22 ± 16 años

Fig. 1. Ubicación geográfica de las localidades rurales muestreadas para la estimación de seroprevalencia de leishmaniasis visceral en humanos (▲) y perros (●) y para la captura de flebotominos (■) en la región semiárida del occidente de Venezuela.



con un rango de edad entre 1 y 86 años. Las condiciones de vida del total de individuos asintomáticos muestreados fueron similares a las de pacientes con LV, siendo algunos de ellos familiares o vecinos de los diferentes casos clínicos agudos registrados.

Población canina estudiada

De 8 localidades pertenecientes a 5 municipios de los 2 estados fueron muestreados 67 perros mestizos, pertenecientes a los individuos muestreados quienes

dieron su consentimiento para tomar las muestras a sus animales, bajo su supervisión directa. La selección de la muestra canina fue realizada tomando en consideración criterios clínicos y/o nutricionales sugeridos por un veterinario. El número de animales muestreados (N=67) fue el permitido por sus dueños al sugerírseles posible estado infeccioso, ya que la mayoría de ellos eran utilizados en las labores de caza. Los mismos pernoctaban en el peridomicilio o cerca de los corrales de animales. La ubicación de las localidades muestreadas se presentan en la Fig. 1.

Población flebotomina estudiada

La presencia de flebotominos fue detectada mediante capturas diurnas y nocturnas llevadas a cabo en el domicilio humano, el peridomicilio, en refugios naturales y corrales de animales domésticos, fundamentalmente cabras (*Capra hircus*) cuya explotación constituye el principal medio de subsistencia de algunos pobladores. La captura de los flebotominos fue llevada a cabo utilizando papel aceitado y aspiración directa con capturadores de vidrio en los refugios naturales, además de trampas lumínicas de Shannon y CDC. La descripción de los métodos de captura ha sido previamente reportada (Añez *et al.*, 1988; Maroli *et al.*, 1997). El estudio de la fauna flebotómica fue realizado en 12 localidades pertenecientes a 7 municipios de los dos estados incluidos (Fig. 1). La identificación de las especies colectadas una vez clarificadas y montadas fue llevada a cabo según Young & Duncan (1994). Para la detección de infección por *Leishmania* una alícuota de los flebotominos capturados (N=122) fue disecada, separando el tubo digestivo, el cual fue mantenido a -20°C para ser luego procesado mediante ensayos de PCR.

Obtención y procesamiento de muestras

En cada individuo o perro bajo estudio una muestra de sangre de 5ml o 3ml respectivamente, fue colectada por venopunción. Una vez centrifugada la sangre y obtenido el suero, el mismo fue separado en dos partes y preservado a -20°C. Una alícuota de la muestra fue utilizada para llevar a cabo ensayos de PCR y la otra para análisis serológicos por técnicas convencionales. Los métodos serológicos utilizados para detectar anticuerpos anti-*Leishmania* (Ac) incluyeron un test de aglutinación directa (TAD) pretratado con 2-mercaptoetanol, con una concentración final de 0,5 DO de antígeno crudo; un test de Inmunofluorescencia indirecta (IFI) conteniendo 40 promastigotes/campo microscópico de 400X y un ensayo inmunoenzimático (ELISA) con 4µg/µl de proteína soluble. Todas las pruebas fueron realizadas siguiendo procedimientos previamente estandarizados y adaptados en nuestro laboratorio, para detección de Ac anti-*Leishmania* (Añez *et al.*, 2000; 2007). Una dilución $\geq 1:64$ para TAD e IFI fue considerada como seropositiva, mientras que para ELISA una $DO \geq 0,4 \pm 2DE$ fue considerada para el mismo propósito. Las muestras fueron consideradas

como seropositivas cuando mostraron reactividad en al menos 2 de las 3 pruebas realizadas.

Los ensayos de PCR para detectar la presencia de ADN específico de *L. infantum* en muestras de suero humano y canino y del tracto digestivo de flebotominos disecados, fueron procesados utilizando iniciadores específicos derivados de secuencias teloméricas de *L. donovani* desarrollados por Chiurillo *et al.* (2000), los cuales han mostrado alta sensibilidad y especificidad para *L. donovani* y *L. infantum* (= *L. chagasi*). Los iniciadores utilizados fueron 5'CCCCGTCCTGTTGGAG 3' y 5'ACGGTGTACTGGTGTACTGG 3' y el procedimiento seguido según Chiurillo *et al.* (2001). Con el propósito de comparar los valores obtenidos en el análisis de las muestras colectadas en las localidades estudiadas, se incluye un grupo de pacientes con cuadros agudos de LV, previamente diagnosticados con la misma metodología utilizada en el presente trabajo.

