



TESIS DOCTORAL

DESARROLLO DE NUEVOS MÉTODOS NO INVASIVOS APLICADOS
AL DIAGNÓSTICO MEDIANTE PCR A TIEMPO REAL DE LA
LEISHMANIOSIS



SILVIA BELINCHÓN LORENZO

DEPARTAMENTO DE SANIDAD ANIMAL
UNIDAD DE PARASITOLOGÍA Y ENFERMEDADES PARASITARIAS

2017



TESIS DOCTORAL

DESARROLLO DE NUEVOS MÉTODOS NO INVASIVOS
APLICADOS AL DIAGNÓSTICO MEDIANTE PCR A TIEMPO
REAL DE LA LEISHMANIOSIS

SILVIA BELINCHÓN LORENZO

DEPARTAMENTO DE SANIDAD ANIMAL
UNIDAD DE PARASITOLOGÍA Y ENFERMEDADES PARASITARIAS

Conformidad de los Directores:

Dr. Luis Carlos Gómez Nieto Dra. Virginia Iniesta Orozco Dr. Juan Carlos Parejo Rosas

2017

LUIS CARLOS GÓMEZ NIETO, Doctor en Veterinaria, Profesor Titular de Parasitología y Enfermedades Parasitarias, del Departamento de Sanidad Animal, de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Extremadura,

INFORMA:

Que la licenciada en Veterinaria por la Universidad de Extremadura Dña. Silvia Belinchón Lorenzo ha realizado en esta Unidad, bajo mi dirección y junto con la supervisión de los Doctores Dña. Virginia Iniesta Orozco y D. Juan Carlos Parejo Rosas, el presente trabajo de investigación titulado "DESARROLLO DE NUEVOS MÉTODOS NO INVASIVOS APLICADOS AL DIAGNÓSTICO MEDIANTE PCR A TIEMPO REAL DE LA LEISHMANIOSIS", con el que opta al título de Doctora en Veterinaria.

Que en todo momento ha demostrado gran rigor científico en el desarrollo de esta memoria, utilizando todos los medios puestos a su alcance para la consecución de los objetivos marcados.

Por todo lo cual, y para que conste en su memoria de Doctorado, firmo junto con los codirectores el presente informe en Cáceres, a 10 de mayo de 2017.

El Director:

Dr. Luis Carlos Gómez Nieto

Los Codirectores:


Dra. Virginia Iniesta Orozco

Dr. Juan Carlos Parejo Rosas

La presente Tesis Doctoral está elaborada en el formato de compendio de publicaciones, según el Artículo 46 de la Resolución de 18 de febrero de 2014, por la que se ejecuta el acuerdo adoptado por el Consejo de Gobierno por el que se aprueba la modificación de la normativa de los estudios de Doctorado.

En esta memoria se incluyen los siguientes artículos, publicados en revistas indexadas en el ISI-JCR:

- **Detection of *Leishmania infantum* kinetoplast minicircle DNA by Real Time PCR in hair of dogs with leishmaniosis.**
Belinchón-Lorenzo, S., Iniesta, V., Parejo, J.C., Fernández-Cotrina, J., Muñoz-Madrid, R., Soto, M., Alonso, C., Gómez Nieto, L.C.
Vet. Parasitol. 2013 Feb 18; 192(1-3):43-50; doi: 10.1016/j.vetpar.2012.11.007.
- **First detection of *Leishmania infantum* kinetoplast DNA in hair of wild mammals: application of qPCR method to determine potential parasite reservoirs.**
Muñoz-Madrid, R., Belinchón-Lorenzo, S., Iniesta, V., Fernández-Cotrina, J., Parejo, J.C., Serrano, F.J., Monroy, I., Baz, V., Gómez-Luque, A., Gómez-Nieto, L.C.
Acta Trop. 2013 Dic; 128(3):706-9; doi: 10.1016/j.actatropica.2013.08.009.
- **Detection and chronology of parasitic kinetoplast DNA presence in hair of experimental *Leishmania major* infected BALB/c mice by Real Time PCR.**
Iniesta, V., Belinchón-Lorenzo, S., Soto, M., Fernández-Cotrina, J., Muñoz-Madrid, R., Monroy, I., Baz, V., Gómez-Luque, A., Parejo, J.C., Alonso, C., Nieto, L.C.
Acta Trop. 2013 Dic; 128(3):468-72; doi: 10.1016/j.actatropica.2013.07.007.
- **First detection of *Leishmania* kDNA in canine cerumen samples by qPCR.**
Belinchón-Lorenzo, S., Parejo, J.C., Iniesta, V., Fernández-Cotrina, J., Muñoz-Madrid, R., Monroy, I., Baz, V., Gómez-Luque, A., Serrano-Aguilera, F.J., Barneto, J.L., Gómez-Nieto, L.C.
Vet. Parasitol. 2016 Sep 15; 228:65-68; doi: 10.1016/j.vetpar.2016.05.021.

A thick, dark purple vertical bar is positioned on the left side of the page. From the bottom of this bar, several thin, curved lines in shades of purple and grey extend upwards and outwards, creating an abstract, organic shape.

Desarrollo de nuevos métodos no
invasivos aplicados al diagnóstico
mediante PCR a tiempo real de la
leishmaniosis

“Los signos de la naturaleza, sibilina y misteriosa, insinuante, han sido capaces de mostrar, efectivamente, a los seres humanos, el modo en que tenían que comportarse para conseguir ciertos fines”

Diego Belinchón Lorenzo

Escritor, filósofo, poeta y hermano

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	3
ABREVIATURAS	7
RESUMEN	9
ABSTRACT	11
1. INTRODUCCIÓN	13
1.1. Historia de la leishmaniosis.....	13
1.2. Taxonomía del género <i>Leishmania</i>	17
1.3. Morfología y ciclo de vida.....	19
1.4. Epidemiología	21
1.4.1. Importancia de la enfermedad humana a nivel mundial	21
1.4.2. Importancia de la enfermedad humana en España.....	22
1.4.3. Reservorios animales	24
1.5. La leishmaniosis canina.....	28
1.5.1. Epidemiología.....	29
1.5.2. Factores que influyen en el desarrollo de la enfermedad.....	32
1.5.3. Diagnóstico de la leishmaniosis canina	34
1.5.3.1. Signos clínicos y hallazgos biopatológicos.....	35
1.5.3.2. Diagnóstico inmunológico	38
1.5.3.3. Diagnóstico parasitológico	40
1.6. Funciones de la piel y su papel en la leishmaniosis.....	49

ÍNDICE

1.6.1. Barrera física epidérmica	50
1.6.2. Sistema inmune de la piel	51
1.6.3. Eliminación de sustancias exógenas a través de la piel	54
1.6.4. Carga parasitaria de la piel en perros con leishmaniosis	56
2. OBJETIVOS	59
3. MATERIALES, MÉTODOS Y RESULTADOS	61
3.1. Detection of <i>Leishmania infantum</i> kinetoplast minicircle DNA by Real Time PCR in hair of dogs with leishmaniosis. Vet. Parasitol. 192 (2013), 43-50.	61
3.2. First detection of <i>Leishmania infantum</i> kinetoplast DNA in hair of wild mammals: application of qPCR method to determine potential parasite reservoirs. Acta Trop. 128, (2013) 706-709.	71
3.3. Detection and chronology of parasitic kinetoplast DNA presence in hair of experimental <i>Leishmania major</i> infected BALB/c mice by Real Time PCR. Acta Trop. 128, (2013) 468-472.	77
3.4. First detection of <i>Leishmania</i> kDNA in canine cerumen samples by qPCR. Vet. Parasitol. 228, (2016) 65-68.	83
4. DISCUSIÓN.....	89
5. CONCLUSIONES	111
6. BIBLIOGRAFÍA	113
7. ANEXO.....	133
Descripción del método PCR a tiempo real utilizado en la Tesis.....	133

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría expresar mi gratitud a una serie de personas sin las cuales este proyecto no habría llegado a su fin.

Al Dr. Luis Carlos Gómez Nieto, por sus enseñanzas a lo largo de estos años y porque tuvo la gran idea que impulsó el nacimiento de esta Tesis. Admiro tu afán por la investigación porque consigues transmitirlo a los demás. Conmigo lo hiciste, y te lo agradeceré siempre.

A la Dra. Virginia Iniesta Orozco, por estar disponible en todo momento. Eres de las personas más trabajadoras y constantes que he conocido. Gracias por el apoyo y los ánimos.

Al Dr. Juan Carlos Parejo Rosas, porque sin su inestimable ayuda no habría conseguido sacar adelante la parte experimental de la Tesis. Fuiste mi salvación en muchos momentos duros.

A mis compañeros del Grupo LeishmanCeres, que aunque siendo completamente diferentes entre nosotros, hemos conseguido crear una unidad. En todos los años compartidos con vosotros he aprendido a trabajar en equipo y a solventar obstáculos.

Rubén, gracias por compartir incontables horas en el laboratorio. Ni la extracción de ADN ni la PCR tienen ya secretos para nosotros. Hemos evolucionado juntos estos años convirtiéndonos en magníficos *troubleshooters*.

A mi *matrimonio* favorito, Isabel y Victoria, gracias por todos esos análisis inmunológicos que hicisteis. Por ayudarme en cuanto os lo pedía. Por ofrecerme a compartir la *grandiosa* tarea de verificar las pipetas. Isabel, eres de las personas

AGRADECIMIENTOS

más agradables que conozco. Victoria, admiro tu energía y dinamismo. La de risas que me he echado con vosotras...

A José Luis quería decirle que desde que llegó al grupo mi vida mejoró mucho, no sólo por ayudarme a lidiar con mis *amigos* los comerciales, sino por ser como es.

Adela, gracias por animarme con tu simpatía. Con sólo escuchar tu risa contagiosa se me olvidaban todos los males. Sigue así siempre.

A Javier, gracias por ser tan atento y amable conmigo, siempre dispuesto a ayudar. Estoy en deuda contigo por ser capaz de localizar en el texto todos esos espacios sobrantes que nadie más puede ver.

Jaime, admiro el gran trabajo que haces, lo bien que conoces a los perros y el cariño con el que los tratas. Gracias por los todos ánimos que me has dado.

Manolo, gracias por sacarme una sonrisa en los momentos más insospechados y por prestarme tu ayuda siempre que la he necesitado.

A mi antiguo compañero Jesualdo, gracias por compartir tus conocimientos conmigo.

A los profesores de la Unidad de Parasitología y Enfermedades Parasitarias, gracias por la formación que me dieron y por su cercanía en estos años. Profesores David Reina, Enrique Pérez, Eva Frontera y Miguel Ángel Habela. Mención especial merece el profesor Francisco Serrano por el aporte de sus vastos conocimientos estadísticos.

A los compañeros de otros grupos de investigación que conocí en la unidad (sois tantos que no nombraré a nadie para no dejar a ninguno atrás), os doy las gracias por los buenos momentos vividos.

A Dani quería agradecerle su ayuda con todo el papeleo, de verdad que me has facilitado mucho la tarea. A trabajador no hay quien te gane. Enhorabuena por tu Tesis.

David, tu siempre has estado ahí en los peores momentos. No sabes cuánto te agradezco todas esas veces que me preguntaste que cómo estaba. Me alegro de que seas mi amigo.

A Justi, mi compañera en la Unidad de Genética, gracias por estar siempre ahí para ayudarme en todo lo que hiciera falta. He compartido muy buenos ratos contigo.

Además de nombrar a los compañeros, es necesario reconocer el incansable apoyo de mis padres, Francisco José y Leonor, y de mi hermano Diego. Aunque no os lo diga con frecuencia, os aprecio bastante (espero que lo sepáis).

Gracias también a todos los amigos que he ido haciendo a lo largo de los años, a los de Almendralejo, a los de la Universidad y a los del Máster. Gracias por decirme que podía con todo.

Es importante mencionar aquí a mis queridos gatos, capaces de levantarme el ánimo en los momentos más oscuros. Gracias, muchachos, porque si no he perdido totalmente la cordura ha sido por vosotros.

Desde aquí también quiero expresar mi agradecimiento a Laboratorios LETI, en particular a su presidente, el Sr. Jaime Grego, por el apoyo a esta investigación.

Por último (*last but not least*), gracias de todo corazón a Javi por su infinita paciencia, por animarme todos los días, por aguantarme tantos años. Esta tesis va dedicada enteramente a tu persona.

ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNk	ADN del kinetoplasto
CCAA	Comunidades Autónomas
CMBD	Conjunto Mínimo Básico de Datos
cPCR	PCR convencional
EDO	Enfermedad de declaración obligatoria
EEUU	Estados Unidos
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
IFI	Inmunofluorescencia indirecta
IFN- γ	Interferón gamma
Ig	Inmunoglobulina
IL-	Interleuquina
LC	Leishmaniosis cutánea
Lcan	Leishmaniosis canina
LV	Leishmaniosis visceral
LVZ	Leishmaniosis visceral zoonótica
MHC II	Complejo mayor de histocompatibilidad II
NRAMP1	<i>Natural resistance-associated macrophage protein 1</i>

ABREVIATURAS

OMS	Organización Mundial de la Salud
PAMPs	Patrones moleculares asociados a patógenos
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PQ	Proteína quimera
qPCR	PCR a tiempo real o cuantitativa
RENAVE	Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica
SLA	Antígeno total soluble de <i>Leishmania</i>
Slc11a1	Gen <i>Solute carrier family 11 member 1</i>
SMF	Sistema mononuclear fagocítico
SSU-ARNr	Gen de la subunidad pequeña del ARN ribosómico
TGF- β	Factor de crecimiento transformante beta
Th1	Linfocitos T colaboradores de tipo 1
Th2	Linfocitos T colaboradores de tipo 2
TLRs	Receptores de membrana tipo Toll
TNF- α	Factor de necrosis tumoral alfa
UV	Ultravioleta
VIH	Virus de inmunodeficiencia humana

RESUMEN

La leishmaniosis canina (Lcan) es una enfermedad parasitaria zoonótica transmitida por vectores. Es endémica en 50 países, afectando sobre todo a las regiones de la Cuenca Mediterránea y a Brasil. La Lcan está causada por al menos 12 especies de protozoos del género *Leishmania*, aunque el principal agente etiológico es *L. infantum* (sinónimo: *L. chagasi*). La leishmaniosis canina y la humana están estrechamente relacionadas, ya que el perro es el principal reservorio de *L. infantum*, causante de la leishmaniosis visceral zoonótica. Por lo tanto, el diagnóstico precoz de la enfermedad en el perro es de vital importancia como estrategia de control.

En la actualidad, el diagnóstico de la Lcan está basado en la combinación de datos clínicos y biopatológicos junto con análisis inmunológicos y parasitológicos. En concreto, la técnica parasitológica PCR a tiempo real (qPCR) se considera el método de referencia para el diagnóstico molecular de la Lcan, debido a que proporciona resultados reproducibles, sensibles y específicos.

Existe una gran controversia en cuanto a la elección de la mejor muestra para realizar el diagnóstico molecular de la Lcan mediante qPCR. Debido a que la mayoría de las muestras utilizadas habitualmente para este tipo de diagnóstico (bazo, ganglio linfático, médula ósea, piel y sangre) se obtienen de manera invasiva y cruenta, causando estrés al animal y rechazo por parte de los propietarios, en la actualidad la utilización de muestras no invasivas está cobrando cada vez mayor importancia. Sin embargo, existen pocos estudios enfocados al análisis de este tipo de muestras.

Por otra parte, se han descrito distintas propiedades que presenta la piel relacionadas con la leishmaniosis, destacando la eliminación transepidérmica de

RESUMEN

parásitos del género *Leishmania*, tanto en leishmaniosis visceral como en cutánea. Además, se ha demostrado ampliamente que los perros con leishmaniosis presentan elevadas cargas parasitarias en la piel.

Teniendo en cuenta ambas premisas, el propósito de este trabajo fue el estudio mediante análisis moleculares de muestras anejas a la piel obtenidas de forma no invasiva, procedentes de distintas especies animales y su posible aplicación en el diagnóstico de los diferentes tipos de leishmaniosis. Por ello se plantearon distintos objetivos: la evaluación del pelo, cerumen y queratinocitos epidérmicos de una población de perros con leishmaniosis adquirida de forma natural, el estudio del pelo de diversas especies de animales silvestres y el análisis del pelo de ratones infectados experimentalmente con la especie de tropismo cutáneo *Leishmania major*, todo ello utilizando el método molecular qPCR.

Mediante la realización de este estudio se ha detectado y cuantificado por primera vez ADN del kinetoplasto (ADNk) de *L. infantum* en el pelo, cerumen y queratinocitos epidérmicos de perros con leishmaniosis, así como en el pelo de diversas especies de mamíferos silvestres. También se ha determinado la cronología de la incorporación del ADNk de *L. major* al pelo en el modelo ratón BALB/c durante el curso de una infección experimental.

