



# Leishmaniasis visceral subclínica en 123 individuos de un cantón de la provincia Caranavi-La Paz

MARÍA DELMANS FLORES CH. <sup>1</sup>, JORGE R. POSTIGO I. <sup>3</sup>, NEIDA MITA MENDOZA <sup>4</sup>,  
ISRAEL CRUZ <sup>5</sup>, JORGE ALVAR EZQUERRA <sup>6</sup>, BRIGITTE BASTRENTA <sup>2</sup>

## Resumen

*En 1999, en el Hospital del Niño se registró un nuevo caso de leishmaniasis visceral sobre un niño de dos años proveniente del cantón de Taipiplaya (Provincia Caranavi). Por este motivo se realiza en este cantón una evaluación transversal de la leishmaniasis visceral mediante pruebas serológicas y moleculares involucrando a 122 individuos clínicamente sanos y un individuo con infección positiva a Leishmania cutánea. Se demostró la circulación de Leishmania sp. en 32,3% de sujetos estudiados. El 14,4% de la población examinada presentó anticuerpos anti-rk39, demostrándose la circulación de Leishmania chagasi responsable de la leishmaniasis visceral. No podemos descartar la posibilidad de la existencia de coinfecciones mixtas inter-especie de Leishmania como también de coinfecciones mixtas por Leishmania sp. y Trypanosoma cruzi, responsable de la enfermedad de Chagas.*

## Summary

*In 1999, in the "Hospital del Niño", a new case of visceral leishmaniasis was identified in a 2 years old child from Taipiplaya in the Caranavi district. For this reason, a visceral leishmaniasis evaluation using serological and molecular tests was realized on 122 healthy people and also on one leishmania cutanea infected person. Leishmania sp. was present in 32,3% of the studied people and 14,4% had an anti-rk39 antibody, attesting the existence of Leishmania chagasi responsible for visceral leishmaniasis. The possibility of mixed infections with other Leishmania species as well as mixed infections Leishmania sp. and Trypanosoma cruzi, responsible for Chagas disease should not be discarded.*

**Palabras clave:** LEISHMANIASIS VISCERAL-diagnóstico

**Key words:** LEISHMANIASIS, VISCERAL-diagnosis

1. Bioquímica UMSA, Instituto Carlos III. Madrid, España.

2. Ph.D, Jefe Responsable de la Unidad de Epidemiología Molecular de Enfermedades Tropicales IRD-INLASA.

3. Médico, Unidad de Epidemiología Molecular de Enfermedades Tropicales IRD-INLASA.

4. Bioquímica UMSA, Unidad de Epidemiología Molecular de Enfermedades Tropicales IRD (Francia)-INLASA. La Paz, Bolivia.

5. Biólogo, Servicio de Parasitología, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III. Madrid, España.

6. Ph.D. MD. Director del Servicio de Parasitología, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III. Madrid, España.

Organismos patrocinadores: Institut de Recherche pour le Développement, (IRD, France). Institutos Nacionales de Laboratorios de Salud, INLASA.

## Introducción

Por lo general una determinada especie de *leishmania* está asociada a una de las manifestaciones clínicas. En el nuevo mundo: la forma de leishmaniasis cutánea tiene principalmente como agentes etiológicos a *L. L. mexicana*, *L. L. amazonensis*, *L. V. panamensis*, *L. V. guyanensis*, *L. V. peruviana* o *L. V. braziliensis*. En el caso de la forma mucocutánea la especie responsable es *L. V. braziliensis*. La cutánea difusa se observa en infecciones por *L. L. amazonensis*, la visceral y formas cutáneas atípicas en casos de infecciones por *L. chagasi* <sup>(1)</sup>.

La leishmania visceral es potencialmente fatal, causada por un protozooario intracelular: *L. L. donovani*, *L. L. infantum* (*chagasi*). En humanos causa parasitismo y patología importante en hígado, bazo y médula ósea. En hígado, los amastigotes intracelulares se desarrollan rápidamente dentro de los 28 días siguientes a la infección, desapareciendo usualmente en los 30 días siguientes; en cambio, tanto en el bazo y en la médula ósea puede ser causa de infección crónica, sobreviviendo toda la vida del huésped <sup>(2,3)</sup>. Además, pese a que la leishmaniasis visceral en la mayoría de los casos es considerada una parasitosis subclínica, puede generar estado febril intermitente, astenia, cuadros diarreicos, vómitos y desnutrición. <sup>(3)</sup> Se acompaña de esplenomegalia indolora y hepatomegalia, anemia normocítica y normocrómica <sup>(4)</sup>.