Consideraciones éticas

En todos los casos un consentimiento escrito previa información (CPI) sobre el propósito del muestreo fue obtenido de cada individuo muestreado, o de su representante legal en caso de menores de edad, antes de proceder a la toma de muestra. Igualmente, el muestreo de los caninos se llevó a cabo previo consentimiento de sus dueños. El presente estudio fue aprobado por el Comité de Ética del decanato de medicina de la Universidad Nacional Experimental "Francisco de Miranda", Coro, Venezuela.

RESULTADOS

Detección de casos agudos de leishmaniasis visceral en la región semiárida del estado Falcón, Venezuela

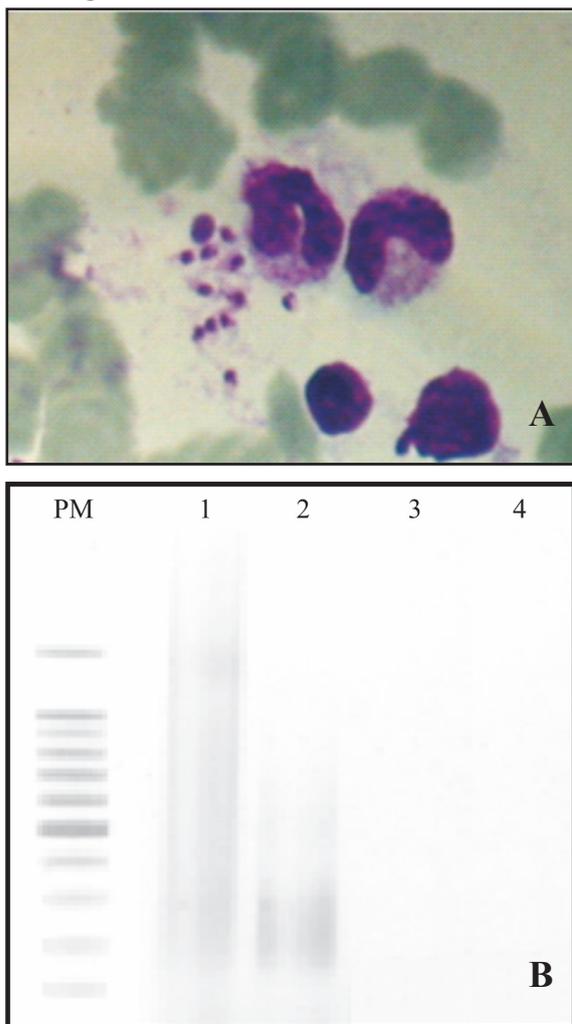
Previo al presente estudio un grupo de niños entre 1 y 13 años de edad, procedentes de 6 localidades de los municipios Mauroa, Buchivacoa, Urumaco, Federación y Unión del estado Falcón, fueron diagnosticados como casos agudos de LV. La presunción clínica estuvo basada en la detección de síndrome febril prolongado, hepatomegalia, desnutrición y anemia, con recomendación de reclusión hospitalaria. La confirmación diagnóstica fue realizada mediante exámenes microscópicos en muestras de médula ósea en extendidos coloreados

para la detección de amastigotes de *Leishmania*. Confirmada la presencia del parásito, el diagnóstico fue complementado con exámenes serológicos y la detección de ADN específico de *L. infantum* por ensayos de PCR. En la Fig. 2 (A) se muestra amastigotes de *Leishmania* de uno de los casos clínicos detectados y en (B) se presenta el resultado de la amplificación de ADN de *Leishmania* en muestra de suero de un caso activo de LV procedente

de la localidad de Humocaró municipio Urumaco del estado Falcón, Venezuela. Asimismo, en la Tabla I se detallan los resultados del diagnóstico llevado a cabo en el grupo de pacientes con LV, que dio origen al presente trabajo.

Detección de infecciones inaparentes por Leishmania infantum en individuos asintomáticos de la región semiárida del occidente de Venezuela

Fig. 2. A) Amastigotes de *Leishmania infantum* en extendido de médula ósea de un caso activo de leishmaniasis visceral. Coloración: Giemsa al 10% en buffer fosfato (1000X). B) Producto del ensayo de PCR específico de *L. infantum* en muestra de suero de un caso activo de la región semiárida del occidente de Venezuela. PM: Marcador de peso molecular. 1: Suero de paciente activo con LV. 2: ADN de aislado de *L. infantum*. 3: Muestra de paciente seronegativo. 4: Control interno de reacción.