El presente trabajo ha realizado una nueva aportación al diagnóstico molecular de la leishmaniosis mediante el desarrollo de métodos fiables y precisos empleando muestras no invasivas, aplicables en estudios epidemiológicos e infecciones experimentales. La utilización de muestras no invasivas supone una serie de ventajas, ya que no necesitan condiciones especiales de almacenaje o transporte y además su obtención es fácil, rápida y no produce ningún daño a los animales.

ABSTRACT

Canine leishmaniosis (CanL) is a parasitic zoonotic vector-borne disease. It is endemic in 50 countries, affecting two major regions: the Mediterranean Basin and Brazil. CanL is caused by at least 12 species of protozoa of the genus *Leishmania*, although the main etiological agent is *L. infantum* (synonym: *L. chagasi*). Canine and human leishmaniosis are closely related, since dogs are the main reservoir of *L. infantum*, which causes zoonotic visceral leishmaniosis. Thus, early diagnosis of the canine disease is crucial as a control strategy.

Nowadays, the diagnosis of CanL is based on the combination of clinical and biopathological data along with immunological and parasitological analyses. In particular, the parasitological technique Real Time PCR (qPCR) is considered the reference method for the molecular diagnosis of CanL, due to its accuracy, sensitivity and specificity.

There is controversy about which is the best sample for the molecular diagnosis of CanL by qPCR analysis. Despite the most common used samples for this purpose (spleen, lymph node, bone marrow, skin and blood) are obtained by invasive and harmful ways causing stress to the animals and owners' reluctance, the use of non-invasive samples is currently becoming more important. However, there are few studies focused on the analysis of this kind of samples.

On the other hand, different skin properties related to leishmaniosis have been described, emphasizing the transepidermal elimination of parasites of the genus *Leishmania* in both visceral and cutaneous leishmaniosis. Moreover, it has also been widely demonstrated that dogs with leishmaniosis can harbour high parasitic loads on the skin.

ABSTRACT

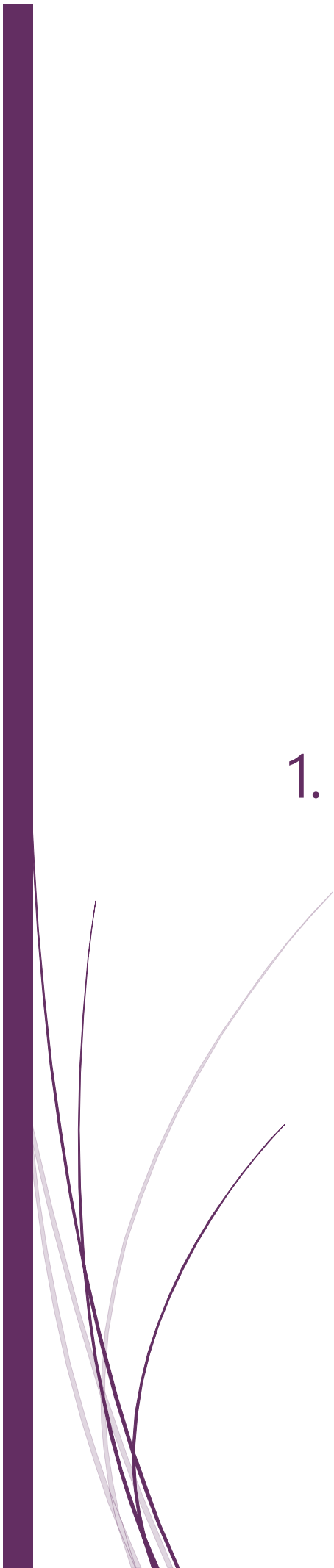
Taking all of these into account, the purpose of this thesis was the study of skin annexes samples obtained from different animal species by non-invasive ways using molecular analysis and the possible applications in the diagnosis of the different forms of leishmaniosis.

Thus, the objectives of the work were, using the molecular method qPCR: to evaluate hair, cerumen and epidermal keratinocytes from a population of dogs with leishmaniosis naturally infected, to study hair from different wild animals and to analyze hair from mice experimentally infected with *Leishmania major* (cutaneous leishmaniosis model).

The results obtained in this study show the first detection of *L. infantum* kinetoplast DNA (kDNA) in hair, cerumen and epidermal keratinocytes of dogs with leishmaniosis and in hair from different wild animals. It has been also determined the chronology of the appearance of *L. major* kDNA to the hair in the murine model BALB/c during a follow up period of infection.

The present work has made a new contribution to the molecular diagnosis of leishmaniosis by developing reliable and accurate methods using non-invasive samples, which can be applied in epidemiological studies and experimental infections. The use of non-invasive samples has many advantages, since they do not need special storage or transport conditions, and the sampling is fast, easy and harmless to animals.

1. INTRODUCCIÓN



1. INTRODUCCIÓN

1.1. Historia de la leishmaniosis

En esta breve reseña histórica se van a describir las primeras referencias a las distintas formas de leishmaniosis presentes en el Viejo y Nuevo Mundo, así como en España, aludiendo al descubrimiento del agente causal de cada una de ellas.

Viejo Mundo

La leishmaniosis cutánea (LC) del Viejo Mundo, también conocida como “Botón de Oriente”, es una enfermedad muy antigua caracterizada por lesiones consistentes en nódulos o pápulas en cuyo centro se forma una costra que al desprenderse deja una úlcera (OMS, 2010). Las primeras descripciones de estas lesiones datan del siglo VII a.C., encontradas en Mesopotamia en la biblioteca del Rey Ashurbanipal. Así mismo, médicos árabes del siglo X incluyendo a Avicena, describieron este tipo de lesiones en lugares como Afganistán, Bagdad (Irak) y Jericó (Palestina) (Cox, 2002). Por último, Alexander Russell en 1756 tras examinar a un paciente turco nombró a la enfermedad como “Botón de Aleppo”, sin conocer aún la causa que la producía (Bari, 2006).

Existe una gran controversia acerca de a quién se le atribuye el descubrimiento del agente causal de esta enfermedad. Aunque suele adjudicarse a James Homer Wright en 1903 (Cox, 2002), otros autores antes que él describieron estructuras que podrían corresponderse con parásitos del género *Leishmania*.

David Cunningham en 1885 examinó una muestra procedente de una lesión llamada “Botón de Delhi”, encontrando unos cuerpos nucleoides a los que erróneamente asignó un origen fúngico (Bari, 2006).

INTRODUCCIÓN

P.F. Borowsky en 1898 indicó que los agentes causales de estas lesiones eran protozoos, aunque no asignó ningún nombre a su hallazgo (Bari, 2006).

La leishmaniosis visceral (LV) del Viejo Mundo, también conocida como "Kala-Azar" o "Fiebre Negra", produce fiebre, anorexia y esplenomegalia. El primer dato conocido de esta enfermedad se remonta al año 1824 en Jessore (India). Entre los años 1862 y 1870 la LV fue considerada una epidemia, ya que se diseminó por gran parte de la India (Cox, 2002). Los médicos de la época observaron que las personas más afectadas eran aquéllas que vivían en casas de barro. Al principio se pensó que la enfermedad era producida por ancylostomátidos e incluso se propuso que era una forma virulenta de malaria (Chattopadhyaya, 2011). El agente causal del Kala-Azar fue descubierto simultáneamente en el año 1900 por dos eminentes científicos: Leishman y Donovan.

William Boog Leishman (Figura 1) realizó la autopsia de un soldado procedente de Dum Dum (Calcuta, India) que presentaba fiebre, anemia y esplenomegalia. Tras estudiar un fragmento del bazo realizando un frotis y observando el contenido al microscopio, Leishman encontró numerosas formas ovales en el interior de los macrófagos, concluyendo erróneamente que esas estructuras correspondían a trypanosomas degenerados (Bailey y Bishop, 1959; Chattopadhyaya, 2011).

Charles Donovan (Figura 2) también observó las formas descritas por Leishman en biopsias esplénicas obtenidas *in vivo* de pacientes con síntomas de Kala-Azar. Donovan concluyó que la presencia de estas estructuras en tejido vivo indicaba que no podían tratarse de parásitos degenerados del género *Trypanosoma*, sino de otros organismos (Bailey y Bishop, 1959; Molyneux y Ashford, 1983).



Figura 1: William B. Leishman



Figura 2: Charles Donovan

Las observaciones de Leishman y Donovan fueron publicadas prácticamente a la vez en el año 1903, por lo que existió una gran controversia sobre a quién se le debía acreditar el descubrimiento del agente causal del Kala-Azar. Finalmente, en ese mismo año, un respetado médico de la época llamado Sir Ronald Ross nombró a las formas encontradas “cuerpos de Leishman-Donovan” con la designación taxonómica de *Leishmania donovani* (Bailey y Bishop, 1959; Chattopadhyaya, 2011), adjudicando el novedoso hallazgo a ambos científicos.

Nuevo Mundo

La LC del Nuevo Mundo se caracteriza por producir lesiones maculares o papulares que se ulceran y se extienden formando lesiones crateriformes ovaladas y desfigurativas (OMS, 2010). Esta enfermedad ha estado presente desde la época precolombina, demostrado por la existencia de vasijas de cerámica con forma humana (llamadas “huacos”) que mostraban lesiones deformantes, especialmente en nariz y labio superior, procedentes de esta época (Oumeish, 1999; Bari, 2006). Además, textos recogidos en los siglos XV-XVI y durante la colonización española describen la presencia de úlceras en la piel de agricultores que procedían de los Andes (Oumeish, 1999).

INTRODUCCIÓN

En un principio se pensó que el agente causal de la leishmaniosis cutánea en el Nuevo Mundo era el mismo que producía la enfermedad del Viejo Mundo, sin embargo, Gaspar Vianna en 1911 observó que se trataba de una nueva especie, a la que llamó *Leishmania braziliensis* (Cox, 2002).

España

El primer caso español de Kala-Azar fue diagnosticado en Tortosa (Tarragona) en 1912 por el doctor Gustavo Pittaluga (Figura 3), quién observó parásitos del género *Leishmania* en una muestra de bazo de un paciente sospechoso. Posteriormente, en 1925 ya se habían confirmado mediante punción esplénica más de 300 casos de la enfermedad (Botet y Portús, 1993). En cuanto al Botón de Oriente, fue descrito simultáneamente por Camacho Alejandre y Fernández Martínez en la costa occidental de Andalucía en 1914.



Figura 3: Gustavo Pittaluga

Investigaciones posteriores concluyeron que ambas enfermedades eran frecuentes y afectaban a gran parte del país, siendo conocidas como “bazo de leche” o “mal de melsa” (Kala-Azar) y “llunari” (Botón de Oriente), antes de que se estableciese el agente causante de ambas (Botet y Portús, 1993).

Por último, destacar que el primer caso de leishmaniosis canina en España fue descrito en 1914 también por el doctor Pittaluga en la comarca de Tortosa (Botet y Portús, 1993).

1.2. Taxonomía del género *Leishmania*

Desde la primera descripción del género *Leishmania* en 1903 (Bailey y Bishop, 1959), el número de especies que lo componen ha ido variando a lo largo de los años.

Se han realizado numerosas clasificaciones del género, basadas sobre todo en criterios clínicos, biológicos, geográficos y epidemiológicos y más tarde en datos bioquímicos (Schönian *et al.*, 2010).

Entre 1916 y 1961 la clasificación vigente era de tipo linneana, basada únicamente en caracteres extrínsecos (Akhoundi *et al.*, 2016).

Más tarde, Lainson y Shaw en 1987 utilizando electroforesis de enzimas dividieron el género *Leishmania* en dos subgéneros: *L. (Leishmania)*, presente en el Viejo y Nuevo Mundo, y *L. (Viannia)*, presente sólo en el Nuevo Mundo (Schönian *et al.*, 2010). Esta clasificación fue revisada y completada por Rioux *et al.*, en el año 1990.

Más tarde, Cupolillo *et al.*, en el año 2000 propusieron otra clasificación según datos moleculares, dividiendo a las especies de *Leishmania* en dos grandes secciones: la sección *Euleishmania*, que comprende los subgéneros *Leishmania*, *Viannia* y *Sauroleishmania* (cada uno de ellos engloba un complejo de especies), y la sección *Paraleishmania*.

Debido a que el número de especies de *Leishmania* que se han descrito a lo largo de los años no deja de crecer, la taxonomía del género debe ser revisada con regularidad (Fernández-Cotrina, 2016).

A continuación se detalla la taxonomía del género *Leishmania* de acuerdo a la última clasificación propuesta (Akhoundi *et al.*, 2016):

INTRODUCCIÓN

Reino *Protozoa* (Goldfuss, 1818)

Clase *Kinetoplastea* (Honigberg, 1963)

Subclase *Metakinetoplastina* (Vickerman, 2004)

Orden *Trypanosomatida* (Kent, 1880)

Familia *Trypanosomatidae* (Döflein, 1901)

Subfamilia *Leishmaniinae* (Maslov y Lukeš, 2012)

Género *Leishmania* (Ross, 1903)

Para concluir con el apartado de taxonomía, en las siguientes tablas se reflejan los distintos complejos y especies incluidos en los subgéneros *Leishmania* (Tabla 1) y *Viannia* (Tabla 2), modificadas de Akhouni *et al.*, 2016:

Subgénero <i>Leishmania</i>			
Complejo <i>L. tropica</i>	Complejo <i>L. major</i>	Complejo <i>L. donovani</i>	Complejo <i>L. mexicana*</i>
<i>L. killicki</i> <i>L. aethiopica</i> <i>L. tropica</i>	<i>L. gerbilli</i> <i>L. turanica</i> <i>L. arabica</i> <i>L. major</i>	<i>L. archibaldi</i> <i>L. infantum</i> <i>L. chagasi*</i> <i>L. donovani</i>	<i>L. pifanoi</i> <i>L. amazonensis</i> <i>L. garnhami</i> <i>L. venezuelensis</i> <i>L. aristidesi</i> <i>L. forattinii</i> <i>L. mexicana</i>

Tabla 1: Especies que componen el subgénero *Leishmania* (Ross, 1903). Todas estas especies están presentes en el Viejo Mundo, salvo *L. chagasi* y el complejo *L. mexicana* (marcadas con *), que se encuentran en el Nuevo Mundo.

Subgénero <i>Viannia</i>		
Complejo <i>L. braziliensis</i>	Complejo <i>L. guyanensis</i>	Complejo <i>L. lainsoni</i>
<i>L. peruviana</i> <i>L. braziliensis</i>	<i>L. panamensis</i> <i>L. shawi</i> <i>L. guyanensis</i>	<i>L. naiffi</i> <i>L. linderbergi</i> <i>L. utingensis</i> <i>L. lainsoni</i>

Tabla 2: Especies que componen el subgénero *Viannia* (Lainson y Shaw, 1987), presentes en el Nuevo Mundo.

1.3. Morfología y ciclo de vida

El ciclo de vida de los parásitos del género *Leishmania* (Figura 4) es de tipo heteroxeno, necesitando dos hospedadores para llevarse a cabo: el hospedador vertebrado definitivo, que desarrolla la infección y el hospedador intermediario, un insecto que actúa como vector. Todas las especies de *Leishmania* tienen como vector a los mosquitos hembras de los géneros *Phlebotomus* (Viejo Mundo) y *Lutzomyia* (Nuevo Mundo), existiendo unas 30 especies entre los dos géneros (Ashford, 2000). Los hospedadores vertebrados mamíferos más comunes son los cánidos y los roedores.

A lo largo del ciclo los parásitos presentan dos tipos morfológicos diferenciados:

-Promastigote: forma alargada, flagelada y móvil, localizada en el aparato digestivo del flebotomo (Handman, 1999).

-Amastigote: forma intracelular aflagelada, redondeada e inmóvil. Se localiza y multiplica en las células del sistema mononuclear fagocítico (SMF) del hospedador mamífero, sobre todo en los macrófagos (Handman, 1999).

El ciclo de vida comienza cuando un mosquito hembra pica a un hospedador vertebrado infectado e ingiere las formas amastigote. En el tracto digestivo del mosquito los amastigotes se transforman en promastigotes procíclicos, no infectivos pero capaces de replicarse activamente (Besteiro *et al.*, 2007). A continuación tiene lugar la metacicloogénesis, proceso que consiste en la transformación de los promastigotes procíclicos a metacíclicos, forma infectiva sin capacidad de replicación (Besteiro *et al.*, 2007). Estos promastigotes infectivos migran a la región bucal o probóscide del vector, desde donde son transmitidos al hospedador definitivo (Pimenta *et al.*, 1992).