La leishmaniasis visceral es una parasitosis considerada, hasta ahora, rara dentro de los países andinos (Colombia, Perú, Bolivia, Venezuela y Ecuador) <sup>(5)</sup>; sin embargo, tiene alta morbilidad y mortalidad en algunas regiones brasileñas <sup>(3)</sup>. En zonas de alta endemicidad como en Ceará (noreste del Brasil), se informa una frecuencia de 10 personas por cada 1.000 habitantes <sup>(3)</sup>. En Colombia y Venezuela se ha notificado un promedio de 50 casos por año en la década del 90 y en Ecuador y Bolivia sólo se reportaron casos ocasionales <sup>(5)</sup>.

Otros investigadores <sup>(3)</sup> demostraron en un estudio clínico y epidemiológico en el noreste del Brasil que la infección por *L. infantum/chagasi* estaba presente en el 7,5% de niños menores de 15 años, de los cuales el 20% presentó leishmaniasis visceral aguda, otro 20% con pocos síntomas clínicos y el restante 60% fueron niños con desarrollo de infección subclínica prolongada que resultó deletéreo en su crecimiento y desarrollo siendo marginados como niños desnutridos.

Bolivia se ha destacado principalmente por los más altos índices de leishmaniasis mucocutánea (MCL) y leishmaniasis cutánea (LCL). Entre los países andinos la proporción reportada de estas formas de leishmaniasis es la siguiente: (LMC:LCL) Bolivia 1:4; Perú 1:7; Ecuador 1:13; Colombia 1:44; Venezuela 1:26 <sup>(5)</sup>, justifican-

do claramente la necesidad de un control periódico y constante.

La leishmaniasis en la región subandina del departamento de La Paz, en particular en los Yungas, ha sido objeto de estudio partiendo del conocimiento de la detección de algunos casos documentados de leishmaniasis visceral (LV) <sup>(6)</sup>. Los casos autóctonos en Bolivia fueron desconocidos hasta que Gatti en 1939 <sup>(7)</sup> confirmó por necropsia en un soldado paraguayo, prisionero de la guerra del Chaco y trasladado a la zona de los Yungas donde permaneció por 18 meses. En 1942 se publicó <sup>(8)</sup> otro caso humano en adulto procedente de Santa Ana, departamento de Santa Cruz. En 1949 se reportó <sup>(9)</sup> la detección de otro nuevo caso de infección en un trabajador brasilero que presumiblemente se infectó mientras trabajaba entre la ciudad de Santa Cruz y la frontera boliviano-brasileña, falleciendo posteriormente y confirmando por necropsia. En 1982 otros investigadores <sup>(10)</sup> confirmaron la presencia de Kala-azar visceral humana y canina considerando a este último como reservorio del parásito, mientras otro estudio mostró la presencia del vector *Lutzomyia longipalpis* en la zona de los Yungas paceños <sup>(11,12)</sup>.

Actualmente, continúa siendo escasa la información epidemiológica de *L. chagasi* en Bolivia. Desde 1982 hasta 1999 se han reportado nueve casos de leishmaniasis visceral, la mayoría de los cuales procedían de zonas subtropicales de La Paz <sup>(13)</sup>. Recientemente, en Chulumani y otras localidades de Nor y Sud Yungas de La Paz, se han establecido coinfecciones mixtas tanto en humanos como en animales con la presencia de agentes de los complejos *L. V. braziliensis*, *L. L. mexicana*, *L. donovani/chagasi* así como de *T. cruzi* agente etiológico de la enfermedad de Chagas <sup>(14-16)</sup>.

Los tres últimos casos de leishmaniasis visceral diagnosticados y registrados en el Hospital del Niño de la ciudad de La Paz en 1999, tenían residencia en la comunidad de Taipiplaya, cantón de la provincia Caranavi. (Dr. Mejía, comunicación personal). El incremento de los casos en los últimos años, es atribuido al desarrollo de nuevos asentamientos humanos y a cambios en los patrones de actividad humana, favoreciendo la exposición de humanos al ciclo zoonótico de la leishmaniasis <sup>(5)</sup>.

En áreas endémicas el diagnóstico de leishmaniasis es prácticamente basado en la presentación clínica, el teñido de biopsia y aspirado como métodos de confirmación y ocasionalmente mediante el uso de la prueba de Montenegro, este último, aunque altamente sensible, no permite la discriminación de una infección reciente o antigua y de la cepa involucrada en la infección.

El objetivo del estudio fue para evaluar las infecciones causadas por protozoarios visceralizantes, del género *Leishmania* (*L. L. infantum/chagasi*) y *Trypanosoma*

*cruzi*, agente etiológico de la enfermedad de Chagas, mediante serología y por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) específica, en 123 habitantes del cantón de Taipiplaya.