De un total de 1036 individuos, que al examen médico no mostraron síntomas o signos atribuibles a LV, de diferentes edades y sexo, domiciliados en 25 localidades rurales ubicadas mayoritariamente en el bosque seco espinoso de 13 municipios de los estados Falcón (12) y Lara (1) al occidente de Venezuela, 175 (16,9%) resultaron seropositivos a *L. infantum*. La detección de Ac específicos anti-*Leishmania*, circulantes en los individuos muestreados, fue llevada a cabo mediante la utilización de tres métodos serológicos (TAD, IFI, ELISA) también utilizados en la detección de casos activos de LV en la región semiárida del estado Falcón, coincidiendo en la mayoría de las muestras los títulos entre pruebas, lo cual permite tener una relativamente alta confiabilidad en el resultado obtenido.

El rango de sero-reactividad para las localidades donde hubo positividad varió desde 3,4% en los muestreados en la localidad de Pozo Negro (Petit) hasta 80,7% detectado en la localidad de la Carretera, municipio Unión (para ubicación ver Fig. 1). Es de hacer notar que de las 25 localidades muestreadas, en 22 (88%) de ellas se logró la detección de sero-reactividad en los pobladores quienes afirmaron no haber sufrido síntomas atribuibles a LV, confirmando las observaciones clínicas. El nivel de seropositividad detectado en individuos SMCA pareciera indicar una frecuente circulación del parásito causante de la LV en la zona de estudio. Esta afirmación parece reforzarse con los hallazgos obtenidos con la aplicación de la prueba de PCR en el contingente humano muestreado, en el cual fue detectada una positividad de 17,7% producto de la observación de señal de ADN específico de *L. infantum* en muestras de suero de 183 individuos con infecciones inaparentes. Los detalles sobre los porcentajes obtenidos utilizando las dos metodologías diagnósticas para detectar infecciones inaparentes en individuos SMCA en áreas endémicas para LV incluyendo los límites de confianza de los porcentajes

Tabla I. Detalles diagnósticos de casos agudos de leishmaniasis visceral detectados en localidades del estado Falcón, Venezuela

N° caso	Localidad (Municipio)	Sexo	Edad Años	Métodos Diagnósticos						
				Parasitol.		Serológicos		Molecular		
				Frotis	MO	TAD	IFI	ELISA	Serol.	PCR
1	Carretera (Unión)	M	5	+		1:64	1:64	1:100	+	NR
2	Lamedero (Mauroa)	M	1	+		1:128	1:256	1:800	+	+
3	Vegas del Tuy (Unión)	F	2	+		1:1024	1:512	1:1600	+	+
4	Los Pozones (Buchivacoa)	M	5	+		1:128	1:512	1:800	+	+
5	Humocaro (Urumaco)	M	2	+		1:128	1:512	1:100	+	+
6	Churuguara (Federación)	M	13	+		1:128	1:64	1:800	+	+

NR: No realizado; MO: Médula Osea

para cada caso, se muestran en la Tabla II. Es de hacer notar que del total de positivos detectados con las dos metodologías utilizadas, 41 (23%) de ellos presentaron coincidencia para las técnicas serológicas y el ensayo de PCR.

Detección de infección por Leishmania en perros de localidades endémicas para LV de la región semiárida del occidente de Venezuela

De un total de 67 perros examinados serológicamente para detectar infección por Leishmania en 51 de ellos (76,1%) fueron registrados Ac circulantes anti-*L. infantum* en, al menos, dos de las tres pruebas serodiagnósticas utilizadas, lo cual según los criterios establecidos en el presente trabajo permitió diagnosticarlos como seropositivos. Los hallazgos serológicos fueron corroborados con la reactividad a los ensayos de PCR del 30% de las muestras procesadas, lo cual evidencia la infección por LV en los perros del área estudiada. En general, los perros presentaban cuadros apreciables de desnutrición, algunos con pelo hirsuto e hipertrofia ungueal, lo que podría estar asociado al resultado serológico detectado. Una razón más para sospechar tal asociación es el testimonio de algunos de los dueños quienes informaron sobre el poco tiempo de sobrevida de los cánidos en esas localidades. Con excepción de la localidad de Pozo negro (N° 11 Fig. 1) del municipio Petit estado Falcón donde no se observaron perros seropositivos, en el resto

de las localidades muestreadas fueron detectadas altos niveles de prevalencia a la infección por *L. infantum* que en todos los casos sobrepasó el 70% de seropositividad. Esta observación parece tener correspondencia con lo encontrado en el grupo humano estudiado en la misma localidad, en cuyo caso se detectó el menor nivel de infección con un 3,4%. Los detalles del estudio diagnóstico en los perros muestreados se aprecian en la Tabla III.