INTRODUCCIÓN

Cuando el mosquito inocula los promastigotes, el sistema inmune del vertebrado puede llegar a eliminar hasta el 80% de los parásitos (Lewis y Peters, 1977). A pesar de ello, un porcentaje de promastigotes evade este mecanismo, pasando a ser fagocitados por células del SMF de la dermis y localizándose en el interior de los fagolisosomas. En el macrófago la forma promastigote se transforma en amastigote e inactiva los mecanismos anti-*Leishmania* que éste produce contra el parásito (Bogdan y Rölinghoff, 1998). Al no ser controlados por el macrófago, los amastigotes se multiplican activamente por división binaria (Antoine *et al.*, 1990) hasta lisis de las células hospedadoras. Los amastigotes invaden otros macrófagos, repitiendo el proceso multiplicativo para acabar diseminándose por todo el SMF. Por último, el ciclo se completa cuando un mosquito ingiere macrófagos parasitados de un hospedador vertebrado.

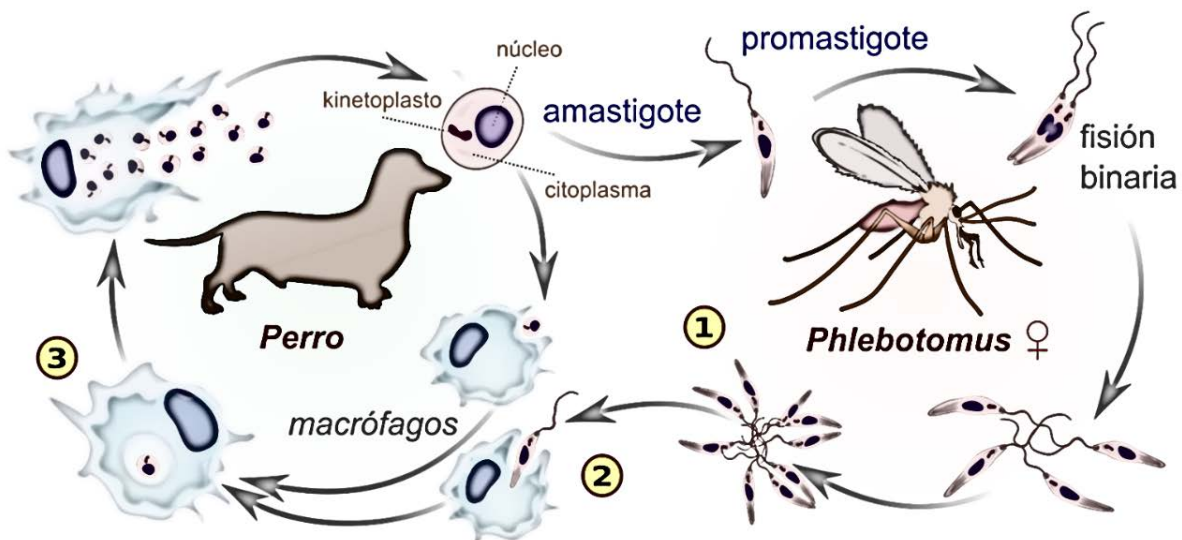


Figura 4: Ciclo de *Leishmania sp.* 1) los promastigotes metacíclicos son inoculados al vertebrado por las hembras del mosquito vector, 2) los parásitos se diferencian a amastigotes al ser fagocitados por los macrófagos del hospedador y 3) diseminación de la infección tras la lisis de los macrófagos. (Imagen cedida por el Profesor Francisco Serrano. Universidad de Extremadura).

1.4. Epidemiología

1.4.1. Importancia de la enfermedad humana a nivel mundial

La distribución de la leishmaniosis humana a nivel mundial se ha ido expandiendo a lo largo de las dos últimas décadas. Numerosos factores aumentan el riesgo de padecer la enfermedad, como la malnutrición, condiciones socioeconómicas precarias, cambios climáticos y medioambientales, inmunosupresión (infección conjunta con VIH, pacientes trasplantados, etc.) y la rápida urbanización de algunas zonas (OMS, 2015).

Se ha comprobado que existen más de 20 especies de *Leishmania* que pueden afectar a los humanos (Desjeux, 2004). La leishmaniosis humana se considera endémica en 98 países, con más de 350 millones de personas en riesgo de padecerla. Se estima que cada año se producen entre 0,9 y 1,3 millones de nuevos casos y de 20.000 a 30.000 defunciones (OMS, 2010).

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), se estima que el 90% de casos de LV ocurren en Bangladesh, Brasil, Etiopía, India y Sudán, teniendo lugar cada año entre 200.000 y 400.000 nuevos casos (OMS, 2016).

En cuanto a la LC, cada año se recogen entre 0,7 y 1,3 millones de nuevos casos, produciéndose al menos el 95% en América, Cuenca Mediterránea, Oriente Medio y Asia Central (OMS, 2010).

Por último, los casos de leishmaniosis mucocutánea tienen lugar principalmente en Brasil, Perú y Bolivia (OMS, 2015).

Recientemente la OMS ha publicado los datos correspondientes al número de casos de leishmaniosis registrados en el año 2014 en 25 países con alta

INTRODUCCIÓN

prevalencia de la enfermedad, ascendiendo a más de 185.000 casos, de los que el 83% corresponden a LC (OMS, 2016).

A pesar de su alta incidencia en la especie humana, la leishmaniosis sigue siendo una de las enfermedades más desatendidas en todo el mundo, incluso sabiendo que el número de casos que ocurren en el mundo es considerablemente mayor que el notificado oficialmente (Alvar *et al.*, 2012). Si tenemos en cuenta que únicamente en el 34% de los países endémicos la leishmaniosis es considerada una enfermedad de declaración obligatoria (EDO), revisar el estatus de endemidad a nivel mundial aumentaría la importancia de la enfermedad y la implementación de estrategias para su control.

1.4.2. Importancia de la enfermedad humana en España

La vigilancia de la leishmaniosis humana en España comenzó en el año 1982 (Amela *et al.*, 2012), cuando fue incluida en la lista de enfermedades de declaración obligatoria. Sin embargo, tras la creación de la Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica o RENAVE, la leishmaniosis pasó a considerarse EDO de ámbito regional. Por ello la enfermedad solamente se declararía en las Comunidades Autónomas (CCAA) consideradas endémicas: Andalucía, Aragón, Baleares, Cantabria, Castilla-León, Cataluña, Comunidad Valenciana, Extremadura, Madrid, Murcia, Navarra y La Rioja (Amela *et al.*, 2012; Suárez-Rodríguez *et al.*, 2012).

Los casos de leishmaniosis humana ocurridos en España pueden consultarse tanto en la base de datos de la RENAVE como en el Registro de Altas Hospitalarias denominado Conjunto Mínimo Básico de Datos (CMBD), que recoge información de al menos el 98% de los hospitales públicos del país (Gil

Prieto *et al.*, 2011). Estudios recientes han comparado los datos obtenidos de ambos registros, observándose diferencias notables en cuanto al número de casos de leishmaniosis recogidos (Suárez-Rodríguez *et al.*, 2012; Herrador *et al.*, 2015). Así, la RENAVE registró 1.755 casos para el período 1996-2011 de las 12 CCAA consideradas endémicas, mientras que el CMBD notificó 3442 casos durante los años 1997-2011 de todas las CCAA (Figura 5).

Estas diferencias indican una importante falta de notificación de casos a la RENAVE (Suárez-Rodríguez *et al.*, 2012; Herrador *et al.*, 2015). Este hecho, unido al registro de casos de leishmaniosis en todas las CCAA y al incremento de los casos desde 2009 hasta 2012 a raíz de un brote de la enfermedad en la comunidad de Madrid, llevó a reconsiderar la clasificación de España como zona endémica de la leishmaniosis (Amela *et al.*, 2012). Finalmente, en el año 2015 la leishmaniosis volvió a incluirse en la RENAVE como enfermedad de declaración obligatoria a nivel nacional.

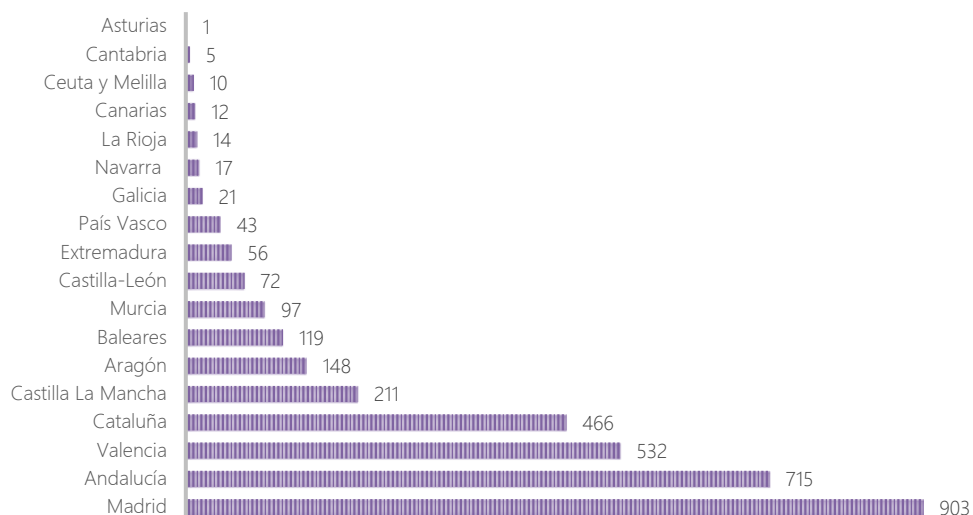


Figura 5: Número de casos de leishmaniosis notificados por el CMBD en las distintas comunidades autónomas de España durante los años 1997-2011, ordenados de menor a mayor incidencia. De los 3442 casos recogidos, el 82,6% correspondieron a LV, el 3,4% a LC y el 14,3 % restante a formas no determinadas (Fuente: Herrador *et al.*, 2015).

1.4.3. Reservorios animales

En función de su ciclo epidemiológico y de la fuente de infección humana, las leishmaniosis pueden clasificarse en antroponóticas (cuyo ciclo es mantenido únicamente por el ser humano) y zoonóticas (en las que es necesaria la participación de hospedadores reservorios animales para el mantenimiento de la enfermedad) (Desjeux, 2004).

Se entiende como hospedador reservorio aquella especie animal responsable del mantenimiento a largo plazo de una población de agentes infecciosos (Ashford, 1996). Los reservorios pueden clasificarse como primarios o principales, secundarios y accidentales (Quinnell y Courtenay, 2009; Maia y Campino, 2011). Los principales son los responsables de la transmisión de la infección y del mantenimiento indefinido del parásito. Los secundarios pueden transmitir la infección, pero no pueden mantener al parásito en ausencia del reservorio principal (Quinnell y Courtenay, 2009; Maia y Campino, 2011). Por último, los reservorios accidentales a pesar de que pueden infectarse, no tienen ninguna participación en el ciclo biológico (OMS, 2010).

En numerosos trabajos de investigación se ha descrito la presencia de especies de *Leishmania* que provocan leishmaniosis dérmicas, mucosas y viscerales en multitud de especies animales, domésticas o silvestres, tanto en el Nuevo como en el Viejo Mundo (Quinnell y Courtenay, 2009; Pennisi, 2015). Como ejemplo, en España la utilización de métodos serológicos ha permitido la detección de anticuerpos frente a *L. infantum* (aunque en general con niveles bajos) en carnívoros, roedores, rumiantes y équidos (Fisa *et al.*, 1999; Portús *et al.*, 2002; Solano-Gallego *et al.*, 2003; Fernández-Bellon *et al.*, 2006). Recientemente, el uso

de técnicas moleculares más sensibles, como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) ha permitido ampliar el conocimiento sobre el número de especies que han sido infectadas por *L. infantum* (Millán *et al.*, 2014). El registro de estos hallazgos realizados en España se recoge en la Tabla 3.

Especie	Autores
Ardilla roja (<i>Sciurus vulgaris</i>)	Vázquez, 2013
Conejo común (<i>Oryctolagus cuniculus</i>)	Chitimia <i>et al.</i> , 2011; Díaz-Sáez <i>et al.</i> , 2014; García <i>et al.</i> , 2014
Guarduña (<i>Martes foina</i>)	Vázquez, 2013; Del Río <i>et al.</i> , 2014
Gato montés (<i>Felis silvestris silvestris</i>)	Del Río <i>et al.</i> , 2014
Gineta (<i>Genetta genetta</i>)	Sobrino <i>et al.</i> , 2008; Millán <i>et al.</i> , 2011; Del Río <i>et al.</i> , 2014
Liebre europea (<i>Lepus europaeus</i>)	Ruiz-Fons <i>et al.</i> , 2013
Liebre ibérica (<i>Lepus granatensis</i>)	Molina <i>et al.</i> , 2012; Ruiz-Fons <i>et al.</i> , 2013
Lince ibérico (<i>Lynx pardinus</i>)	Sobrino <i>et al.</i> , 2008
Lobo (<i>Canis lupus</i>)	Sastre <i>et al.</i> , 2008; Sobrino <i>et al.</i> , 2008
Marta (<i>Martes martes</i>)	Millán <i>et al.</i> , 2011; Del Río <i>et al.</i> , 2014
Meloncillo (<i>Herpestes ichneumon</i>)	Sobrino <i>et al.</i> , 2008
Tejón (<i>Meles meles</i>)	Del Río <i>et al.</i> , 2014
Turón (<i>Mustela putorius</i>)	Del Río <i>et al.</i> , 2014
Visón americano (<i>Mustela vison</i>)	Vázquez, 2013
Visón europeo (<i>Mustela lutreola</i>)	Del Río <i>et al.</i> , 2014
Zorro rojo (<i>Vulpes vulpes</i>)	Criado-Fornelio <i>et al.</i> , 2000; Sobrino <i>et al.</i> , 2008; Del Río <i>et al.</i> , 2014

Tabla 3: Relación de mamíferos en los que se ha detectado ADN de *L. infantum* por métodos moleculares en España. Salvo en el caso de las liebres ibéricas, no se ha demostrado que estas especies sean capaces de transmitir el parásito a los vectores.

Sin embargo, la mera presencia del parásito en los individuos de una especie en concreto no convierte a estos animales en reservorios principales, sino que hay que demostrar que el mantenimiento de la población de parásitos depende de los mismos. Por ello, la OMS estableció unos criterios que debe cumplir una especie animal para ser considerada reservorio de *Leishmania spp.* (OMS, 2010).

INTRODUCCIÓN

Entre estos criterios destacan la necesidad de un contacto intenso entre el mamífero y los flebotomos, el desarrollo crónico de la enfermedad en el mamífero para mantener la infección y la localización de los parásitos en la piel y la sangre en número suficiente como para asegurar la transmisión al vector. Por último, la especie de *Leishmania* presente en el reservorio potencial debe ser la misma que la que afecta al ser humano.

Todos estos requisitos los cumple el perro doméstico (*Canis familiaris*), que es el principal reservorio de *L. infantum* (Ashford, 1996; Dantas-Torres, 2007). Esta especie es la responsable de la LV zoonótica (LVZ), enfermedad de gran importancia a nivel mundial, propia de América, Oriente Medio, Asia Central, China y la Cuenca Mediterránea. La leishmaniosis canina (Lcan) es endémica en 50 países (incluidos dentro de los 98 en los que está presente la leishmaniosis humana), siendo Brasil y la Cuenca Mediterránea las regiones más afectadas (Campino y Maia, 2013).

Actualmente se está centrando el interés en el estudio de otro animal doméstico como posible reservorio de la enfermedad, el gato. Considerado un reservorio accidental en el pasado, varias razones como la presencia de un gran número de gatos infectados por *L. infantum* en países en los que la leishmaniosis es endémica (Maia y Campino, 2011, Campino y Maia, 2013), apuntan a que estos animales podrían actuar como reservorios secundarios. Como ejemplo, en España se han detectado 21 casos de gatos infectados por *L. infantum* entre 1977 y 2014 (Pennisi, 2015), además de algunos casos en Suiza de gatos que procedían o habían viajado a España (Rüfenacht *et al.*, 2005). Otra razón que sustenta la implicación de los gatos en la LVZ es que experimentos de xenodiagnóstico han demostrado que estos animales pueden transmitir *L. infantum* a los

flebotomos (Pennisi, 2015). Por todo ello es necesario realizar estudios para determinar cuál es el verdadero papel de los gatos en la epidemiología de la LVZ (Campino y Maia, 2013).

Siguiendo con la participación de otros animales como reservorios de la enfermedad, es importante destacar lo que ocurrió recientemente en España, donde entre los años 2009 y 2012 tuvo lugar un brote epidémico de leishmaniosis humana en el Suroeste de la Comunidad de Madrid en el que se contabilizaron 446 casos (Arce *et al.*, 2013). Al investigar las causas de este brote no se encontró un incremento de la prevalencia de la enfermedad en perros (Amela *et al.*, 2012); sin embargo, se observó la presencia de una gran población de liebres ibéricas (*Lepus granatensis*) en un parque construido recientemente cerca de las zonas donde se habían diagnosticado casos en humanos (Molina *et al.*, 2012). Este parque, anteriormente zona de uso agrícola, suponía un ecosistema idóneo para los flebotomos y propiciaba el aumento de la población de lepóridos al estar prohibida la caza y no existir depredadores naturales (Amela *et al.*, 2012; Molina *et al.*, 2012). Por estas razones se llevó a cabo un estudio mediante xenodiagnóstico, demostrándose por primera vez que liebres aparentemente sanas habían sido infectadas de manera natural por *L. infantum* y que, además, estos animales podían transmitir el parásito a los flebotomos (Molina *et al.*, 2012). Continuando con el estudio de esta especie, se demostró mediante métodos moleculares que el 44% de las liebres (ibéricas y europeas) recogidas entre 2004 y 2010 de diferentes áreas geográficas de España presentaba ADN de *L. infantum* (Ruiz-Fons *et al.*, 2013). Estos hallazgos indican que la liebre desempeña un papel importante en la epidemiología de *L. infantum* en España, pudiendo ser considerada, al menos, reservorio secundario (Molina *et al.*, 2012).