### Zona geográfica

Taipiplaya es un cantón que está ubicado en la provincia Caranavi en el departamento de La Paz, a una distancia de 176 km de la capital del departamento por carretera. Se extiende en un pequeño valle al este de Caranavi, rodeado por serranías que alcanzan los 2500 metros de altura. Goza de un clima subtropical templado y húmedo, con un promedio anual de temperatura ambiente de 25°C. El cantón Taipiplaya cuenta con una población total de 3.142 habitantes<sup>(17)</sup>, concentrados en 16 colonias principales que se hallan dispersas en un promedio de 30 km a la redonda de una pequeña población central que tiene el nombre de Taipiplaya.

### Población de estudio

En el primer semestre de la gestión 2000, iniciamos el trabajo después de realizar la convocatoria a la comunidad en general a través de reuniones previas con las autoridades de la comunidad.

El trabajo contempló a 123 individuos residentes en la zona (3,9% de la población de Taipiplaya) pertenecientes en su mayoría al centro educativo Mixto Taipiplaya que nos permitió trabajar mayormente con niños escolares (110). El grupo de adultos (13) estuvo conformado en su mayoría por docentes del establecimiento

Después de realizar una revisión clínica dirigida y el registro de la respectiva historia clínica individual, se consideraron con especial énfasis: la ocupación, lugar de residencia, actividad y lugar de trabajo, historia migratoria como también la identificación del domicilio en un croquis de la zona. Se estableció el estado nutricional de todos los individuos considerando la talla y el peso con aplicación de tablas<sup>(18)</sup>.

### Muestras biológicas

Las muestras de sangre venosa periférica y sueros, colectadas de 123 individuos, fueron almacenadas adecuadamente hasta su procesamiento en los laboratorios de Estudios Moleculares de Enfermedades Tropicales (EMET) con asiento en INLASA, La Paz y en el Instituto Carlos III con asiento en Madrid, España.

### Pruebas serológicas

#### *IFI-Leishmania sp.*

La prueba convencional de inmunofluorescencia permite detectar infecciones con *Leishmania sp.* Para esta

prueba se utilizó cultivos axénicos de promastigotes (*Leishmania sport* IF, BioMeriux, France) o preparados frescos conteniendo organismos de amastigotes. El umbral para el diagnóstico fue de 1/80.

#### *rk39 – Leishmania infantum*

La sensibilidad y la especificidad de esta prueba para la detección de la leishmaniasis visceral es de 71,4% y 100% respectivamente<sup>(19)</sup>. Se realizó según lo descrito<sup>(20)</sup>, en resumen, las placas de 96 pocillos fueron sensibilizadas con 50 ng del antígeno rk39 diluido en tampón carbonato pH 9,6 durante toda la noche a 4°C, después del bloqueo con tampón fosfato salino conteniendo 1% de Tween 20 (a temperatura ambiente durante una hora y previo 5 lavados con PBS Tween 0,1%) se añadió 50 ml de los sueros diluidos 1/100. Las placas fueron incubadas por 30 minutos a temperatura ambiente, se añadió 50 µl del sustrato 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) diluido en tampón perborato 0,03% citrato sódico 0,05M pH 5,0 (ABTS). La incubación de las placas se realizó durante 30 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. La densidad óptica se midió a 492 nm.

#### *SLA ELISA – Leishmania infantum*

Se realizó, según lo descrito<sup>(21)</sup>, esta prueba en la que se utilizan antígenos totales, tiene la desventaja de que puede presentar reacción cruzada con Chagas, al igual que con las otras formas de leishmaniasis. En resumen se sensibilizaron placas de 96 pocillos con 1 µg/pocillo de antígeno soluble obtenido a partir de promastigotes de *L. infantum* (Lem75) diluido en tampón carbonato pH 9,6 a 4°C durante toda la noche. Las placas fueron bloqueadas con tampón fosfato salino pH 7,4 Tween 0,1% (PBS-T), albúmina sérica bovina (BSA) 1% por una hora a 37°C. Después de tres lavados con PBS-T se añadió 100 µl de los sueros diluidos 1/100 en PBS-T, BSA 0,3%. Las placas se incubaron a 37°C por 30 minutos. La detección de la reacción antígeno anticuerpo se realizó mediante el sistema avidina-biotina. La lectura de las absorbancias se realizó a 405 nm.