Registro de especies flebotominas y su asociación con focos endémicos para leishmaniasis visceral en la región semiárida del occidente de Venezuela

Un total de 6000 especímenes (63,4% hembras y 36,6% machos) de 12 especies flebotominas fueron colectados e identificados en 12 localidades de 7 municipios de los estados Falcón y Lara enclavadas en la región semiárida del occidente de Venezuela. Del total colectado, el 95,1% correspondió a 4 especies francamente antropofílicas incriminadas como transmisoras de Leishmania en la región neotropical. Estas incluyen a *Lu. evansi* (66,6%), *Lu. longipalpis* (14,9%), *Lu. gomezi* (7,6%) y *Lu. panamensis* (6,0%) observándose un franco predominio de *Lu. evansi* en número y distribución, habiéndose logrado su captura en las 12 localidades estudiadas. Detalles sobre las especies flebotominas identificadas en las diferentes localidades se muestran en la Tabla IV. La disección del tubo digestivo y posterior utilización de un ensayo de PCR realizado en 122 especímenes de las especies

Tabla II. Resultados de pruebas serológicas y ensayo de PCR para la detección de LV en individuos asintomáticos de localidades de la región semiárida del occidente de Venezuela

N°	Localidad	Municipio	N° Individuos	N° (%) Sero-positivos	N° (%) reactividad a PCR
1	Los cristales	Mauroa	55	4 (7,3)	3 (5,5)
2	Fortaleza	Mauroa	36	3 (8,3)	2 (5,6)
3	Lamedero	Mauroa	20	1 (5,0)	7(35)
4	Los pozones	Buchivacoa	65	13(20)	4 (6,2)
5	La palma	Buchivacoa	65	4 (6,2)	6 (9,2)
7	Buena vista	Urumaco	20	4 (20)	3 (15)
8	Humocaró	Urumaco	40	9(22,5)	8(20)
9	Cruz de tara tara	Sucre	63	6(9,5)	14(22,2)
10	Murucusa	Petit	8	1(12,5)	0 (0,0)
11	Pozo negro	Petit	29	1 (3,4)	0 (0,0)
12	San Pablo	Petit	38	8(21,0)	8(21,0)
13	Tres Marías	Petit	66	12(18,2)	8(12,1)
14	Docoral	Federación	48	0 (0,0)	30(62, 5)
15	María Díaz	Federación	55	9(16,4)	2 (3,6)
16	La carretera	Unión	57	46(80,7)	24(42,1)
19	Taparito	Unión	39	7(17, 9)	4(10, 3)
20	Tapa tapa	Unión	69	9(13,0)	7(10, 1)
21	Vegas del Tuy	Unión	26	18(69,2)	2 (7,7)
22	Viloria	Unión	38	5(13,2)	3 (7,9)
23	Acurigua	Colina	17	2(11,8)	5(29,4)
24	San Francisco	Zamora	26	0 (0,0)	1(3,8)
25	Guamacho	Píritu	29	3(10,3)	6 (20,7)
26	Mirimire	San Francisco	29	0 (0,0)	2 (6,9)
27	Capadare	Acosta	31	3(9,7)	3 (9,7)
29	El limón	Urdaneta	67	7(10,4)	31(46,3)
Total	25 localidades	13 municipios	1036	175 (16,9)*	183(17,7)**

1-28: Localidades del estado Falcón; 29: Localidad del estado Lara

* LC=2; P,95 (14,9%-18,9%)

** LC=2; P,95 (15,7%-19,7%)

N°: Numeración según ubicación en Fig. 1

Lu. evansi (25), *Lu. longipalpis* (90) y *Lu. gomezi* (7) en búsqueda de infección por *L. infantum*, reveló 5,7% de infección natural. Es de hacer notar que sólo en las especies *Lu. longipalpis* (57%) y *Lu. evansi* (43%) fue detectada la presencia de ADN específico de *L. infantum*, especie asociada con LV.

DISCUSIÓN

En el presente estudio 1036 individuos provenientes de localidades ubicadas en el semiárido venezolano, quienes habían testimoniado para el momento del muestreo no haber experimentado

síntomas atribuibles a LV, fueron serológicamente examinados para detectar Ac anti-*L. infantum*. Del total de muestras examinadas, 175 (16,9%) cumplieron con los criterios diagnósticos establecidos en el presente trabajo para ser considerados seropositivos a la infección por *L. infantum*. La coincidencia de los tres métodos serológicos utilizados para el diagnóstico y su comparación con los niveles de Ac circulantes detectados en los casos clínicos incluidos como controles, confirman que los individuos SMCA que resultaron seropositivos habían tenido un contacto previo con *L. infantum*. Esta aseveración se corrobora con los resultados

Tabla III. Detección de infección por *Leishmania infantum* en perros de localidades endémicas para LV en la región semiárida del occidente de Venezuela.