INTRODUCCIÓN

Volviendo al perro doméstico y debido al papel que desempeña esta especie como principal reservorio de *L. infantum*, a continuación se describirán diversos aspectos importantes sobre la leishmaniosis canina.

1.5. La leishmaniosis canina

La leishmaniosis canina (Lcan) es una enfermedad transmitida por vectores, causada por protozoos del género *Leishmania* y presente en perros de todos los continentes salvo Oceanía (Dantas-Torres *et al.*, 2012). La enfermedad es endémica en unos 50 países, afectando sobre todo a Brasil y a las regiones de la Cuenca Mediterránea (Campino y Maia, 2013). Se estima que sólo en Europa existen al menos 2,5 millones de perros infectados (Moreno y Alvar, 2002).

Aunque se han encontrado 12 especies de *Leishmania* capaces de infectar a los perros, el principal agente etiológico de la Lcan es *L. infantum* en el Viejo Mundo, sinónimo de *L. chagasi* en el Nuevo Mundo (Dantas-Torres *et al.*, 2012).

Debido al carácter zoonótico de *L. infantum*, los perros infectados representan un importante problema tanto para la medicina veterinaria como para la salud pública (Palatnik-de-Sousa y Day, 2011), ya que esta enfermedad puede ser un grave problema para niños, ancianos y adultos inmunodeprimidos (OMS, 2010; Maia y Cardoso, 2015).

Los vectores que transmiten el parásito son las hembras de mosquitos de los géneros *Phlebotomus* (en el Viejo Mundo) y *Lutzomyia* (en el Nuevo Mundo), conociéndose al menos 15 especies diferentes capaces de actuar como vectores (Saridomichelakis, 2009).

Generalmente, los mosquitos habitan durante el día en zonas con humedad, oscuras y con materia en descomposición y están activos al atardecer y al amanecer. Por ello los perros con más riesgo de contraer la enfermedad son aquellos que viven en zonas endémicas y duermen en el exterior toda la noche (Saridomichelakis, 2009). Principalmente, los mosquitos pican en las áreas corporales en las que el pelo es escaso, como el puente nasal, pabellón de la oreja y zonas inguinal y perianal (Killick-Kendrick, 1999; Maia y Cardoso, 2015). Bajo condiciones favorables, un perro puede recibir más de 700 picaduras en una sola noche (Killick-Kendrick y Rioux, 2002).

Mientras que en Sudamérica el clima propicia el desarrollo de los flebotomos durante todo el año (Dantas-Torres *et al.*, 2012), en los países mediterráneos existe una marcada estacionalidad, al estar activos desde primavera hasta finales de verano y prefiriendo temperaturas de entre 15-28°C, junto con humedad moderada y ausencia de vientos fuertes (Killick-Kendrick, 1999; Maroli *et al.*, 2013).

1.5.1. Epidemiología

Regiones endémicas

La Lcan es endémica en multitud de países y regiones (Baneth, 2006) incluyendo Sudamérica, varias zonas de África, India, China y la Cuenca Mediterránea (Figura 6). Además, la Lcan también se considera endémica en varias zonas de Estados Unidos (Figura 6) (Petersen, 2009; Petersen y Barr, 2009) a raíz de un brote ocurrido en una perrera de Nueva York en 1999 (Gaskin *et al.*, 2002). Desde este momento aumentó el número de casos, habiéndose detectado perros con leishmaniosis en 18 estados de EEUU y dos provincias canadienses (Duprey *et al.*, 2006).

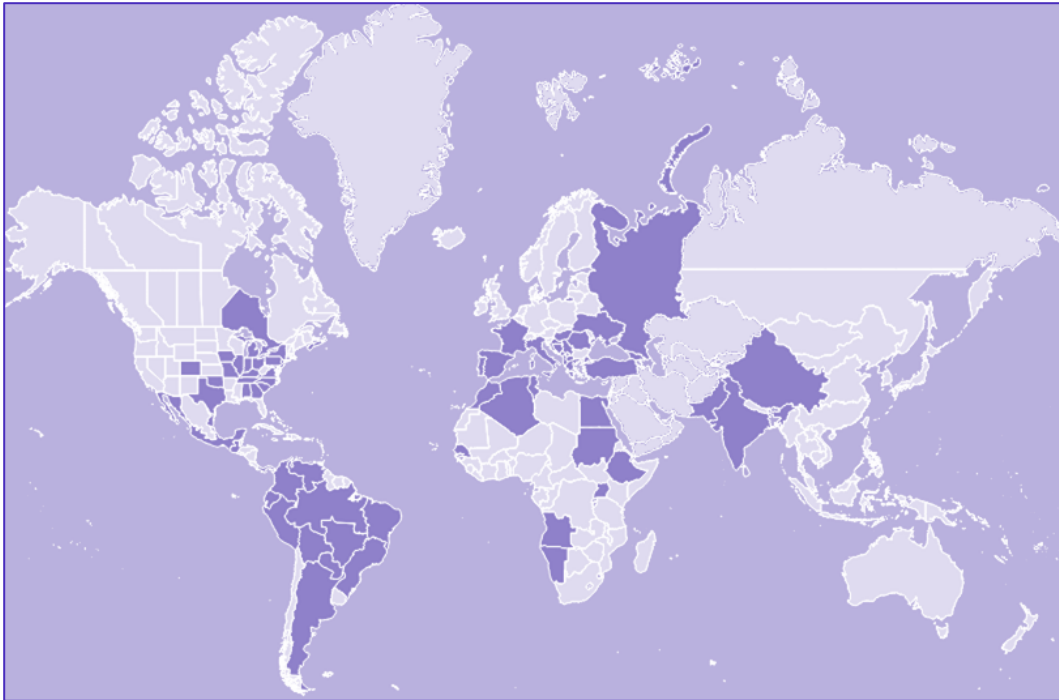


Figura 6: Distribución mundial de la leishmaniosis canina. Las zonas resaltadas en morado oscuro corresponden a las regiones consideradas endémicas. Fuente: Modificado de Companion Vector Borne Diseases (www.cvbd.org/en/ocurrence-maps/world-map)

En cuanto a los países del sur de Europa, un estudio reciente compiló los datos de más de 500.000 perros analizados entre 1971 y 2006 procedentes de España, Portugal, Italia y Francia, obteniendo una seroprevalencia global del 23.3%, con valores puntuales de más del 80% en los tres primeros países y alcanzando la máxima seroprevalencia en Francia, con un valor del 43% (Franco *et al.*, 2011).

En lo que respecta a España, a lo largo de los últimos 30 años se han realizado distintos estudios epidemiológicos de norte a sur del país, con grandes diferencias en cuanto a la prevalencia obtenida dependiendo del área geográfica estudiada (Muniesa *et al.*, 2016). Aun así, es complicado conocer la distribución real de la Lcan en España, debido a la gran heterogeneidad de los estudios realizados en cuanto a número de individuos, condición clínica de los mismos y método de diagnóstico empleado (Morales-Yuste *et al.*, 2012).

Es de vital importancia incluir en los estudios epidemiológicos tanto a animales sintomáticos como asintomáticos, ya que en áreas endémicas no todos los perros desarrollan la enfermedad (Baneth *et al.*, 2008), habiéndose demostrado que los perros asintomáticos portadores son una fuente de infección para los vectores (Maia y Campino, 2008). También hay que tener en cuenta la aptitud y el hábitat de los perros, ya que existe mayor riesgo de infección en animales que viven en zonas rurales (Muniesa *et al.*, 2016) y en los perros guardianes y de compañía en comparación con los de caza debido a que los primeros pasan más tiempo en el exterior y por lo tanto aumenta la exposición a la picadura de los flebotomos (Nieto *et al.*, 1992; Morales-Yuste *et al.*, 2012; Muniesa *et al.*, 2016).

Por último, otro factor que influye a la hora de determinar la prevalencia de la Lcan es la técnica de diagnóstico empleada. Un estudio reciente demostró que mediante el uso de la técnica PCR, considerada altamente sensible (Baneth *et al.*, 2008), se obtenían valores más altos de prevalencia en comparación con los proporcionados por las técnicas serológicas utilizadas habitualmente, independientemente de la presencia de sintomatología (Morales-Yuste *et al.*, 2012). Esto demuestra la importancia de combinar diferentes métodos de diagnóstico para evaluar la presencia de la enfermedad en lugar de emplear únicamente las técnicas serológicas (Dantas-Torres *et al.*, 2012).

Regiones no endémicas

En los últimos años se ha observado una expansión de la Lcan a zonas del norte de Europa, consideradas no endémicas, ascendiendo el número de casos diagnosticados a 700 (Antoniou *et al.*, 2013). Normalmente la presencia de casos en estas regiones está asociada con el calentamiento global, ya que favorece la

INTRODUCCIÓN

transmisión de la enfermedad al ser las temperaturas adecuadas para el desarrollo de los vectores (Maia y Cardoso, 2015). Sin embargo, la principal causa parece ser la importación de animales en adopción procedentes de refugios (sobre todo de los países del sur de Europa) o el aumento de viajes de perros de zonas no endémicas a zonas endémicas junto con sus propietarios en periodos vacacionales (Baneth *et al.*, 2008; Maia y Cardoso, 2015). Así, en áreas consideradas libres de leishmaniosis como Holanda, Alemania y Reino Unido, se han detectado multitud de casos de Lcan en animales que procedían o habían viajado a países del sur de Europa (Teske *et al.*, 2002; Shaw *et al.*, 2009; Menn *et al.*, 2010).

1.5.2. Factores que influyen en el desarrollo de la enfermedad

Tanto la respuesta inmune generada como la base genética propia de cada individuo son claves para controlar o padecer la infección. Una adecuada respuesta inmune celular regulada por citoquinas permitirá al hospedador controlar la enfermedad (Hosein *et al.*, 2017), mientras que una exacerbada respuesta humoral estará asociada con la diseminación del parásito por todo el organismo y la severidad de los signos clínicos (Saridomichelakis, 2009).

Los animales resistentes pueden ser portadores de los parásitos toda su vida y no mostrar sintomatología (Baneth *et al.*, 2008; Saridomichelakis, 2009). Esta característica está asociada con una adecuada respuesta inmune de tipo celular moderada por la producción de citoquinas de tipo Th1 tales como IL-2, TNF- α e IFN- γ , capaces de estimular la capacidad leishmanicida de los macrófagos mediante el aumento de la producción de óxido nítrico (Pinelli *et al.*, 1995; Pinelli

et al., 2000; Alvar *et al.*, 2004), junto con la aparición de niveles bajos de anticuerpos específicos.

En cuanto a la base genética, se ha demostrado que ciertas razas propias de zonas endémicas a pesar de estar expuestas al parásito al mismo nivel que otras, son capaces de desarrollar una respuesta inmune protectora y mostrar raramente enfermedad clínica (Baneth *et al.*, 2008; Saridomichelakis, 2009). Tal es el caso del podenco ibicenco, raza autóctona de las Islas Baleares (Solano-Gallego *et al.*, 2000).

Además, es importante tener en cuenta que un cambio en el estado de salud de los animales resistentes debido a la aparición de enfermedades concomitantes o por la administración de medicamentos inmunosupresores podría reactivar las infecciones latentes y conducir a la aparición de enfermedad clínica (Baneth *et al.*, 2008; Saridomichelakis, 2009).

Por el contrario, en los animales predispuestos a padecer la enfermedad o susceptibles, la aparición de signos clínicos tiene lugar tras un periodo de incubación de 2 a 4 meses (Fisa *et al.*, 1999; Moreno y Alvar, 2002; Baneth *et al.*, 2008). La respuesta inmune de estos animales se caracteriza por una escasa o nula inmunidad celular (Alvar *et al.*, 2004), junto con la disminución de niveles de citoquinas tipo Th1 y el aumento de las de tipo Th2, como IL-10, TGF- β e IL-4 (Pinelli *et al.*, 1994; Dantas-Torres *et al.*, 2012). Además, se produce una marcada respuesta humoral no protectora (Villanueva-Saz *et al.*, 2013; Hosein *et al.*, 2017), con una elevada producción de inmunoglobulinas (Ig) entre las que predominan las IgG, apareciendo en menor concentración IgM, IgE e IgA (Saridomichelakis, 2009). La presencia de altos niveles de anticuerpos además

INTRODUCCIÓN

genera reacciones de hipersensibilidad de tipo II, III y IV que conllevan la aparición de diversas lesiones orgánicas (Villanueva-Saz *et al.*, 2013).

Al igual que ocurre con los animales resistentes, existen ciertas razas que muestran una clara predisposición al desarrollo de la enfermedad clínica, tales como doberman, pastor alemán, bóxer o rottweiler (Abranches *et al.*, 1991; Miranda *et al.*, 2008).

Así mismo, también se ha comprobado que la presencia de alelos específicos de los genes MHC II y Slc11a1 (anteriormente conocido como NRAMP1), están asociados a un mayor riesgo de padecer la enfermedad (Altet *et al.*, 2002; Quinnell *et al.*, 2003; Sánchez-Robert *et al.*, 2008).

Por último, la susceptibilidad también puede estar asociada a otros factores como estado nutricional, grado de parasitismo y virulencia de la cepa del parásito (Baneth *et al.*, 2008).

1.5.3. Diagnóstico de la leishmaniosis canina

Como se explicó anteriormente, la leishmaniosis canina y la humana están estrechamente relacionadas, ya que el perro es el principal reservorio de *L. infantum*. Por lo tanto, el diagnóstico precoz de la enfermedad en el perro es de vital importancia como estrategia de control de la LVZ, sobre todo en aquellos animales que no muestran sintomatología. Esto es debido a que los animales asintomáticos son una fuente de infección para los flebotomos vectores, aunque en menor medida que los perros que manifiestan enfermedad clínica (Baneth *et al.*, 2008; Maia y Campino, 2008).

El diagnóstico de la leishmaniosis es complejo y requiere la combinación de datos clínicos y biopatológicos, junto con los resultados de varios tipos de análisis laboratoriales: inmunológicos (para detectar anticuerpos anti-*Leishmania*) y parasitológicos (para detectar al propio parásito o bien su ADN). La información obtenida de cada uno de estos análisis debe interpretarse de manera conjunta para realizar un correcto diagnóstico de cada caso (Solano-Gallego y Villanueva-Saz, 2013).

A continuación se definen los diferentes signos clínicos y hallazgos biopatológicos que se pueden manifestar en la Lcan, así como los distintos tipos de métodos tanto inmunológicos como parasitológicos utilizados habitualmente para su diagnóstico.

1.5.3.1. Signos clínicos y hallazgos biopatológicos

La presencia de signos clínicos en los perros con leishmaniosis depende del tipo de respuesta inmune generada por cada animal (Ciaramella y Corona, 2003; Baneth, 2006; Romero-Peñuela y Sánchez-Valencia, 2007). Como se comentó en el apartado 1.5.2, los perros naturalmente resistentes a la infección con una moderada respuesta humoral y adecuada respuesta inmune de tipo celular pueden ser portadores de los parásitos toda su vida y no mostrar sintomatología (formas latentes asintomáticas) (Romero-Peñuela y Sánchez-Valencia, 2007). Por el contrario, los animales predispuestos a desarrollar la infección (formas patentes o sintomáticas agudas, subagudas o crónicas regresivas) presentan una marcada respuesta inmune de tipo humoral junto con una escasa capacidad de linfoproliferación (Pinelli *et al.*, 1994).

INTRODUCCIÓN

Las manifestaciones clínicas de la Lcan en animales susceptibles dependen de la fase en la que se encuentre la enfermedad (Nieto *et al.*, 1999; Pinelli *et al.*, 1994). En las fases tempranas pueden observarse únicamente signos clínicos generales, como pérdida de peso, astenia y apatía (Alvar *et al.*, 2004).