#### *ELISA – T. cruzi*

Se realizó Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay (ELISA) para la detección de anticuerpos anti *T. cruzi*, según la descripción<sup>(22)</sup>. Se utilizó como antígeno extracto alcalino de *Trypanosoma cruzi* de la cepa Y, obtenido como describe<sup>(23)</sup>. La sensibilidad y la especificidad corresponden a 100% y 97,5% respectivamente. El control positivo y negativo se realizó con sueros de la seroteca del laboratorio EMET- IRD.

**Tabla 1.** Repartición por edad de los 123 individuos y número de casos positivos por prueba de diagnóstico para *Leishmania* y *T. cruzi*. Taipiplaya, 2000.

Grupos etáreos	N° Individuos	SLA		rk39		IFI-Leish		PCR-Leish		Elisa-Chagas		PCR- <i>T. Cruzi</i>							
		Pos	%	Neg	Pos	%	Neg	Pos	%	Neg	Pos	%	Neg						
0 a 9	40	6	(14,6)	35	5	(13,0)	36	3	(7,3)	36	2	(5,1)	37	1	(2,8)	34	2	(5,4)	36
10 a 14	40	1	(2,0)	40	7	(14,3)	42	2	(4,1)	47	5	(10,2)	44	1	(2,2)	44	3	(6,0)	41
15 a 19	21	3	(14,3)	18	2	(9,5)	19	1	(4,7)	20	6	(28,6)	15	0	(0,0)	19	0	(0,0)	19
20 a 55	12	3	(25,0)	9	3	(25,0)	9	1	(8,3)	11	1	(8,3)	11	0	(0,0)	10	0	(0,0)	9
56 a más	1	0	(0,0)	1	1	(100)	0	0	(0,0)	1	0	(0,0)	1	0	(0,0)	1	0	(0,0)	1
Total columna	123	13	(10,6)	111	18	(14,6)	136	7	(5,7)	117	14	(11,5)	108	2	(1,8)	108	5	(4,5)	125

SLA: prueba serológica utilizando antígenos totales de *Leishmania infantum*; rk39: prueba serológica utilizando antígeno recombinante (rk39) de *Leishmania chagasi*; IFI: inmunofluorescencia indirecta; PCR: reacción en cadena de la polimerasa; Elisa: ensayo inmunoenzimático ligado a un absorbente.

## Pruebas moleculares

### PCR para *Leishmania* sp.

Se realizó reacción en cadena de la polimerasa (PCR) según lo descrito<sup>(24)</sup>. Se usaron oligonucleótidos derivados a partir del gen RNA ribosomal de la subunidad pequeña del ribosoma. Las secuencias de los cuatro iniciadores son R221: 5' GGT TCC TTT CCT GAT TTA CG 3'; R332: 5' GGC CGG TAA AGG CCG ATT AG 3'; R223: 5'TCC CAT CGC AAC CTC GGT T 3'; R333 5' AAA GCG GGC GCG GTG CTG 3'. Las condiciones de las dos reacciones (nested PCR) fueron las siguientes: 75 mM Tris-HCl pH 9, 2,0 mM de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 0,001% de albúmina sérica bovina, 2 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,2 μm de desoxinucleótidos de trifosfato, 15 pmol de los iniciadores R221 y R332 en la primera reacción y 3 pmol de cada R223 y R333, en la segunda reacción. La enzima empleada fue la Tth polimerasa (Bio-tools B&M laboratories, Spain) 1,4 U en la primera reacción (50 μl volumen total de reacción) y 0,7 U en la segunda reacción (25 μl de volumen de reacción). La reacción de la amplificación se realizó usando el termociclador 2400 TM Perkin Elmer Gen Amp System. Las condiciones programadas para R221 y R332 fueron como paso inicial 94°C 5 min, 35 ciclos de 94°C 30 seg, 60°C 30 seg, 72°C 30 seg; y 72°C 10 min como paso final de extensión. Para R223 y R2333 las condiciones fueron similares a excepción de la temperatura de alineación que fue de 65°C.

### PCR para *Trypanosoma cruzi*

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se realizó según lo descrito<sup>(25)</sup>. Se realizó la amplificación de las regiones hipervariables del minicírculo de kDNA (DNA del cinetoplasto), que está flanqueado por regiones conservadas que fueron utilizadas para elegir los iniciadores. El producto tiene un tamaño equivalente a