Nº*	Localidad	Municipio	Nº Perros	Nº (%) Seropositivos	Nº (%) reactividad a PCR
7	Buena vista	Urumaco	8	8(100)	0 (0,0)
8	Humocaro	Urumaco	15	12(80)	9 (60)
10	Murucusa	Petit	4	4(100)	0 (0,0)
11	Pozo negro	Petit	5	0 (0,0)	0 (0,0)
13	Tres Marías	Petit	9	7(77, 8)	0(0,0)
14	Docoral	Federación	10	7(70, 0)	5(50, 0)
16	La carretera	Unión	8	7(87, 5)	4(50,0)
29	El limón	Urdaneta	8	6(75,0)	2(25,0)
Total	8 localidades	5 municipios	67	51(76,1)**	20(29,9)***

*: Numeración de localidades corresponde a la ubicación geográfica mostrada en Fig.1

** : LC=10; P,95 (66,1%-86,1%)

***: LC=11; P,95 (18,9%-40,9%)

obtenidos al aplicar ensayos de PCR a las mismas muestras, revelando positividad a la presencia de ADN específico de *L. infantum* en 17,7% (183/1036) de ellas. La combinación de los resultados obtenidos con las pruebas serológicas y moleculares (PCR) en individuos asintomáticos, advierten sobre la presencia en el área estudiada de infecciones inaparentes u ocultas de LV, ocasionadas por la circulación de *L. infantum*. Asimismo, los resultados indican la amplia distribución de este tipo de infección en el semiárido venezolano a juzgar por la positividad detectada en el 88% y 92% de las localidades muestreadas, una vez realizados el serodiagnóstico y el ensayo de PCR, respectivamente. La advertencia anterior se

ve justificada cuando se analiza la frecuencia con que se encuentra la infección asintomática de LV en localidades que resultaron positivas, detectándose rangos de sero-infección que oscilan entre 3,4% como el nivel más bajo hasta el 80,7% en la localidad de la carretera del municipio Unión del estado Falcón. De la misma manera, la reactividad observada al ensayo de PCR indica rangos similares de 3,8% y 62,5%, lo cual confirma contundentemente lo frecuente del hallazgo de infecciones inaparentes de LV en el área endémica estudiada.

El reconocimiento de la región semiárida del occidente de Venezuela como importante foco

Tabla IV. Especies flebotominas registradas en localidades de la región semiárida del occidente de Venezuela.

Especies de <i>Lutzomyia</i> registradas	Nº (%) especímenes colectados	Localidades de captura*
<i>Lu. evansi</i>	3994 (66,6)	23;8;28;21;20;18;22;17;14;4;6;30
<i>Lu. longipalpis</i>	898 (14,9)	23;8;4;6;30
<i>Lu. gomezi</i>	450 (7,6)	21;20;18;22;17;14;4;6;30
<i>Lu. panamensis</i>	361 (6,0)	21;20;18;22;17;14
<i>Lu. punctigeniculata</i>	106 (1,7)	23
<i>Lu. atroclavata</i>	82 (1,4)	28;21;20;18;23
<i>Lu. venezuelensis</i>	43 (0,7)	28;17;14;4;6;30
<i>Lu. trinidadensis</i>	22 (0,4)	23
<i>Lu. hernandezi</i>	18 (0,3)	21;20;18;22
<i>Lu. flaviscutellata</i>	12 (0,2)	21;20;18;22
<i>Lu. micropyga</i>	8 (0,1)	21;20;18;22
<i>Lu. walkeri</i>	6 (0,1)	21;20;18;22
Total: 12 especies	6000 (100)	12 localidades de 7 municipios

*Para ubicación geográfica de las localidades y sus municipios ver Fig. 1

endémico de LV parece sustentarse en el frecuente hallazgo de infecciones inaparentes, asintomáticas o sub-clínicas en las 25 localidades rurales estudiadas y en la menos frecuente detección de casos agudos sintomáticos, con parasitismo patente, en niños de localidades pertenecientes a 5 de los 13 municipios muestreados antes del presente estudio, corroborando previas investigaciones (Vargas-Díaz *et al.*, 2004; 2007).