A medida que la enfermedad progresa y se hace patente, puede manifestarse una gran variedad de signos clínicos además de los generales presentes al inicio. Uno de los más comunes es el aumento de tamaño y consistencia de los ganglios linfáticos o linfadenomegalia (Ciaramella y Corona 2003; Alvar *et al.*, 2004). Por otra parte, se ha demostrado que el 90% de los perros con leishmaniosis patente pueden desarrollar alteraciones cutáneas (Ciaramella *et al.*, 1997; Baneth, 2006). Estas lesiones, raramente pruríticas (Slappendel, 1988), normalmente aparecen en la cabeza para acabar extendiéndose por todo el cuerpo del animal (Baneth, 2006). Entre las más importantes (Figura 7) destacan: alopecia, dermatitis exfoliativa o descamativa, úlceras, onicogriposis e hiperqueratosis (Gómez-Nieto, 1990).



Figura 7: Ejemplos de sintomatología cutánea que pueden manifestar los perros con leishmaniosis. A: úlcera en carpo y onicogriposis; B: dermatosis generalizada, descamativa y pustular con alopecia; C: hiperqueratosis nasal. (Imágenes cedidas por el Grupo LeishmanCeres).

Además, un porcentaje importante de animales desarrolla alteraciones oculares, siendo las más comunes la queratoconjuntivitis y la uveítis (Ciaramella y Corona, 2003). Por último, los perros también pueden presentar hemorragia nasal o epistaxis en esta fase de la enfermedad (Gómez-Nieto, 1990).

Si la Lcan no es diagnosticada y tratada a tiempo, los animales pueden manifestar un marcado deterioro del estado general, emaciación y finalmente caquexia (fase terminal), junto con daños en órganos internos tales como hígado, bazo o riñón, lo que conduce finalmente a la muerte del animal (Romero-Peñuela y Sánchez-Valencia, 2007; Veras *et al.*, 2014).

Debido a que existen numerosas enfermedades que pueden cursar con sintomatología similar a la producida por la Lcan, es necesario realizar un diagnóstico diferencial con otras patologías, tales como hepatozoonosis, babesiosis, ehrlichiosis, sarna sarcóptica y demodécica y varios tipos de alergias (Ciaramella y Corona, 2003), aunque es posible que debido al deterioro del sistema inmune del animal aparezcan estas enfermedades de forma concomitante (Baneth, 2006; Morgado *et al.*, 2016).

En cuanto a los hallazgos biopatológicos más frecuentes, destaca la disproteinemia, con el aumento de las proteínas totales por hiperglobulinemia (especialmente las γ -globulinas debido a la elevada respuesta inmune humoral producida), e hipoalbuminemia junto con descenso del ratio albúmina/globulina (Solano-Gallego *et al.*, 2011; Fernández-Cotrina *et al.*, 2013).

En cuanto a las alteraciones detectadas en los parámetros hematológicos, las observadas con más frecuencia son anemia, trombocitopenia y leucopenia (Baneth, 2006; Veras *et al.*, 2014; Fernández-Cotrina *et al.*, 2013). Por

INTRODUCCIÓN

último y debido al posible daño de los órganos internos, es necesario el estudio de parámetros hepáticos y renales, puesto que el aumento de enzimas hepáticas, urea y creatinina así como la presencia de proteinuria podrían ser indicativas de la leishmaniosis (Fernández-Cotrina, 2016).

Como ya se mencionó al principio de la sección, un gran número de animales pueden ser resistentes a la infección y no mostrar sintomatología. Para confirmar estos casos es necesario realizar tests de diagnóstico, tanto inmunológicos como parasitológicos.

1.5.3.2. Diagnóstico inmunológico

Todos los perros con leishmaniosis, independientemente de la presencia de signos clínicos, van a mostrar una respuesta inmune humoral específica contra el parásito (De Andrade y Melo, 2014). Los métodos inmunológicos permiten detectar los anticuerpos anti-*Leishmania* circulantes en el suero. La facilidad con la que se realizan estos métodos los convierten en herramientas esenciales para el diagnóstico de la enfermedad (Romero-Peñuela y Sánchez-Valencia, 2007; Santarém *et al.*, 2010), resultando de gran utilidad para establecer la seroprevalencia en estudios epidemiológicos (Vercammen *et al.*, 2002; Iniesta *et al.*, 2002).

Aunque el nivel de anticuerpos producido en las fases inicial o final de la enfermedad o en infecciones asintomáticas es bajo, los animales desarrollan un incremento de anticuerpos específicos a lo largo del tiempo (Oliva *et al.*, 2006).

En la actualidad, los métodos inmunológicos más utilizados para el diagnóstico de la Lcan son el ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), la inmunofluorescencia indirecta (IFI) y los tests inmunocromatográficos.

La técnica ELISA permite la detección de inmunoglobulinas séricas producidas específicamente frente a distintos antígenos de *Leishmania*. Este método resulta muy útil a la hora de analizar un gran número de muestras debido a su sencillez (Maia y Campino, 2008). Se ha comprobado que este tipo de análisis muestra una gran sensibilidad tanto en animales sintomáticos como en asintomáticos (Mettler *et al.*, 2005), aunque la especificidad depende del antígeno utilizado (Singh *et al.*, 2005). Como ejemplo, se ha demostrado que mediante el uso del antígeno total soluble (SLA) obtenido a partir de promastigotes de *Leishmania* se obtienen sensibilidades del 80 al 100% y especificidades del 85 al 95% (Santarém *et al.*, 2010). Otro antígeno recombinante, la proteína quimera o PQ, sintetizada artificialmente a partir de genes que codifican diversos determinantes antigénicos de distintos antígenos de *L. infantum*, supone una excelente herramienta para el diagnóstico inmunológico de la Lcan al proporcionar valores elevados de sensibilidad y especificidad (Soto *et al.*, 1998; Nieto *et al.*, 1999).

La técnica IFI se considera el método de referencia para el diagnóstico inmunológico de la Lcan (Maia y Campino, 2008). Permite realizar una titulación del nivel de anticuerpos utilizando como antígeno parásitos completos inmovilizados en portaobjetos. El método resulta muy útil en estudios epidemiológicos y en la práctica clínica debido a su alta sensibilidad y especificidad (Fernández-Cotrina, 2016).

Las desventajas de esta técnica recaen sobre todo en la interpretación de los resultados, ya que es un método para el que se necesita mucha experiencia (Maia y Campino, 2008) y porque no se ha establecido la dilución a la que un suero se considera positivo (Romero-Peñuela y Sánchez-Valencia, 2007).

INTRODUCCIÓN

Finalmente, en los últimos años se han desarrollado kits de diagnóstico rápido basados en técnicas inmunocromatográficas, siendo el más estudiado el antígeno recombinante rK39. Sin embargo, mientras que varios autores elogian la rapidez al proporcionar los resultados (aproximadamente 15 minutos) y su facilidad de ejecución como ventaja en el campo (Mohebbali *et al.*, 2004; Otranto *et al.*, 2005), otros indican que la gran desventaja de este método es que su sensibilidad es menor a la de las técnicas inmunológicas utilizadas convencionalmente (Mettler *et al.*, 2005).

A pesar de la facilidad de ejecución de las técnicas ELISA, IFI y kits rápidos, estos análisis presentan ciertas limitaciones, como las reacciones cruzadas que pueden producirse con parásitos del género *Trypanosoma*, especialmente *T. cruzi* (Solano-Gallego y Villanueva-Saz, 2013), o la disminución de la sensibilidad cuando existen títulos bajos de anticuerpos. Además, en animales resistentes o que se encuentran en la fase inicial de la enfermedad, podrían obtenerse falsos negativos con estos análisis (De Andrade y Melo, 2014; Veras *et al.*, 2014). Por ello, para asegurar la fiabilidad del diagnóstico sería necesario combinar los resultados inmunológicos con los clínicos y parasitológicos, tal y como se ha indicado en el inicio de la sección 1.5.3.

1.5.3.3. Diagnóstico parasitológico

La realización de estos métodos permite detectar la presencia del parásito, ya sea de manera directa (observación del mismo mediante microscopía o cultivo), o indirecta (detección del ADN parasitario).

Métodos parasitológicos directos

Los parásitos del género *Leishmania* en su forma amastigote (ver apartado 1.3) pueden ser observados mediante microscopía óptica en frotis realizados a partir de aspirados de órganos como bazo, ganglios linfáticos o médula ósea, así como de lesiones dérmicas nodulares (De Andrade y Melo, 2014). Esta técnica se emplea para la confirmación de la infección por *Leishmania* (Maia y Campino, 2008; Solano-Gallego *et al.*, 2009) debido a su elevada especificidad (Veras *et al.*, 2014). Como desventaja, la identificación de los amastigotes requiere experiencia, por lo que el desarrollo de la técnica depende de la habilidad del observador (Tavares *et al.*, 2003).

Por otra parte, el cultivo de parásitos a partir de fragmentos o aspirados de distintos tejidos presenta una alta especificidad, permitiendo el aislamiento y caracterización de los parásitos (Veras *et al.*, 2014). Sin embargo, la gran desventaja de este método es que para obtener un diagnóstico definitivo son necesarios varios días de cultivo (Alvar *et al.*, 2004), no resultando adecuado en estudios epidemiológicos (Solano-Gallego *et al.*, 2001; Sundar y Rai, 2002; Barrouin-Melo *et al.*, 2004). Otros posibles inconvenientes que presenta esta técnica son la contaminación del medio o la pobre adaptación de algunas cepas al medio *in vitro* (Fernández-Cotrina, 2016).

Ambos métodos directos presentan una baja sensibilidad, aunque ésta varía en función del tipo de muestra empleada, siendo el bazo la más sensible (De Andrade y Melo, 2014). Como gran inconveniente, la obtención de muestras de bazo, ganglio linfático y médula ósea conlleva un procedimiento invasivo y traumático para los animales. Además, estos métodos no resultan de utilidad en

INTRODUCCIÓN

los perros asintomáticos, cuya carga parasitaria es baja, produciéndose falsos negativos (Alvar *et al.*, 2004; Barrouin-Melo *et al.*, 2004; Gomes *et al.*, 2008).

Métodos parasitológicos indirectos

La utilización de estos métodos permite detectar el material genético del parásito incluso en los animales con baja carga parasitaria (Tsokana *et al.*, 2014), algo que no es posible con los métodos directos.

Dentro de este grupo, la técnica más importante es la reacción en cadena de la polimerasa o PCR. Este método, diseñado por Kary B. Mullis en 1983 (Mullis, 1990), permite la amplificación de una secuencia de ADN problema (ADN diana) utilizando oligonucleótidos específicos (cebadores) y la enzima ADN polimerasa (Life Technologies, 2012).

Numerosos estudios han demostrado que, en comparación con el resto de métodos parasitológicos, la PCR es más sensible y específica para el diagnóstico de la Lcan (Gramiccia y Gradoni, 2005), siendo muy útil para el análisis de muestras con baja carga parasitaria (Reithinger y Dujardin, 2007), para confirmar el diagnóstico de los animales que muestren un bajo título de anticuerpos (Tavares *et al.*, 2003) y para detectar ADN del parásito en animales recién infectados, incluso antes de la seroconversión (Martínez *et al.*, 2011). Otras ventajas de la técnica PCR son la capacidad de amplificar el ADN diana a partir del material genético extraído de una gran variedad de muestras, utilizando pequeñas cantidades de las mismas (De Andrade y Melo, 2014). Aunque la PCR es muy sensible y específica, es importante valorar la información proporcionada por esta técnica junto con los datos obtenidos en la evaluación clínica y serológica de los animales (Solano-Gallego *et al.*, 2011).

No existe ningún protocolo universal de PCR establecido para el diagnóstico de la Lcan. Los métodos utilizados a lo largo de los años han variado respecto a diferentes parámetros, lo que conlleva un aumento o disminución de la sensibilidad de la técnica (Tsokana *et al.*, 2014). Por lo tanto, la eficacia del método PCR depende de diferentes factores, entre los que podemos destacar el tipo de PCR (convencional o a tiempo real) y el material biológico analizado (Alvar *et al.*, 2004; Baneth y Aroch, 2008).

Tipos de PCR

PCR convencional (cPCR)

El desarrollo de la técnica cPCR en 1983 supuso un importante avance en el campo de la biología molecular (Paiva-Cavalcanti *et al.*, 2010). Esta técnica permite detectar y amplificar un ADN o secuencia diana a partir de unos cebadores específicos (Veras *et al.*, 2014) y visualizar los productos amplificados habitualmente mediante una electroforesis en gel (Life Technologies, 2012). Este método puede ser cualitativo o semi-cuantitativo, pero asume la detección de falsos negativos (Veras *et al.*, 2014). Esta técnica ha sido ampliamente utilizada en el diagnóstico de la Lcan, aunque actualmente se está viendo reemplazada por la PCR a tiempo real (Francino *et al.*, 2006).

PCR a Tiempo Real o PCR cuantitativa (qPCR)

Actualmente esta técnica se considera el método de referencia para el diagnóstico molecular de la Lcan, ya que se ha comprobado que la qPCR es más sensible que la cPCR (Francino *et al.*, 2006). En la qPCR la detección y cuantificación del ADN diana se producen de manera simultánea (Tsokana *et al.*, 2014). Mediante detección por fluorescencia se puede medir durante la

INTRODUCCIÓN

amplificación la cantidad de ADN sintetizado en cada momento (Costa, 2004), ya que se genera una señal de fluorescencia que es proporcional a la cantidad de ADN formado (Paiva-Cavalcanti *et al.*, 2010). Además, el empleo de rectas patrón, construidas a partir de cantidades conocidas del ADN diana, permite determinar de manera absoluta la cantidad inicial de la diana en las muestras analizadas (Life Technologies, 2012). La qPCR también permite realizar cuantificaciones relativas sin necesidad de utilizar estándares, comparando los niveles de expresión del ADN diana con uno o más genes endógenos (Manna *et al.*, 2009).

La posibilidad de cuantificar ADN ha permitido que la técnica qPCR sea la elegida para monitorizar la carga parasitaria de los animales tras el tratamiento (Pennisi *et al.*, 2005; Francino *et al.*, 2006; Martínez *et al.*, 2011). Además, la qPCR es altamente sensible cuando existen cargas parasitarias bajas (Mary *et al.*, 2004; Vitale *et al.*, 2004).

Entre las ventajas de la qPCR destacan: la rapidez en la obtención de resultados, ya que no es necesaria la electroforesis (Rolão *et al.*, 2004), la reducción del riesgo de contaminación de las muestras (Maia y Campino, 2008) y su alta especificidad y reproducibilidad (Paiva-Cavalcanti *et al.*, 2010).

A pesar de todo, la sensibilidad o especificidad del método qPCR pueden verse afectadas por el tipo de reactivos utilizados para detectar la fluorescencia o el tipo de ADN diana seleccionado para su amplificación (región conservada o variable, número de copias en el que se encuentra, etc.) (Reithinger y Dujardin, 2007).

En cuanto a los tipos de reactivos, los más comúnmente utilizados son los agentes intercalantes SYBR Green y las sondas de hibridación Taqman (Paiva-Cavalcanti *et al.*, 2010; Tsokana *et al.*, 2014). SYBR Green es un sistema de detección inespecífico aplicable a todos los ADN diana potenciales (Maia y Campino, 2008), donde un fluorocromo se une a las moléculas de ADN producidas durante la amplificación de la secuencia diana, generándose la fluorescencia. Este método tiene la desventaja de no poder discriminar directamente la amplificación de fragmentos inespecíficos de ADN (Veras *et al.*, 2014).

Por el contrario, las sondas TaqMan consisten en secuencias de ADN de entre 13 y 30 nucleótidos complementarios al ADN diana combinadas con un fluorocromo y un inhibidor de fluorescencia, la cual se emite cuando se degrada la sonda durante la amplificación de la secuencia diana (Paiva-Cavalcanti *et al.*, 2010; Veras *et al.*, 2014). El uso de estos reactivos incrementa tanto la sensibilidad como la especificidad del método, utilizado por primera vez en 2004 para realizar una cuantificación de parásitos del género *Leishmania* (Rolão *et al.*, 2004; Francino *et al.*, 2006).

En relación a los ADN diana, se ha descrito la utilización de distintos tipos en el diagnóstico molecular de la Lcan. Los más frecuentes son el gen de la subunidad pequeña del ARN ribosómico (SSU-ARNr), presente en un número de 40-200 copias/parásito y el ADN del minicírculo del kinetoplasto (ADNk) (Miró *et al.*, 2008). Este último es una de las secuencias diana más utilizadas en el diagnóstico de la Lcan, ya que aumenta de manera significativa la sensibilidad del método qPCR (Lachaud *et al.*, 2002), debido a la existencia de una región de aproximadamente 200 pares de bases, conservada entre las diferentes especies

INTRODUCCIÓN

de *Leishmania* del Viejo y Nuevo Mundo (Reale *et al.*, 1999) y a que el minicírculo está presente en un número de 10.000–20.000 copias/parásito (Rodgers, 1990).