330 pb. La secuencia de los iniciadores fueron: 121: 5'-AAA TAA TGT ACG GG(T/G) GAG ATG CAT GA-3' y 122: 5' -GGT TCG ATT GGG GTT GGT GTA ATA TA-3'. Se realizó la preparación de la mezcla de amplificación utilizando 0,2 mM de desoxinucleótidos trifosfatados (Promega), 4 mM de MgCl<sub>2</sub> (Promega), 200 ng de los iniciadores 121 y 122 (Amersham Pharmacia Biotech) 10 mM de Tris-HCL (pH 9), 50 mM de KCl, 0,1% de Triton® X-100 y 2,5 U de *Taq* DNA polimerasa (Promega) en un volumen final de 70 μl. La especificidad de los iniciadores 121 y 122 evaluada con extractos de DNA de cepas de referencia de *T. cruzi*, *T. rangeli*, *T. brucei* y cepas de *Leishmania* sp., alcanzaron 100% de especificidad para *T. cruzi*<sup>(26)</sup> y la sensibilidad de amplificación reportada es de 1 fg en extracto fenólico de sangre<sup>(14)</sup>.

## Resultados

### La población

Durante el trabajo se realizó el examen clínico a todos los individuos. Solamente uno, de sexo masculino y 18 años de edad, presentaba ulceraciones múltiples en ambos miembros superiores, típicas de leishmaniasis cutánea. El resto de la población (122 sujetos) fueron calificados dentro del grupo de "pacientes clínicamente sanos".

Se estratificó a los 123 individuos en cinco grupos por edades: de 0 a 9 años, de 10 a 14 años, de 15 a 19 años, de 20 a 55 años y más de 56 años de la siguiente manera: 40 sujetos (32,5%), 49 sujetos (39,8%), 21 sujetos (17,1%), 12 sujetos (9,8%) y un sujeto (70 años) (0,8%) respectivamente (tabla 1).

Detectamos un índice de desnutrición que alcanzó al 21% de la población examinada (26 sujetos), de los cuales 20 (77%) mostraron una desnutrición leve y seis (23%) una desnutrición moderada.

**Tabla 2.** Número de casos negativos y positivos según las pruebas serológicas para Leishmaniasis. Taipiplaya 2000

Total = 123	SLA (%)	rk39 (%)	IFI (%)	SLA-rk39 (%)	SLA-IFI (%)	rk39-IFI (%)	rk39-IFI-SLA (%)
<b>Positivos: 27 (22%)</b>	<b>4 (18,8)</b>	<b>13 (48,1)</b>	<b>0 (0,0)</b>	<b>3 (11,1)</b>	<b>5 (18,5)</b>	<b>1 (3,7)</b>	<b>1 (3,7)</b>
<b>Negativos: 96 (78%)</b>	-	-	-	-	-	-	-

SLA: prueba serológica utilizando antígenos totales de *Leishmania infantum*; rk39: prueba serológica utilizando antígeno recombinante (rk39) de *Leishmania chagasi*; IFI: inmunofluorescencia indirecta; Elisa: ensayo inmunoenzimático ligado a un absorbente

**Tabla 3.** Pacientes con diagnóstico positivo para *leishmania sp.* por serología y/o PCR. Taipiplaya 2000.

PCR positivos para <i>Leishmania sp.</i> : 14 (11,4 %)		PCR negativos para <i>Leishmania sp.</i> : 109 (88,6 %)	
Seropositivo (%)	Seronegativo (%)	Seropositivo (%)	Seronegativo (%)
<b>2 (14,2)</b>	<b>12 (85,7)</b>	<b>25 (22,9)</b>	<b>84 (77,1)</b>

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

### Pruebas serológicas para *Leishmania* y *T. cruzi*

En total 27 (21,9%) habitantes dieron positividad a una prueba serológica para *Leishmania*. Mediante IFI, rk39 y SLA-*Leishmania*, se detectó positividad en siete (25,9%), 18 (66,6%) y 13 (48,1%) individuos respectivamente.

Nueve individuos dieron positivo a dos pruebas simultáneamente y solamente uno a tres pruebas simultáneamente, su distribución se muestra en la tabla 2.

Si consideramos la prueba rk39 como la más específica utilizada para la LV, llama la atención que el 14,6% de esta población (123 habitantes) resultaron seropositivos. Dentro de los 27 seropositivos el 66,6% fueron rk39 positivos.

Dos niños de 5 y 10 años fueron detectados positivos por la serología de Chagas. El niño de 5 años también mostró positividad a las pruebas serológicas SLA-*Leishmania* e IFI. Mientras el niño de 10 años resultó negativo a todas las pruebas serológicas para *Leishmania*.

Resultados de PCR para *Leishmania* y *T. cruzi*  
*Leishmania* fue detectado por PCR en 14 (11,4%) individuos y *T. cruzi* se detectó por PCR en 5 (4%) individuos (tabla 1).