En relación con los niveles de infección por *L. infantum* detectados en los perros examinados, los resultados revelan cifras de sero-infección del 76,1%, las cuales cuadruplican las encontradas en la población humana (16,9%). Asimismo, el hallazgo de reactividad a PCR de las muestras caninas procesadas casi dobla porcentualmente las detectadas en humanos. Esta relación entre las proporciones de infección en humanos y perros detectadas en el semiárido venezolano concuerda con recientes hallazgos registrados en Brasil en áreas donde la LV es endémica (Almeida-Felipe *et al.*, 2011). Por otra parte, dada la alta seropositividad general observada en los perros se procedió a estimar la proporción relativa de animales infectados por municipio, con la finalidad de comprender la distribución de la infección por LV en perros de la región semiárida estudiada. En este caso valores de seropositividad de 87%, 86%, 75%, 70% y 61%, fueron detectados en los municipios Unión, Urumaco, Urdaneta, Federación y Petit, respectivamente. La información aquí registrada puede aportar algunas claves para hacer estimaciones reales sobre la cuantía de la infección en perros de la región semiárida del occidente de Venezuela, permitiendo considerar este hecho un potencial riesgo de transmisión de LV a la población humana, debido al comportamiento del perro como un importante reservorio doméstico, lo cual ha sido sugerido para otras partes de Venezuela y países vecinos (Torrealba, 1970; Zerpa *et al.*, 2003; Almeida-Felipe, 2011). El hecho de que en la mayoría de las localidades muestreadas fueron detectadas altas proporciones de infecciones de LV en perros en domicilios donde habitaban personas también infectadas, permite considerar este animal un factor importante en el mantenimiento de *L. infantum* como fuente de infección humana, asumiendo que mientras más cerca está el reservorio más exitosa será la transmisión.

De los 6000 flebotominos capturados durante la realización del presente estudio, *Lu. evansi* resultó

ser la más abundante de las especies colectadas y la más ampliamente distribuida, llegando a representar el 66% (N=3994) de los especímenes obtenidos y habiéndose identificado en todas las 12 localidades donde se llevó a cabo la actividad entomológica. El predominio de esta especie antropofílica en los diversos ecotopos muestreados se demuestra con la cantidad de especímenes capturados en los ámbitos domiciliarios y peridomiciliarios, superando significativamente cualquier otra especie colectada con los métodos de captura utilizados, incluyendo trampas lumínicas (CDC y Shannon), papel aceitado y captura directa en refugios. Estos resultados permiten concluir que en el ambiente semiárido noroccidental venezolano, *Lu. evansi* es la especie predominante y que podría ser incriminada en la transmisión de *L. infantum*, agente etiológico de la LV, asociada con *Lu. longipalpis*, conocido vector de LV de amplia distribución nacional y que en el presente estudio representó el 14,9% del total colectado en el 41% de las localidades muestreadas. Estos hallazgos, por una parte, contradicen la asunción de que *Lu. longipalpis* es la única y principal especie vectora de *L. infantum* en el ámbito geográfico de distribución de la LV en América, concepto que ha prevalecido durante las últimas cinco décadas y, por la otra, apoyan los resultados de Travi *et al.* (1990; 1996) en Colombia y de Aguilar *et al.* (1998) en Venezuela, donde *Lu. evansi* mostró un rol preponderante sobre *Lu. longipalpis*. De la misma manera, los presentes resultados reivindican la sugerencia que a mediados del siglo pasado hicieran Pifano & Romero (1964) indicando que *Lu. evansi* podría comportarse como un transmisor alternativo en focos de LV del oriente venezolano ante la ausencia de *Lu. longipalpis*. No obstante el predominio numérico de *Lu. evansi* sobre *Lu. longipalpis*, es necesario resaltar que en las localidades estudiadas en la región semiárida del occidente de Venezuela, estas fueron las únicas especies flebotominas encontradas con infección natural por *L. infantum*, lo cual sugiere una alta eficiencia en la transmisión de LV debido a la acción asociada de estos dos vectores, reflejado en la alta prevalencia de la infección.

El relativamente alto porcentaje de infección detectado simultáneamente en las poblaciones humana (17%), canina (76%) y flebotomina (5,7%), aporta elementos importantes que permite la comprensión de una manera global del ciclo de transmisión de la LV en el semiárido noroccidental venezolano.

Asimismo, la interpretación de los resultados obtenidos sugieren que las infecciones inaparentes o asintomáticas ocurren más frecuentemente en el área de estudio que los casos clínicamente detectables. Este hecho pareciera indicar que la sola presencia de casos humanos de LV no es, en sí mismo, un buen indicador de la distribución de la transmisión de la dolencia. Por lo tanto, la prevalencia y distribución de infecciones inaparentes en individuos SMCA pareciera ser una mejor alternativa para comprender la dinámica de transmisión de la LV, sirviendo a la vez para monitorear los esfuerzos hechos sobre su control.