Material biológico analizado

La PCR permite analizar el ADN extraído a partir de una gran variedad de muestras biológicas. La sensibilidad de la técnica varía dependiendo del tejido utilizado (Veras *et al.*, 2014), por lo que no existe un acuerdo sobre cuál es la muestra de elección para realizar el diagnóstico molecular de la Lcan. A pesar de ello, varios autores coinciden en que la muestra ideal debe ser de obtención no invasiva, fácil y rápida, además de proporcionar una alta sensibilidad (De Andrade y Melo, 2014).

Dependiendo de cómo se hayan obtenido, las muestras se pueden clasificar en invasivas y no invasivas.

Las muestras invasivas son aquellas cuya obtención resulta traumática para el animal, requiriendo a veces del uso de anestesia y causando rechazo por parte de los propietarios (De Andrade y Melo, 2014). Además, si no se analizan en el momento, por ejemplo durante un estudio de campo, es necesario almacenarlas a temperaturas de entre 4°C y -20°C, lo que resulta otra desventaja para su utilización (Reithinger y Dujardín, 2007). Las muestras invasivas más utilizadas para el diagnóstico molecular de la Lcan son: bazo, piel, ganglio linfático, médula ósea, y sangre (Maia y Campino, 2008; Tsokana *et al.*, 2014; Veras *et al.*, 2014).

Los parásitos del género *Leishmania* muestran un tropismo natural hacia los órganos linfoides. Varios estudios han demostrado la validez de estos tejidos como muestra de elección para el diagnóstico molecular de la Lcan (De Andrade y Melo, 2014). El análisis de los aspirados de bazo proporciona una elevada

sensibilidad, tanto en perros sintomáticos como en asintomáticos (Reis *et al.*, 2006; Reis *et al.*, 2013). Sin embargo, la toma de esta muestra *in vivo* conlleva un riesgo de hemorragia interna (Léveillé *et al.*, 1993), aunque esto podría minimizarse realizando la aspiración con la ayuda de un ecógrafo (Veras *et al.*, 2014).

Las biopsias de ganglio linfático proporcionan resultados muy sensibles, como se ha demostrado previamente, siendo muy útil en perros sintomáticos (Maia *et al.*, 2009; Ferreira *et al.*, 2013). Sin embargo, si los perros no presentan linfadenomegalia (Veras *et al.*, 2014), se recomienda analizar aspirados de médula ósea, los cuales también han demostrado ser una muestra adecuada en cuanto a sensibilidad se refiere (Fisa *et al.*, 2001; Maia *et al.*, 2009; Quaresma *et al.*, 2009).

La piel es el órgano reservorio de parásitos para los flebotomos. Varios estudios han demostrado que las muestras de piel proporcionan resultados muy sensibles y específicos (Solano-Gallego *et al.*, 2001; Saridomichelakis y Koutinas; 2014), independientemente de la presencia de lesiones (Carvalho Ferreira *et al.*, 2014), proponiéndose incluso el análisis molecular de la piel de la oreja como el mejor método de diagnóstico de Lcan (Xavier *et al.*, 2006).

Por último, el empleo de la sangre, considerada la muestra menos invasiva dentro de este grupo, ha mostrado resultados contradictorios para el diagnóstico molecular de la Lcan (De Andrade y Melo, 2014). Varios estudios proponen a la sangre como muestra de elección, debido a la facilidad con la que se obtiene (Maia *et al.*, 2009; Manna *et al.*, 2004). Por el contrario, otros autores han alcanzado la sensibilidad más baja analizando sangre en comparación con otras

INTRODUCCIÓN

muestras (Ferreira *et al.*, 2008; Leite *et al.*, 2010). Esto probablemente se deba, entre otros factores, a que la hemoglobina de la sangre podría actuar como inhibidor de la PCR (Veras *et al.*, 2014).

Al contrario que con las anteriores, la recogida de las muestras no invasivas no produce ningún daño al animal, siendo su obtención fácil y rápida. La utilización de hisopos de algodón como soporte para la toma de muestras está cobrando cada vez más importancia para el diagnóstico molecular de la Lcan (De Andrade y Melo, 2014).

Numerosos autores han demostrado que el hisopo conjuntival es adecuado para el diagnóstico molecular de la leishmaniosis visceral canina (Strauss-Ayali *et al.*, 2004; Leite *et al.*, 2010; Lombardo *et al.*, 2012; De Almeida Ferreira *et al.*, 2012), aunque otros autores obtuvieron una baja sensibilidad con esta muestra (Galletti *et al.*, 2011).

El estudio de otro tipo de muestras tomadas con hisopos ha proporcionado resultados contradictorios. El uso de hisopos nasales, orales y auriculares (obtenidos frotando con un hisopo la superficie interna de la oreja previamente desinfectada) ha proporcionado una sensibilidad media (Lombardo *et al.*, 2012; Ferreira *et al.*, 2013). Un estudio experimental publicado recientemente mostró el potencial de los hisopos de la mucosa de la vulva (Hernández *et al.*, 2015), aunque la sensibilidad fue menor que la proporcionada por distintas muestras invasivas.

Por último, el análisis molecular de muestras de orina de perros con leishmaniosis mostró una baja sensibilidad (Hernández *et al.*, 2015). Según otros autores podría

obtenerse una sensibilidad mayor en animales que presentan enfermedad renal (Solano-Gallego *et al.*, 2007).

Cabe destacar la escasez de publicaciones enfocadas al estudio de muestras no invasivas para el diagnóstico molecular de la Lcan, por lo que es necesario fomentar su utilización debido a las grandes ventajas que presentan este tipo de muestras.

1.6. Funciones de la piel y su papel en la leishmaniosis

La piel, órgano más grande de los mamíferos, es el límite externo y la zona de contacto del organismo con el ambiente (Bragulla *et al.*, 2005). La piel realiza varias funciones vitales destinadas a mantener el estado homeostático del cuerpo asegurando el funcionamiento de los órganos internos, ya que actúa como depósito de agua, electrolitos y macromoléculas (Scott *et al.*, 2001a). Además de recibir estímulos de presión, dolor, calor y frío, la piel tiene acción antimicrobiana y antifúngica gracias a la presencia de lípidos, ácidos, enzimas hidrolíticas y péptidos antimicrobianos (Proksch *et al.*, 2008).

La piel constituye uno de los principales sistemas de defensa del individuo, ya que actúa como barrera física frente a agentes externos químicos (alérgenos, sustancias irritantes), físicos (daños mecánicos, radiación UV) y medioambientales (Girolomoni *et al.*, 2006; Proksch *et al.*, 2008). Esta función la desempeña gracias a estructuras queratinizadas, tales como el estrato córneo (capa más externa de la epidermis), el pelo y las uñas (Scott *et al.*, 2001a, Girolomoni *et al.*, 2006). Además de suponer una barrera física frente a agentes externos, la piel actúa como sistema de defensa inmunológico, gracias a la acción

INTRODUCCIÓN

de distintos tipos celulares (Scott *et al.*, 2001b; Girolomoni *et al.*, 2006). Por último, la piel tiene también la capacidad de eliminar sustancias exógenas fuera del organismo (Scott *et al.*, 2001a).

1.6.1. Barrera física epidérmica

La epidermis es la parte más externa de la piel y está formada por cuatro capas o estratos (Figura 8). El estrato basal, capa interna de la epidermis, se compone de una única fila de queratinocitos en forma de cubo (Bragulla *et al.*, 2005). Esta capa es la responsable de la constante renovación de las células epidérmicas. Para ello los queratinocitos deben migrar hacia el exterior de la piel atravesando los distintos estratos (Nestlé *et al.*, 2009). A medida que este proceso tiene lugar, los queratinocitos comienzan a sintetizar grandes cantidades de queratina y a diferenciarse. Por ello, los queratinocitos presentes en la capa más externa de la piel (corneocitos), carecerán de núcleo y orgánulos, siendo células planas y completamente queratinizadas (Nestlé *et al.*, 2009; Bragulla *et al.*, 2005). La capa más externa o estrato córneo (Figura 8) es la responsable de la barrera que impide la deshidratación del individuo y la entrada de agentes externos (Proskch *et al.*, 2008; Pasparakis *et al.*, 2014).

El tiempo que tardan los queratinocitos en pasar del estrato basal al córneo se denomina tiempo de renovación o recambio epidérmico. En el perro este proceso comprende aproximadamente 22 días (Scott *et al.*, 2001c), si bien desórdenes inflamatorios pueden acelerar el tiempo de recambio, apreciándose descamación en la superficie de la piel (Bragulla *et al.*, 2005).

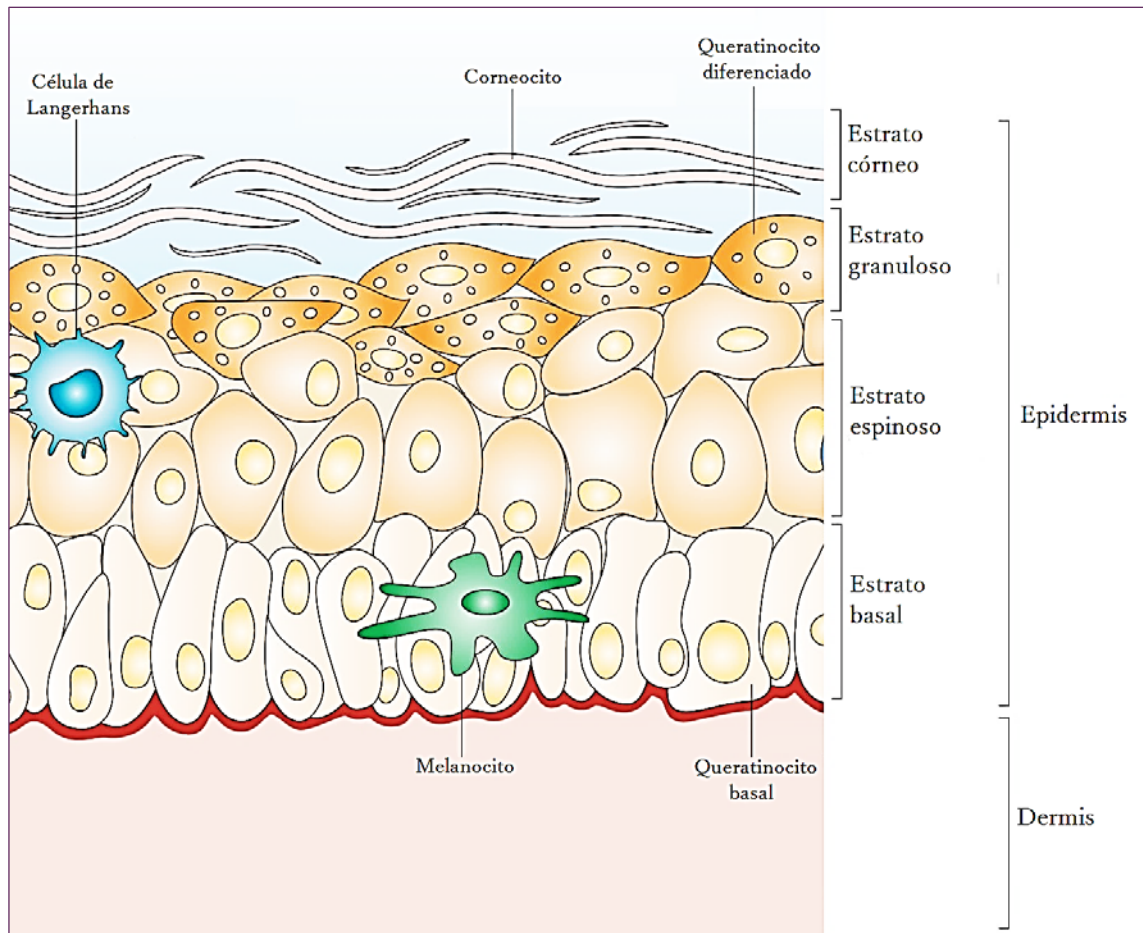


Figura 8: Estructura de la piel. Imagen adaptada de Nestlé *et al.*, 2009

1.6.2. Sistema inmune de la piel

Además de actuar como barrera física, la epidermis desempeña un papel importante en la respuesta inmune frente a los factores externos.

El sistema inmune de la piel consta de dos componentes: el celular y el humoral. Entre las células destacan queratinocitos, células de Langerhans, histiocitos, linfocitos, macrófagos, mastocitos, células endoteliales y granulocitos. El componente humoral lo constituyen inmunoglobulinas, factores del complemento, citoquinas y péptidos antimicrobianos (Scott *et al.*, 2001b).

Como norma general, para que se produzca una respuesta inmune es necesario el procesamiento de antígenos para su presentación a los linfocitos. Clásicamente

INTRODUCCIÓN

esto ocurre a través de los macrófagos, pero ya que estas células no existen a nivel de epidermis, esta función es realizada por las células de Langerhans. Incluso antes de que se activen estas últimas, los estímulos externos son recogidos por los queratinocitos (Scott *et al.*, 2001b).

La piel supone la primera línea de defensa inmunológica frente a las infecciones (Pasparakis *et al.*, 2014). En las enfermedades transmitidas por vectores, los patógenos son inoculados directamente en la epidermis, donde interaccionan con todas las células presentes en la misma (Bernard *et al.*, 2015). Estas células, queratinocitos mayormente, detectan la presencia de los patógenos a través de receptores de membrana, conduciendo a la secreción de citoquinas inflamatorias, quimiocinas y péptidos antimicrobianos (Nestlé *et al.*, 2009).

La saliva del vector es un parámetro crítico para la transmisión del patógeno, ya que contiene moléculas anti-hemostáticas, anti-inflamatorias, y factores inmunomoduladores que facilitan la ingesta de sangre del hospedador por parte del vector (Titus *et al.*, 2006; Bernard *et al.*, 2015).

El sistema inmune de la piel es la primera línea de defensa contra la leishmaniosis. Tras la inoculación de los promastigotes por parte del mosquito vector, factores del complemento, células de Langerhans, neutrófilos, fibroblastos y queratinocitos activan la inmunidad innata de la piel (Papadogiannakis y Koutinas, 2015). Además, los queratinocitos regulan la expresión de moléculas y receptores que favorecen la activación y migración de leucocitos al sitio de infección. La capacidad fagocítica y presentadora de antígenos de los queratinocitos también estimula el sistema inmune de la piel (Papadogiannakis y Koutinas, 2015).

Como se ha comentado anteriormente los queratinocitos no sólo actúan como barrera mecánica frente a sustancias externas, sino que se consideran potentes células inmunitarias capaces de inducir una respuesta inmune tanto innata como adaptativa (Scott *et al.*, 2001b; Nestlé *et al.*, 2009).

Los queratinocitos pueden expresar proteínas que forman parte del sistema inmune innato, los receptores de membrana de tipo Toll (TLRs). Gracias a ellos los queratinocitos pueden reconocer numerosos patógenos a través de sus patrones moleculares asociados (PAMPs), moléculas muy conservadas presentes en los microorganismos, como por ejemplo lipopolisacáridos, peptidoglicanos, flagelina y varios ácidos nucleicos (Nestlé *et al.*, 2009). Es de destacar que los queratinocitos son capaces de discriminar entre los microorganismos comensales de la piel y los patógenos, ya que obviamente no actúan contra la flora bacteriana presente en la epidermis (Pivarsci *et al.*, 2005).

El reconocimiento de los microorganismos patógenos por parte de los TLR presentes en los queratinocitos induce la producción de citoquinas mediadoras de la inflamación y quimiocinas, como como IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12, TGF- β y TNF- α (Castrillón-Rivera *et al.*, 2008). Estas proteínas atraen células dendríticas, linfocitos T y neutrófilos al sitio de infección. Los queratinocitos se consideran la principal fuente de citoquinas en la epidermis, regulando por lo tanto la respuesta inmune innata y adaptativa de la piel (Scott *et al.*, 2001b; Nestlé *et al.*, 2009).

Los queratinocitos producen además péptidos antimicrobianos, como beta-defensinas y catelicidinas, fundamentales para los mecanismos de defensa de la epidermis del hospedador (Pivarsci *et al.*, 2005; Nestlé *et al.*, 2009).

INTRODUCCIÓN

Por último, los queratinocitos se consideran células presentadoras de antígenos “no profesionales”, ya que se ha comprobado que pueden expresar moléculas del MHC II, requeridas por las células presentadoras de antígenos para modular la respuesta de los linfocitos T (Scott *et al.*, 2001b; Nestlé *et al.*, 2009).

Existen pocas referencias que relacionan la capacidad de los queratinocitos como células inmunológicas en la leishmaniosis. Sin embargo, mediante un modelo experimental en ratones C57BL/6 (naturalmente resistentes a *L. major*) se ha demostrado que los queratinocitos epidérmicos expresan ciertas citoquinas (IL-4 e IL-6) transcurridas 16 horas después de la infección. Estas citoquinas tienen un papel decisivo en la generación de la respuesta inmune protectora Th1, además de contribuir al desarrollo de reacciones inflamatorias (Ehrchen *et al.*, 2010).