Dos individuos PCR-*Leishmania* positivos dieron

una serología positiva para la prueba rk39, sin embargo los 12 restantes PCR positivos dieron serología negativa a las tres pruebas (rk39, SLA e IFI); 25 individuos (22,9%) con serología positivas para *Leishmania* tuvieron PCR negativos (tabla 3).

Considerando la prueba serológica y la PCR, siete individuos (6,36%) (niños entre 5 y 14 años de edad) fueron diagnosticados como positivos para la infección de Chagas, de los cuales cinco fueron PCR positivos y seronegativos y dos PCR negativos con serología positiva.

Un solo individuo de 14 años de edad mostró PCR positiva para *Leishmania* y *T. cruzi*, sin embargo la serología para las dos enfermedades fueron negativas.

### Discusión

La infección de *Leishmania sp.* en la zona de los Yungas ha sido descrita desde hace muchos años atrás<sup>(6)</sup>. Sin embargo, el estudio de leishmaniasis en esta región se ha limitado a un estudio de las formas cutáneas, y mucocutáneas considerando el riesgo de migrantes a los nuevos asentamientos humanos en áreas endémicas<sup>(27, 28)</sup>.

Es la primera vez que se realiza en Bolivia un estudio de infecciones subclínicas de LV en humanos. Desde 1982 hasta 1999, se han reportado solamente nueve casos humanos de LV procedentes de regiones subtropicales.<sup>(13)</sup> En los cuatro últimos años se han registrado tres

nuevos casos en el Hospital del Niño de La Paz, procedentes del cantón Taipiplaya.

El uso del antígeno recombinante rk39 cuya sensibilidad y especificidad para la detección de infecciones por *L. infantum* es del 71,4% y 100% respectivamente<sup>(19, 20)</sup> ha permitido establecer una tasa de infección del 14,6% (18 habitantes) en el grupo de estudio.

Este porcentaje contrasta con los resultados obtenidos por IFI, cuya sensibilidad y especificidad reportadas son altas, detectó solamente en siete individuos (5,7%) anticuerpos anti-antígenos totales de *Leishmania sp.* La prueba de ELISA-SLA utiliza como antígeno soluble promastigotes de *L. infantum* (Lem75), detectando anticuerpos anti-antígenos totales anti-*leishmania* en 13 individuos (10,6%) de los cuales cuatro fueron seropositivos a la prueba de rk39 específica para *L. infantum*. La prueba ELISA-SLA puede tener reacción cruzada con otras infecciones parasitarias como Chagas y otras formas de leishmaniasis. Lo ilustra el único caso positivo con lesiones activas secundarias a infección de *Leishmania sp.* (varón de 18 años de edad), quien no presentó anticuerpos anti-rk39, pero resultó seropositivo para SLA e IFI, además de ser seropositivo para *T. cruzi* detectado por IFI (1/80). Evidentemente, el paciente padeció una infección positiva para leishmania cutánea y presumiblemente también presentó reacción cruzada frente a antígenos totales de *L. infantum* (SLA) y a antígenos totales de *T. cruzi*.

La posible reacción cruzada también se ilustra con el caso del niño de cinco años de edad seropositivo para *T. cruzi*, y a las pruebas SLA-ELISA e IFI. Sin embargo, no podemos descartar la posibilidad de que estos dos pacientes sean portadores de infección mixta.

Recientemente se ha reportado la existencia de infecciones mixtas (*T. cruzi* y *Leishmania sp.*) circulantes tanto en reservorios como en humanos en regiones yungueñas norte y sur<sup>(14-16)</sup> Es posible que en la región de Taipiplaya al ser también una zona yungueña con presencia de nichos ecológicos solapados de *T. cruzi* y *Leishmania sp.*, se desarrollen infecciones mixtas en humanos. Por este razón se debe aplicar pruebas convencionales que presentan reacciones cruzadas con precaución tratando, en lo posible, de realizar varias pruebas específicas.

Por PCR-*T. cruzi* detectamos a cinco individuos (4,5%) con resultados negativos para ELISA-*T. cruzi*. La detección del material genético por PCR con una serología negativa deja suponer una infección reciente donde el número de parásitos circulantes es elevado, pero el paciente presenta un retraso para la respuesta inmune<sup>(25)</sup>.

Llama también la atención la falta de concordancia entre los resultados obtenidos por serología y PCR para la leishmaniasis. Es probable que por consecuencia de

una baja parasitemia la PCR no ha logrado detectar el material genético del parásito. Sin embargo, es posible que el individuo estuviese en contacto con el agente etiológico de leishmaniasis y que posteriormente, este agente fue eliminado, quedando solamente una seroprevalencia positiva como evidencia de un contacto previo registrado en la memoria inmunológica.