Aunque se desconoce en la actualidad si personas con infecciones sub-clínicas podrían ser consideradas reservorios de LV, nuestros hallazgos sugieren que las mismas pudieran convertirse en potenciales fuentes de infección como consecuencia de inmunocompromisos producto de factores desencadenantes comúnmente encontrados en el área como la malnutrición. Por otra parte, aun considerando que personas con infecciones inaparentes resultarían mucho menos infectivas para los vectores asociados (*Lu. evansi/Lu. longipalpis*) que los patentes con LV, el gran número de individuos que presentan esta condición, como quedó demostrado en el presente trabajo, sugeriría una importante variable para reconocerlos como potenciales reservorios de *L. infantum*, aseveración que parece tener apoyo en resultados similares registrados en Brasil (Costa *et al.*, 2002).

Finalmente, el análisis de los resultados obtenidos en el presente estudio permite concluir que la asociación detectada entre personas con LV, la presencia de perros infectados con *L. infantum* en el ambiente domiciliario y el común hallazgo de especies flebotominas antropofílicas en todas las localidades estudiadas, aunada a las pobres condiciones sanitarias existentes y la malnutrición registrada en niños y perros, parecieran ser factores de riesgo suficientes para explicar la endemidad de la LV en la región semiárida del occidente de Venezuela.

AGRADECIMIENTOS

Los autores dedican esta modesta contribución como tributo a nuestro entrañable Vicente Medina, compañero de siempre, quien con su trágica e injusta partida deja un hondo vacío en nuestros laboratorios y un profundo dolor en nuestros

corazones. No imaginamos como serán nuestros días de campo sin tu diligente ayuda, tu protección, tus ocurrencias y tus atenciones post-muestreos. Que el Dios de los justos te acoja en su seno y te permita andar por el semiárido... como siempre.

REFERENCIAS

- Aguilar C. M., Fernández E., Fernández R., Cannova D. C., Ferrer E., Cabrera Z., Souza W. J. S. & Coutinho S. G. (1998). Urban visceral leishmaniasis in Venezuela. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **93**: 15-16.
- Almeida-Felipe I. M., Cardoso de Aquino D. M., Kuppinger O., Cruz-Santos M. D., Salgado-Rangel M. E., Barbosa D. S., *et al.* (2011). Leishmania infection in humans, dogs and sand flies in a visceral leishmaniasis endemic area in Maranhao, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **106**: 207-211.
- Añez N., Cazorla D., Nieves E., Chataing B., Castro M. & Yarbuh A. L. (1988). Epidemiología de la leishmaniasis tegumentaria en Mérida, Venezuela. I. Diversidad y dispersión de especies flebotominas en tres pisos altitudinales y su posible role en la transmisión de la enfermedad. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **83**: 455-463.
- Añez N., González C., Lugo de Yarbuh A., González N., Rojas A., Crisante G., *et al.* (2000). Association of trauma with Leishmania parasite recall. Clinical and experimental evidences. *Bol. Malaritol. San. Amb.* **40**: 13-20.
- Añez N., Crisante G., Rojas A., Carrasco H., Parada H., Yépez Y., *et al.* (2001). Detection and significance of inapparent infection in Chagas disease in western Venezuela. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **65**: 227-232.
- Añez N., Rojas A. & Crisante G. (2007). Evaluation of conventional serological tests for the diagnosis of American cutaneous leishmaniasis. *Bol. Mal. Salud Amb.* **47**: 13-20.
- Añez N., Atencio R., Rivero Z., Bracho A., Rojas A., Romero M. & Crisante G. (2011). Chagas disease inapparent infection in asymptomatic individuals from a Yukpa ethnic community in western Venezuela. *Bol. Mal. Salud Amb.* **51**: 59-67.