En cuanto al papel de los TLRs en las leishmaniosis, se ha estudiado la expresión de varios de estos receptores en modelos experimentales de ratones infectados por *L. major* y en personas con lesiones cutáneas producidas por *L. braziliensis* (Tuon *et al.*, 2012). Por el contrario, aún no se conoce en profundidad la implicación de los TLRs en la Lcan, aunque en un estudio reciente se detectaron altos niveles de TLR-2 en lesiones cutáneas de perros con leishmaniosis en comparación con zonas de piel sana de animales no infectados (Esteve *et al.*, 2015).

1.6.3. Eliminación de sustancias exógenas a través de la piel

La epidermis tiene la capacidad de fagocitar material exógeno localizado en la dermis y expulsarlo a la superficie (Bayoumi y Marks, 1980). Este proceso se conoce como eliminación transepidermal o transepidérmica (Woo y Rasmussen, 1985). El material exógeno es englobado y “transportado” hacia la capa más

superficial de la epidermis junto con los queratinocitos para ser eliminado posteriormente mediante la exfoliación de la piel (Hantash *et al.*, 2006). Se cree que antes de la eliminación de las sustancias éstas deben ser reconocidas por receptores que mandarían una señal a la epidermis para que comience el proceso (Bayoumi y Marks, 1980). Sin embargo, el mecanismo por el que ocurre la eliminación transepidermal es desconocido (Espinel *et al.*, 2004), aunque se podría considerar como un proceso fisiológico de defensa contra alteraciones cutáneas (Karram *et al.*, 2012).

Se ha descrito la eliminación transepidermica de organismos patógenos en enfermedades como lepra, tuberculosis, blastomicosis, criptococosis, histoplasmosis y esquistosomosis (Espinel *et al.*, 2004).

Este fenómeno también ha sido descrito en leishmaniosis, tanto en la forma visceral como en la cutánea. En varias personas que presentaban conjuntamente LV y VIH se han encontrado amastigotes en queratinocitos de todas las capas epidérmicas (Espinel *et al.*, 2004; García-Río *et al.*, 2010) y en glándulas y conductos sudoríparos ecrinos (Espinel *et al.*, 2004).

En cuanto a la LC, en un estudio reciente se analizaron 212 biopsias de piel humana, obteniendo una incidencia de eliminación transepidermal del 28.3% (60 pacientes) y observando amastigotes de *L. major* (y en menor medida de *L. tropica*) en todas las capas epidérmicas y en el epitelio del folículo piloso (Karram *et al.*, 2012). Estos autores definen la eliminación transepidermal como un fenómeno que facilita la eliminación de parásitos a través de la piel, sugiriendo que existen dos formas: pasiva y activa. En la pasiva, el material endógeno ascendería a la superficie atrapado entre los queratinocitos gracias a la

INTRODUCCIÓN

diferenciación y movimiento de los mismos desde la capa basal epidérmica hasta la capa córnea. La observación de amastigotes intercalados entre los queratinocitos de todas las capas epidérmicas sustenta esta teoría. Por el contrario, en la eliminación transepidermal activa se produciría una hiperplasia celular inducida por el material exógeno, que sería posteriormente englobado por estas células y expulsado al exterior junto con ellas (Karram *et al.*, 2012).

1.6.4. Carga parasitaria de la piel en perros con leishmaniosis

La piel es el principal reservorio de parásitos para los flebotomos vectores de la leishmaniosis (De Almeida-Ferreira *et al.*, 2012). Un estudio reciente ha demostrado que los parásitos pueden permanecer al menos 6 meses después de una infección primaria en las zonas de la piel donde se han producido las picaduras de los flebotomos (Aslan *et al.*, 2016).

Varios autores han observado que la carga parasitaria presente en la piel de los perros con leishmaniosis es elevada, siendo la piel de la oreja la zona más parasitada (Travi *et al.*, 2001; Xavier *et al.*, 2006; Verçosa *et al.*, 2008; Courtenay *et al.*, 2014) y proponiendo esta zona como la muestra de elección para el diagnóstico molecular de la Lcan (Xavier *et al.*, 2006). Concretamente, en un estudio de Moura *et al.* en 2008 se indica que la punta de la oreja es la región anatómica que muestra el mayor grado de parasitismo.

Las lesiones cutáneas que desarrollan los animales seropositivos se han asociado con la capacidad de transmitir *L. infantum* a los flebotomos, debido a la presencia de gran cantidad de amastigotes observados mediante microscopía (Aslan *et al.*, 2016). Sin embargo, se ha comprobado que la piel aparentemente sana de los animales seropositivos asintomáticos también contiene amastigotes, aunque en

menor medida (Moura *et al.*, 2008; Saridomichelakis y Koutinas, 2014; Silva *et al.*, 2016). Estos hallazgos indican que los perros con leishmaniosis pueden transmitir el parásito a los vectores independientemente de la presencia de lesiones cutáneas, por lo que hay que destacar la importancia de los animales portadores asintomáticos en la epidemiología de la enfermedad (Michalsky *et al.*, 2007; Madeira *et al.*, 2009; Saridomichelakis y Koutinas, 2014).

A thick, dark purple vertical bar runs down the left side of the page. From the bottom of this bar, several thin, curved lines in shades of purple and grey extend upwards and to the right, creating an abstract, organic shape.

2. OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

Como ya se ha mencionado en el apartado de la introducción, un correcto diagnóstico de la Lcan es crucial como estrategia de control de la LVZ. Numerosos estudios han demostrado que la PCR es una de las técnicas más sensibles y específicas para el diagnóstico de la Lcan. A pesar de que la mayoría de las muestras utilizadas para este tipo de diagnóstico se obtienen de manera invasiva y cruenta, en la actualidad la utilización de muestras no invasivas está cobrando cada vez mayor importancia. Sin embargo, existen pocos estudios enfocados al análisis de este tipo de muestras.

También se han descrito anteriormente las distintas propiedades que presenta la piel, destacando la eliminación transepidérmica de parásitos del género *Leishmania* tanto en LV como en LC. Además, se ha demostrado ampliamente que los perros con leishmaniosis presentan elevadas cargas parasitarias en la piel.

Teniendo en cuenta ambas premisas, el propósito de esta tesis fue el estudio mediante análisis moleculares de muestras anejas a la piel obtenidas de forma no invasiva procedentes de distintas especies animales y su posible aplicación en el diagnóstico de los diferentes tipos de leishmaniosis.

Para realizar el trabajo se plantearon cuatro objetivos específicos orientados a la evaluación de las muestras de pelo, queratinocitos epidérmicos y cerumen:

1. Analizar mediante el método qPCR, tanto el pelo de diferentes zonas corporales como los queratinocitos epidérmicos procedentes de perros con leishmaniosis adquirida de forma natural, para comprobar si estas muestras contienen ADN del kinetoplasto de *Leishmania infantum*, y evaluar su utilización como herramienta de diagnóstico para la Lcan.

OBJETIVOS

2. Estudiar el pelo obtenido de diferentes especies de mamíferos silvestres mediante el método qPCR, para comprobar si es posible detectar ADNk de *L. infantum* en el pelo de estos animales. Evaluar, además, la estabilidad del material genético parasitario retenido en el pelo, y la posible utilidad de estos hallazgos para ser aplicados en estudios epidemiológicos y de búsqueda de nuevos reservorios.
3. Comprobar si en el modelo de leishmaniosis cutánea producida por *L. major* en ratón BALB/c es posible detectar ADNk parasitario en el pelo de dos zonas corporales delimitadas (el sitio de inoculación y una zona alejada del mismo), con el fin de determinar la cronología de la incorporación del ADNk de *L. major* al pelo de ambas zonas.
4. Analizar mediante el método qPCR el cerumen de perros con leishmaniosis adquirida de forma natural obtenido con hisopos de algodón, para comprobar si esta muestra contiene ADN del kinetoplasto de *L. infantum* y evaluar su utilización como herramienta de diagnóstico para la Lcan.

Los objetivos planteados fueron desarrollados y publicados en cuatro trabajos. A continuación se incluye el resumen de cada uno de ellos, así como su texto completo.

A thick, dark purple vertical bar is positioned on the left side of the page. From the bottom of this bar, several thin, curved lines in shades of purple and grey extend upwards and to the right, creating an abstract, organic shape.

3. MATERIALES, MÉTODOS Y RESULTADOS

3. MATERIALES, MÉTODOS Y RESULTADOS

3.1. Detection of *Leishmania infantum* kinetoplast minicircle DNA by Real Time PCR in hair of dogs with leishmaniosis. Vet. Parasitol. 192 (2013), 43-50.

Resumen

En estudios preliminares se ha descrito que el pelo tanto de humanos como de animales es capaz de acumular y excretar sustancias químicas y biológicas. Debido a ello, en este trabajo se planteó la hipótesis de que el pelo y los queratinocitos epidérmicos de perros con leishmaniosis visceral infectados naturalmente podrían albergar ADN del minicírculo del kinetoplasto de *Leishmania* (ADNk).

En este estudio se analizó una población de 28 perros por métodos inmunológicos (ELISA e IFI) que fue dividida en dos grupos, A (13 perros con leishmaniosis) y B (15 perros sanos). De cada uno de los 28 animales se tomaron muestras de sangre, ganglio linfático y pelo de la oreja, que fueron analizadas mediante PCR cualitativa a tiempo real para demostrar la presencia/ausencia de ADNk de *Leishmania infantum*. Los resultados obtenidos confirmaron la hipótesis planteada, ya que el ADNk de *L. infantum* fue detectado en el pelo de 9 de los 13 individuos del grupo A (69,2% de sensibilidad). Para completar el estudio se tomaron muestras de pelo de varias zonas corporales (algunos de los cuales fueron divididos en secciones) de los animales A1 y A6 y queratinocitos epidérmicos del animal A1.

Estas muestras fueron analizadas por PCR cuantitativa a tiempo real (qPCR), confirmándose la presencia de ADNk en el pelo de todas las zonas corporales,

MATERIALES, MÉTODOS Y RESULTADOS

en las distintas secciones del pelo (pudiéndose incluso cuantificar el ADNk analizando un único pelo) y en los queratinocitos epidérmicos, en los que se detectó una alta concentración de ADNk. Todas las muestras de los animales del grupo B (control) fueron negativas.

Los resultados obtenidos sugieren que el pelo es un tejido especializado en el secuestro, acumulación y eliminación de ADN exógeno parasitario y que además desempeña un importante papel en la detoxificación del organismo durante el curso de la enfermedad. Además, este método podría presentar claras aplicaciones diagnósticas, forenses y epidemiológicas para la búsqueda de reservorios animales silvestres y domésticos de la leishmaniosis. Por último, la metodología descrita podría ser útil para detectar moléculas de ADN exógeno en otras enfermedades parasitarias, bacterianas o fúngicas, tanto de animales como de seres humanos.



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Veterinary Parasitology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/vetpar

Detection of *Leishmania infantum* kinetoplast minicircle DNA by Real Time PCR in hair of dogs with leishmaniosis

Silvia Belinchón-Lorenzo^{a,*}, Virginia Iniesta^a, Juan Carlos Parejo^b,
Javier Fernández-Cotrina^a, Rubén Muñoz-Madrid^a, Manuel Soto^c,
Carlos Alonso^c, Luis Carlos Gómez Nieto^a

^a *LeishmanCeres Laboratory (GLP Compliance Certified), Parasitology Unit, Veterinary Faculty, University of Extremadura, Avenida de la Universidad s/n, 10003 Cáceres, Spain*

^b *Genetics Unit, Veterinary Faculty, University of Extremadura, Avenida de la Universidad s/n, 10003 Cáceres, Spain*

^c *Severo Ochoa Molecular Biology Center, CSIC-UAM, Calle Nicolás Cabrera, 28049 Madrid, Spain*

ARTICLE INFO

Article history:

Received 4 June 2012

Received in revised form 5 November 2012

Accepted 6 November 2012

Keywords:

Hair

Leishmania infantum

Dog

Kinetoplast DNA (kDNA)

Real Time PCR

Keratinocytes

ABSTRACT

It is known that hair can accumulate environmental toxics and excrete foreign chemical or biological substances. In this context, we hypothesized that foreign DNA could be found in the hair of an infected organism, and thus, be detected by Real Time PCR in the hair of *Leishmania infantum* naturally infected dogs. A population of 28 dogs living in *Leishmania* endemic areas was divided into two groups: A (13 *Leishmania* infected dogs) and B (15 healthy dogs). Blood, lymph node and ear hair samples from all of them were tested for the presence of parasite kinetoplast DNA (kDNA). For the same purpose, hair of several body areas and hair sections of two infected dogs were also analyzed. Epidermal keratinocytes from an infected animal were also analyzed for reactivity against *Leishmania* antigens by ELISA and for the presence of kDNA. Regarding to dogs from group A, parasite kDNA was detected in the 100% of lymph node samples. The sensitivity of Real Time PCR in ear hair was similar to that obtained in blood (9 positive out of 13 versus 8 positive out of 13, respectively). Moreover, the presence of *L. infantum* kDNA was also detected in the hair of all the analyzed body zones, in all hair sections and in epidermal keratinocytes. In infected dogs, parasite kDNA could be detected and quantified from just one single hair, whereas it was not detected in any of the samples of the healthy dogs. This work describes a new method for a reliable and non-invasive diagnosis of canine leishmaniosis using hair samples of infected animals. The data presented also provide some insights for the understanding of the physiology of keratinocytes and the role of hair as a specialized tissue in the kidnapping and removal of foreign DNA.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The skin is the largest and most visible organ of the body. Together with the hair the skin behaves as a protective barrier against physical, chemical and microbiological

damages, reflecting also pathological processes that occur in other organs or tissues (Chuong et al., 2002; Elias, 2007). Other important functions of the skin are the storage and excretion of substances, and it is also involved in processes connected with immune regulation (Scott et al., 2001a).

In leishmaniosis, the infection progresses towards a chronic form of the disease with harmful consequences in absence of an efficient treatment, manifested as dermatological and mucosal lesions (Singh, 2006). It is interesting to notice that high *Leishmania* parasite load has been observed

* Corresponding author. Tel.: +34 927 25 71 31; fax: +34 927 25 71 10.
E-mail addresses: sibelo@unex.es, leishmanceres@gmail.com,
leishman@unex.es (S. Belinchón-Lorenzo).

in epidermis in up to 40% of biopsies of patients with leishmaniosis (Azadeh et al., 1985). Transepithelial elimination of amastigote forms through pores between cells of epidermis, hair follicles and sweat glands have been also reported (Azadeh and Abdulla, 1994; Perrin et al., 1995). The participation of the skin immune system in different forms of leishmaniosis is largely unknown, but it have been described that some of its constituents are implicated in the control and elimination of infective promastigote forms (Moll, 1993; Maurer et al., 2006) from primary infection until the end of the process. In fact, keratinocytes that represent the 95% of all epidermal cells, play a very important role in innate immunity responses against pathogens due to their capability to express Toll-like receptors (TLRs) and because they are an important source of inflammatory mediators (Pivarcsi et al., 2005; Scott et al., 2001b).

The diagnosis of canine leishmaniosis is currently based on different serological, parasitological and molecular techniques (Francino et al., 2006; Gomes et al., 2007; Rodríguez-Cortés et al., 2007). The use of Real-Time PCR method provides the ability to perform a very sensitive, accurate and reproducible measurements of specific DNA present in a sample. It has been reported its high sensitivity and specificity using many different tissue samples as blood, lymph node and bone marrow – among others – specially when kinetoplast DNA (kDNA), located in the parasite mitochondrion, is targeted (Reale et al., 1999; Francino et al., 2006; Rodríguez-Cortés et al., 2007; Manna et al., 2004). This kDNA is comprised of two units, the maxicircles (present in a number of 30–50 copies/parasite, with 20–40 kb in length) and the minicircles (present in a number of 10,000–20,000 copies/parasite, with 1 kb in length) (Rodgers et al., 1990). The high number of copies of this minicircle and the existence of a conserved region (with 200 base pairs in length, approximately) between species has allowed the use of molecular probes based on it for diagnosis (Rodgers et al., 1990; Weiss, 1995).

As previously described, hair can accumulate environmental toxics and excrete foreign substances. In humans, metal traces, abuse drugs, antibiotics, other drugs, and tobacco residues have been detected in the hair (Agusa et al., 2005; Kim and Kim, 2011; Forman et al., 1992; Musshoff and Madea, 2006; Dorea et al., 1987; Takiguchi et al., 2001; Uematsu, 1993). Hair analyses have been also performed in many animal species for the detection of veterinary drugs in cattle, horses and pigs, of trace metals in cattle and even in seals, and of abuse drugs in rats and mice (Gratacós-Cubarsí et al., 2006, 2007; Patra et al., 2007; Wenzel et al., 1996; Stout et al., 2000). Although various mechanisms have been proposed such as passive diffusion from the bloodstream into the growing hair cells (during their formation), secretion of the apocrine and sebaceous glands (after hair formation), or from the external environment (after hair has emerged from the skin) (Henderson, 1993), little is known about how these substances end up being located in the hair.