Los 12 casos de la leishmaniasis positiva detectados solamente por PCR y que son negativos a las pruebas serológicas, pueden deberse a la detección de material genético de *Leishmania sp.* como consecuencia de una parasitosis aguda secundaria a una infección muy reciente y que aún no ha logrado activar su sistema inmune. No esta por demás mencionar nuevamente, que la leishmaniasis puede causar por si misma un síndrome de inmunosupresión<sup>(3)</sup>, pudiendo constituirse en uno de los factores determinantes de un registro falso negativo serológico.

El grado de desnutrición puede ser un factor determinante de una respuesta inmune deprimida. Es conveniente hacer notar que de los 26 individuos con algún grado de desnutrición, solamente cuatro dieron positividad a alguna prueba serológica, siete dieron positividad a pruebas parasitológicas moleculares (PCR), siendo al mismo tiempo seronegativos. Estos resultados indicarían que el 26,9% de este grupo, serían portadores potenciales de una probablemente inmunodeficiencia secundaria a mal nutrición.

La LV no es considerada como un problema de salud pública en Bolivia. Gracias a la facilidad de uso y la especificidad de la prueba rk39, se a logrado estudiar a un grupo bastante amplio de residentes de una zona en la que se reportaron los últimos casos de leishmaniasis visceral. Los altos porcentajes de serología positiva, sugieren que esta parasitosis no es una excepción. El porcentaje elevado de casos positivos detectados por el rk39 en el grupo estudiado y calificado como clínicamente sano, sugiere la posible existencia de un porcentaje significativo aún desconocido de casos fatales no diagnosticados. Muchos de los síntomas y signos de la LV, al ser comunes a otras enfermedades, pueden ser un factor desorientador en el diagnóstico, más aún, cuando se desconoce su existencia en la zona.

Para confirmar estos datos y la especificidad de la prueba rk39 dentro de un contexto epidemiológico específico de LV, un estudio sobre el 30% de la población total del Cantón Taipiplaya está en curso.

## Agradecimientos

Agradecemos al Director del Centro Educativo Mixto Taipiplaya, a la planta de profesores y toda la comunidad estudiantil del mismo por su apoyo en beneficio de la salud escolar. Igualmente agradecemos al personal

del Centro de Salud Taipiplaya, en especial al Sr. Angel Quisbert Quispe, sanitario, quien colaboró de forma desinteresada durante el desarrollo del trabajo de campo, de la misma manera hacemos llegar nuestro agradecimiento a los Sres. Abdul Castillo, Julio Cesar Salinas y Félix García, conductores del IRD, por su colaboración activa en el desarrollo del trabajo de campo.