- Baliraine F. N., Afrane Y. A., Ameyna D. A., Bonizzoni M., Menge D. M., Zhou G., *et al.* (2009). High prevalence of asymptomatic *Plasmodium falciparum* infections in a highland area of western Kenya: a cohort study. *J. Infect. Dis.* **200**: 66-74.
- Chiurillo M. A., Beck A. E., Devos T., Myler P. J., Stuart K. & Ramirez J. L. (2000). Cloning and characterization of *Leishmania donovani* telomeres. *Exp. Parasitol.* **94**: 248-258.
- Chiurillo M. A., Sachdeva M., Dole V. S., Yépez Y., Miliiani E., Vasquez L., *et al.* (2001). Detection of *Leishmania* causing visceral leishmaniasis in the old and new worlds by polymerase chain reaction assay based on telomeric sequences. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **65**: 573-582.
- Costa C. H. N., Stewart J. M., Gomes R. B. B., Garcez L. M., Ramos P. K. S., Bozza M., *et al.* (2002). Asymptomatic human carriers of *Leishmania chagasi*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **66**: 334-337.
- Desjeux P. (2001). The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* **95**: 239-243.
- Diallo A., Ndam N. T., Moussiliou A., Dos Santos S., Ndonky A., Borderon M., *et al.* (2012). Asymptomatic carriage of *Plasmodium* in urban Dakar: the risk of malaria should not be underestimated. *PLOS One.* **7**:e31100.
- Ewel J. J., Madriz A. & Tossi J. A. (1976). *Zonas de vida de Venezuela*. 2da Edición. Ed. Sucre. Caracas, Venezuela.
- Feliciangeli M. D., Rodriguez N., De Guglielmo Z. & Rodriguez A. (1999). The re-emergence of American visceral leishmaniasis in an Old Focus in Venezuela: vectors and parasites. *Parasite.* **6**: 113-120.
- Follador I., Araujo C., Bacellar O., Araujo C. B., Carvalho L. P., Almeida R. P. & Carvalho E. M. (2002). Epidemiologic and immunologic findings for the subclinical form of *Leishmania braziliensis* Infection. *CID.* **34**: 54-58.
- Garnham P. C. G. (1980). The significance of inapparent infections in Chagas disease and other forms of trypanosomiasis. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **75**: 181-188.
- Maroli M., Feliciangeli M. D. & Arias J. (1997). *Métodos de captura, conservación y montaje de los flebótomos (Diptera: Psychodidae)*. OPS/HCP/HCT/95/97. 71 pp. Pan-American Health Organisation Technical Bulletin. Washington, USA.
- Ortiz R. M., Muñoz S., Lechuga D., Del Campo M. & Torres E. (2003). Aspectos epidemiológicos de la leishmaniasis visceral humana y canina en Venezuela. *Pan. Amer. J. Pub. Health.* **13**: 1-2.
- Pifano F. & Romero J. (1964). Investigaciones epidemiológicas sobre leishmaniasis visceral en la Isla de Margarita, Estado Nueva Esparta, Venezuela. *Gac. Med. Caracas.* **72**: 425-430.
- Torrealba J. W. (1970). *Observaciones sobre el diagnóstico, terapéutica y evolución de la leishmaniasis visceral humana y canina*. Tesis doctoral. Facultad de Medicina. Universidad de Carabobo, Valencia, Venezuela.
- Travi B. L., Velez I. D., Brutus L., Segura C., Jaramillo C. & Montoya J. (1990). *Lutzomyia evansi* an alternate vector of *Leishmania chagasi* in a Colombian focus of visceral leishmaniasis. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* **84**: 676-677.
- Travi B. L., Montoya J., Gallego J., Jaramillo C., Llano R. & Velez I. D. (1996). Bionomics of *Lutzomyia evansi* (Diptera:Psychodidae) vector of visceral leishmaniasis in northern Colombia. *J. Med. Entomol.* **33**: 278-285.
- Vargas-Díaz E., Añez N., Rojas A., Crisante G. & Yépez J. Y. (2004). Estudio epidemiológico de leishmaniasis visceral en El Limón, al norte del estado Lara, Venezuela. *Bol. Mal. Salud Amb.* **44**: 101-107.
- Vargas-Díaz E., Medina V., Yépez J. Y., Rojas A., Crisante G. & Añez N. (2007). Estudio de un nuevo foco de leishmaniasis visceral en el estado Falcón, Venezuela. Registro de un caso. *Bol. Malariol. Sal. Amb.* **47**: 245-248.

WHO (1996). *Manual de lucha contra la leishmaniasis visceral*. WHO/Leish/96.40. Geneva, Switzerland.

Young D. G. & Duncan M. A. (1994). *Guide to the identification and geographic distribution of Lutzomyia sand flies in Mexico, The west Indies, Central and South America (Diptera Psychodidae)*. Mem. Amer. Ent. Inst. 54. Associated Publishers, Gainesville, Florida, USA.

Zerpa O., Ulrich M., Negron E., Rodriguez N., Centeno M., Rodriguez V., *et al.* (2000). Canine visceral leishmaniasis on Margarita Island (Nueva

Esparta, Venezuela). *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* **94**: 484-487.

Zerpa O., Ulrich M., Borges R., Rodriguez V., Centeno M., Negron E., *et al.* (2003). Epidemiological aspects of human and canine visceral leishmaniasis in Venezuela. *Pan. Am. J. Public Health.* **13**: 239-245.

Recibido el 23/03/2012
Aceptado el 07/10/2012