## Bibliografía

1. Ashford RW. The leishmaniasis a emerging and reemerging zoonoses. *Inter J Parasit* 2000; 30: 1269-81.
2. Engwerda C, Kaye P. Organ-specific immune responses associated with infections disease. *Immunol Today* 2000; 21(2): 73-8.
3. Badaro R, Jones C, Carvalho M, Sampaio D, Reed G, Barral A, et al. New perspectives on a subclinical form of visceral leishmaniasis. *J Infect Dis* 1986; 154(6): 1003-11.
4. Desjeux P, Aranda E, Aliaga O, Mollinedo S. Human visceral leishmaniasis in Bolivia: First proven autochthonous case from "Los Yungas". *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1983; 77(6): 851-2.
5. Davies C, Reithinger R, Campbell-Lendrum D, Felician-geli D, Borges R, Rodríguez N. The epidemiology and control leishmaniasis in Andean countries. *Cad S Pub Rio de Janeiro* 2000; 16(4): 925-50.
6. Desjeux P, Le Pont F, Mollinedo F, Tibayrenc M. Las *Leishmania* de Bolivia. Anuario IBBA. La Paz, 1984: 155-62.
7. Gatti G, Boggino J, Prieto C. Un nouveau foyer de leishmaniose viscérale en Amérique du Sud. *Bull Soc Path Exot* 1939; 32: 602-5.
8. Monteiro de Barros O, Rosenfeld G. Leishmaniose visceral americana. Um caso da Bolivia. *Rev Clinic Sao Paulo* 1942; 4: 91-9.
9. Arruda W, Da Costa E, Nahas S, Rosenfeld G. Leishmaniose visceral americana. Constatação de dois casos. *Bras Med* 1949; 8-9: 63-5.
10. Angles R, Lepont F, Desjeux P. Visceral canine leishmaniasis in Bolivia. *Trans R Soc Trop Med Hyg*; 1982; 76(5): 704.
11. Le Pont F, Mollinedo S, Mouchet J, Desjeux P. Leishmaniose en Bolivie IV. Le chien dans les cycles des leishmanioses en Bolivie. *Mem Inst O Cruz* 1989; 84: 417-21.
12. Le Pont F, Desjeux P. Leishmaniasis en Bolivia: *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) Vector de Kala-Azar en los Yungas. Anuario IBBA. La Paz: UMSA, MPSSP, ORSTOM, 1983: 149-53.
13. Martínez E, Torres M. Visceral leishmania in Bolivia: an underestimated disease. *International Congress for Tropical Medicine and Malaria*, 15. 2000 . Abstract 2: 38.
14. Mita N. Infecciones Mixtas: Identificación de complejos de *Leishmania sp* y clones de *Trypanosoma cruzi* por PCR-hibridación en pacientes y mamíferos peridomiciliares de los Yungas, La Paz. [Tesis de licenciatura en bioquímica] 2001; UMSA.
15. Mita N, Flores M, Vargas F, Torrez M, Bastrenta B. Infecciones mixtas: leishmaniasis y tripanosomiasis. Identificadas por PCR-hibridación en pacientes, primer reporte en Bolivia. Cuadernos 2002; (sometido).
16. Bastrenta B, Mita N, Buitrago R, Vargas F, Flores M, Machane M, et al. Human mixed infections of *Leishmania spp.* and *Leishmania - Trypanosoma cruzi* in a Sub Andean Bolivian area: identification by PCR/hybridisation and isoenzyme. *Mem Inst O Cruz* (sometido).
17. Bolivia. Instituto Nacional de Estadística. Censo Nacional de Población y Vivienda (INE). 1992.
18. Bolivia. Ministerio de Previsión Social y Salud Pública. Dirección Nacional de Nutrición y Alimentación. Departamento de Vigilancia Nutricional. Cuaderno de Vigilancia Nutricional N° 3. Publicaciones SVEN 1987.
19. Jelinek T, Eischenlaub T, Loscher T. Sensitive and specificity of a rapid immunochromatographic test for diagnosis of visceral leishmaniasis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1999; 18: 668-70.
20. Burns J, Shreffler W, Benson D, Ghalib H, Badaro R, Reed S. Molecular characterization of a kinsin-related antigen of *Leishmania chagasi* that detects specific antibody in African and America visceral leishmaniasis. *Prot Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 775-9.
21. Deniaum M, Cañavate C, Faraut-Gambaralli F, Marty P. Biological diagnosis of leishmaniasis in HIV-coinfected patients. *Trans R Soc Trop Med Hyg* (En prensa).
22. Umezawa E, Shikanai-Yasuda M, Stolf M. Changes in isotype composition and antigen recognition of anti-*Trypanosoma cruzi* antibodies from acute to chronic Chagas' disease. *J Clinic Lab Anal* 1996; 10: 1-7.
23. Lisaldo M, Hoshino-Shimizu S, Umezawa E, Stolf A. Alkaline soluble *Trypanosoma cruzi* epimastigotes antigen (ASEA) applied to dot-ELISA. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 1994; 36: 163-6.
24. Cruz I, Cañavate C, Rubio JM, Morales MA, Chicharro C, Laguna F, et al. Leishmania infantum nested polymerase chain reaction (Ln-PCR) a comparative study with other techniques for diagnosis and monitoring of Leishmania/HIV coinfected patients. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2002; suppl 96 (in press).
25. Wincker P, Bosseno MF, Britto C, Yaksic N, Cardoso MA, Morel CM, et al. High correlation between Chagas' disease serology and PCR-based detection of *Trypanosoma cruzi* kinetoplast DNA in Bolivian children living in an endemic area. *FEMS Microbiol Letter* 1994; 124: 419-23.
26. Brenière F, Bosseno MF, Tellería J, Bastrenta B, Jaksic N, Noireau F, et al. Different behavior of two *Trypanosoma cruzi* major clones: Transmission and circulation in Bolivian young patients. *Exp Parasitol* 1998; 89: 285-95.
27. Dedet J, Melogno R, Cardenas F, Valda L, David C, Fernandez V, et al. Rural camping to diagnose and treat mucocutaneous leishmaniasis in Bolivia. *Bull WHO* 1995; 73: 339-45.
28. David L, Dimier-David F, Vargas F, Torrez M, Dedet J. Fifteen years of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis in Bolivia: A retrospective study. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1993; 87: 7-9.

**Correspondencia:** Dra Bastrenta Brigitte.  
IRD/INLASA. Teléfono: 222 5280. E-mail:  
Bastrenta@ns.megalink.com