In view of these data together, we think it would not be surprising to find foreign DNA in the hair of a parasite infected organism. Thus, the aim of the present work has

been to test whether foreign DNA could be kidnapped in the hair of a parasitized organism by using molecular techniques. For this purpose, we have analyzed by Real Time PCR the presence of parasite kDNA in the hair and epidermal keratinocytes of naturally *Leishmania* infected dogs, targeting the conserved region of the *Leishmania infantum* minicircle. We decided to complete this PCR results by analyzing also the presence of antibodies against *Leishmania* antigens in these cells.

The data presented in this paper describe a new method for a reliable and non invasive diagnosis of leishmaniosis. As far as we know, this is the first report of the presence of parasite DNA in the hair of an animal host.

2. Materials and methods

2.1. Animals

The population of 28 dogs used in this study lived in *L. infantum* endemic areas of the Extremadura region (Spain). They were divided into two groups: A (*Leishmania*-infected dogs) and B (healthy dogs). Group A was comprised by 13 animals with positive lymph node PCR result and with anti-soluble *Leishmania* antigen (SLA) antibody response by ELISA. Most of them also presented positive results in blood PCR and IFAT, and showed typical clinical signs of the disease. Group B was constituted by 15 healthy dogs which were *Leishmania* negative as determined by all the techniques described above. They did not present any clinical sign of leishmaniosis.

2.2. Sampling

Blood, lymph node and hair samples from all dogs (and also epidermal keratinocytes from animal A1) were obtained, processed and stored at -80°C . Blood samples were obtained by fine-needle aspiration according to laboratory standard operating procedures. Two EDTA coated tubes were used to obtain the blood samples. The first one was divided into two aliquots of 200 μl each and stored at -80°C until DNA extraction. To obtain the sera, the blood from the second tube was centrifuged at $447 \times g$ for 10 min at 4°C and stored at -80°C . Lymph node biopsies were also obtained by fine-needle aspiration, washed with 500 μl of sterile PBS, and stored in two aliquots of 250 μl at -80°C for DNA extraction.

Hair samples were extracted with tweezers. Ear hair of all dogs and hair from other corporal zones (head, trunk and extremities) of animals A1 and A6 were obtained in order to quantify the parasite load in different body areas and to determine the minimum amount of hair necessary to detect the presence of *Leishmania* kDNA. To determine the presence of *L. infantum* kDNA along the length of the hair, several hairs were divided in two halves (hair shaft and follicle from animal A6) or in three segments (proximal, central and distal in animal A1). To detect the presence of anti-*Leishmania* antibodies, 30 mg of epidermal keratinocytes were obtained by skin scraping from the ischial area of animal A1.

2.3. Serological analyses

2.3.1. ELISA

This technique was used for the semi-quantitative detection of specific antibodies against the total soluble antigen (SLA) of *L. infantum*. First, 96 wells ELISA plates were coated with 8 µg/ml of SLA antigen (obtained from *L. infantum* promastigotes MCAN/ES/1996/BCN150, zymodeme MON-1). Sera from the 28 dogs were diluted (1/200) and tested in duplicate. Peroxidase-conjugated sheep anti-dog IgG2 (Bethyl Laboratories, Montgomery, TX, USA) was used as secondary antibody. Sera of known reactivity obtained from parasite-free and from *Leishmania* infected dogs (1/200 diluted) were included as negative and positive controls, respectively, and analyzed in quadruplicate. Plates were developed with OPD substrate (with H₂O₂ in citrate buffer). The optical density (O.D.) was read at 492 nm and normalized relative to the positive control mean value (which is considered as O.D. = 1 in each case). The cut-off value was set as the mean of O.D. values plus 3SD of a population of 300 healthy dogs (data not shown). In addition, 100 µl of the supernatant obtained from processed epidermal keratinocytes of dog A1 were analyzed by ELISA titration. To obtain the supernatant, epidermal keratinocytes were sonicated for two cycles of 15 min (187 W) in 1 ml of sterile PBS buffer and then, centrifuged for 3 min at 10,000 × g. The supernatant titration was performed ranging in dilution from 1/2 to 1/1280 in sterile PBS, as described above.

2.3.2. IFAT

This technique was used for the determination of the antibody titre (1/x) against *L. infantum* antigens. First, the parasites (*L. infantum* promastigotes MCAN/ES/1996/BCN150, zymodeme MON-1) were immobilized on microscope slides. Sera from the 28 dogs were assayed in serial two-fold dilutions from 1/40 to 1/640 in sterile PBS to determine the total IgG levels. The immunofluorescent assay was developed using a rabbit fluorescein-labelled anti-dog IgG (Nordic Immunological Laboratories, Tillburg, The Netherlands) as conjugate. Sera of known reactivity obtained from parasite-free and from *Leishmania* infected dogs were included as negative and positive controls, respectively. The reaction was visualized under fluorescence microscopy. The serum titre was determined by the maximal dilution in which the fluorescence was still detectable. The IFAT was considered positive when the titre was ≥ 1/80.

2.4. Parasitological analyses

2.4.1. DNA extraction

Each one of the hair samples were introduced in screw-cap sterile microtubes and incubated in 250 µl of lysis buffer (10 mM TrisCl, 0.1 EDTA, 0.5% SDS + 20 µg/ml pancreatic RNase) for 2 h at 37 °C. Proteinase K was added to a final concentration of 150 mg/ml and incubated at 56 °C overnight. Then, 200 µl of supernatant were collected and stored at –80 °C. Hairs do not completely dissolve during digestion, according to that is described in specialized articles in which this sample is employed for DNA extraction

as forensic techniques (Pfeiffer et al., 2004; Suenaga and Nakamura, 2005). Also, ten hairs from the ischial zone of animal A6 were processed in the same way as above but without the proteinase K treatment. Also, 1 mg of epidermal keratinocytes from animal A1 was processed as indicated above and stored at –80 °C for DNA extraction. The DNA from all samples was obtained using the UltraClean BloodSpin kit (MoBio Laboratories, Carlsbad, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. The detection and quantification of the kDNA from *L. infantum* were performed by Real Time PCR.

The PCR reactions were carried out in 96 wells PCR plates in a final volume of 25 µl (5 µl of DNA + 20 µl of Reaction Mix), containing 20 µM of each primer (Leish1: 5'-AACTTTCTGGTCCCTCCGGGTAG-3' and Leish2: 5'-ACCCCAGTTTCCCGCC-3'), 10 µM of TaqMan Probe (FAM-5'-AAAAATGGGTGCCAGAAAT-3'-non fluorescent quencher-MGB) (Francino et al., 2006), and the Maxima Probe/ROX qPCR Master Mix (Fermentas GmbH Laboratories, St Leon-Rot, Germany). The thermal cycling profile used was one incubation step at 50 °C for 2 min and an initial denaturation step at 95 °C for 10 min, followed by 40 cycles of denaturation at 95 °C for 15 s and annealing-extension at 60 °C for 1 min. Each amplification run contained positive controls to test the proper conditions of the reagents (DNA extracted from 55,000 *L. infantum* promastigotes MCAN/ES/1996/BCN150, zymodeme MON-1) and negative controls to detect possible contamination of reagents with target DNA (DNA extracted from a healthy dog blood sample). All PCR analyses were performed in a Step One Plus Real Time PCR System (Applied Biosystems Laboratories, Foster City, CA, USA).

2.4.2. Detection of kinetoplast minicircle DNA from *L. infantum*

A comparative Ct experiment (2^{-ΔΔCt}) (Livak and Schmittgen, 2001) using the DNA of the 28 dogs extracted from blood, lymph node and ear hair samples was performed. All samples were tested in duplicate. In order to determine the presence/absence of *Leishmania* kDNA by relative quantification (RQ) we used the TaqMan Gene Expression Assays/Eukariotic 18S rRNA (Applied Biosystems Laboratories, Foster City, CA, USA) as an internal reference of canine genomic DNA and as the calibrator sample the negative control described above. Results were expressed in terms of threshold cycle (Ct). Samples were considered positive when the Ct of each one was lower than 35 (Applied Biosystems Application note, 2006), when the amplification was detected in both replicates and when the log₁₀RQ of each sample was higher than the 5% of the log₁₀RQ of the positive control.

2.4.3. Quantification of kinetoplast minicircle DNA from *L. infantum*

Once the presence of *Leishmania* kDNA in the hair was detected, in order to know the minimum amount of hair necessary to detect *Leishmania* kDNA and to quantify the parasite load in hairs of various body zones (head, trunk and extremities), in sections of the same hair and in epidermal keratinocytes, a standard curve was carried out (Rutledge and Côte, 2003). To perform

this curve the DNA from six quantities of *Leishmania* parasites (MCAN/ES/1996/BCN150, zymodeme MON-1) ranging from 15,360 to 15 (dilution factor 4 \times) was extracted and analyzed together with the hair samples in triplicate. Samples were considered positive when the Ct of each one was lower than 35 and when the amplification was detected in all the replicates.

3. Results

As shown in Table 1, most of the analyzed SLA ELISA positive dogs (11 out of 13, Group A) presented the typical signs of canine leishmaniosis (weight loss, hyperkeratosis, lymphadenomegaly, etc.), whereas the remaining two dogs were clinically healthy but infected dogs. The Real Time PCR comparative Ct experiment (Table 1) was able to detect the presence of *Leishmania infantum* kDNA in the hair of 9 out of 13 naturally infected dogs (Group A). The sensitivity of the technique in ear hair was similar to that obtained in blood (8 positive out of 13 dogs). The highest sensitivity (100%) was obtained when lymph node samples were analyzed since parasite kDNA was detected in all the infected dogs. As observed in Group A (Table 1), the ELISA assays were more sensitive (100%) than IFAT (10 positive dogs out of 13). The specificity of the Real Time PCR assay either when applied to lymph node, blood and hair samples taken from the healthy dogs (Group B) was confirmed by ELISA and IFAT (Table 1).

Real Time PCR was standardized performing a standard curve experiment (Table 2) in order to quantify the parasite load in hairs from different body zones of *Leishmania* infected dogs (Group A). The limit of detection (LOD) obtained was 0.0079 parasites in the PCR reaction, with a correlation of 0.993. As shown in Table 2, kDNA could be found in the hairs of different body sections (head, trunk and extremities) of dogs A1 and A6. The highest amount of parasite DNA was observed in ischium hair samples of animal A6, even in the case in which the tissue was not treated with proteinase K, a serine protease that digests keratin. However, the quantity of detected kDNA was higher when the same sample was processed with proteinase K.

The standard curve experiment also allows us to quantify the parasite load in the different parts of the hair (Table 2). *L. infantum* kDNA could be detected in all the sections of the same hair as an indication that it is stored along the hair length. The amount of kDNA observed in the hair shaft is larger than in the follicle (animals A1 and A6).

By using the standard curve the minimum amount of hair necessary to detect *Leishmania* kDNA (Table 2) could be also determined. The data shown indicate that there is a direct correlation between the number of ischial hairs (animal A1) and the quantity of parasite DNA. Interestingly, parasite DNA could also be detected and quantified even in a single hair. The individual analysis of ten single ischial hairs from animal A6 (data not shown) showed that most of them (90%) contained kDNA, being the maximum, minimum and average threshold cycles 33.47, 28.25, and 31.21 (SD = 2.19), respectively.

Besides, parasite kDNA was detected and quantified in epidermal keratinocytes of animal A1 (Table 2). In order to determine whether keratinocytes contain parasite kDNA and anti-*Leishmania* antibodies, a supernatant from keratinocytes was obtained as described in Section 2.3.1. The analyses by Real Time PCR showed that keratinocytes contain large amounts of kDNA (Table 2), and also antibodies against *L. infantum*, that were detected by ELISA (Fig. 1) and Western Blot (data not shown).

4. Discussion

Since it has been shown that hair can accumulate many environmental toxics and excrete foreign substances both in humans (Agusa et al., 2005; Kim and Kim, 2011; Forman et al., 1992; Musshoff and Madea, 2006; Dorea et al., 1987; Takiguchi et al., 2001; Uematsu, 1993) and in animals (Gratacós-Cubarsí et al., 2006, 2007; Patra et al., 2007; Wenzel et al., 1996; Stout et al., 2000), and that DNA extraction from hair samples is quite easy (Stolker et al., 2007), we have been tested whether *L. infantum* kDNA could be detected from hair of infected dogs. Thus, the *L. infantum*-*Canis familiaris* visceral leishmaniosis model was used to examine whether hair is involved

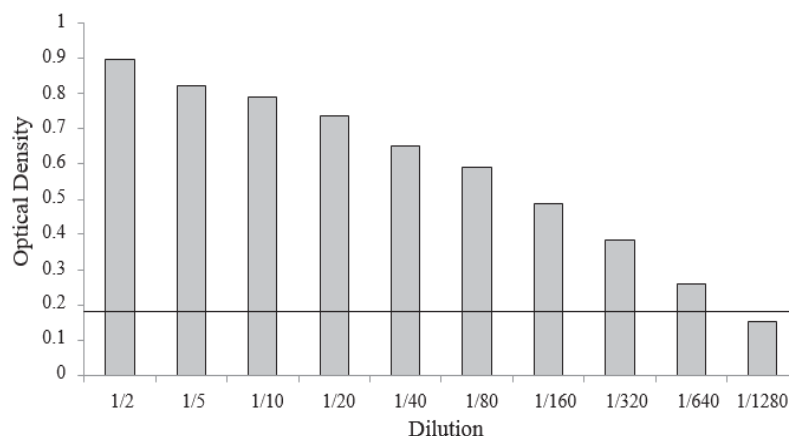


Fig. 1. Analysis by SLA IgG2 ELISA of the epidermal keratinocytes supernatant from animal A1. The results of titration (ranging from 1/2 to 1/1280 dilution) are expressed as the average O.D. obtained from two duplicates. Positive (mean O.D. = 1.061; SD = 0.049) and negative (mean O.D. = 0.148; SD = 0.015) sera controls were employed at 1/200 dilution. The cut-off was established as the mean O.D. values of negative controls + 3SD.

Table 1
Summary of clinical, serological and parasitological evaluation of dogs with (Group A) or without (Group B) canine visceral leishmaniasis caused by *Leishmania infantum*.

Group	Animal	Clinical signs ^a		Serological analyses		Parasitological analyses by Real Time PCR ^d			
		General	Skin	ELISA SLA IgG2 ^b Normalized O.D. (assessment)	IFAT ^c 1/x (assessment)	Blood Ct (assessment)	Lymph node Ct (assessment)	Ear Hair Ct (assessment)	
A (Infected dogs)	1	S, DC, WL, RP, GL	DS, H	1.037 (+)	160 (+)	29.99 (+)	21.38 (+)	29.48 (+)	
	2	-	-	0.918 (+)	160 (+)	38.44 (-)	24.75 (+)	39.35 (-)	
	3	PL, C	-	0.966 (+)	640 (+)	26.77 (+)	23.23 (+)	29.29 (+)	
	4	WL, S, PM, DC, GL, B, C	H, DS, DT, A	1.007 (+)	640 (+)	22.28 (+)	25.26 (+)	30.99 (+)	
	5	WL, PM, HY, GL	H	0.926 (+)	320 (+)	22.26 (+)	17.77 (+)	26.16 (+)	
	6	HY, GL, E	U	0.982 (+)	640 (+)	32.95 (+)	24.19 (+)	31.17 (+)	
	7	GL, C	DS	0.897 (+)	320 (+)	31.06 (+)	21.41 (+)	26.90 (+)	
	8	WL, DC, GL, C, B, E	-	0.859 (+)	320 (+)	39.11 (-)	23.24 (+)	36.42 (-)	
	9	-	H	0.770 (+)	80 (+)	35.52 (-)	29.84 (+)	29.34 (+)	
	10	WL, GL, B	U, H, A	0.889 (+)	320 (+)	34.60 (+)	24.64 (+)	34.16 (+)	
	11	E, C	-	0.696 (+)	<40 (-)	37.29 (-)	31.27 (+)	39.38 (-)	
	12	-	-	0.651 (+)	<40 (-)	36.36 (-)	31.14 (+)	34.77 (+)	
	13	GL	A	0.741 (+)	<40 (-)	33.64 (+)	31.11 (+)	(-) ^e	
B (Healthy dogs)	1	-	-	0.318 (-)	<40 (-)	(-) ^e	(-) ^e	36.31 (-)	
	2	-	-	0.220 (-)	<40 (-)	37.37 (-)	(-) ^e	35.69 (-)	
	3	-	-	0.402 (-)	<40 (-)	35.99 (-)	(-) ^e	(-) ^e	
	4	-	-	0.431 (-)	<40 (-)	36 (-)	(-) ^e	36.55 (-)	
	5	-	-	0.343 (-)	<40 (-)	36.24 (-)	(-) ^e	35.54 (-)	
	6	-	-	0.469 (-)	40 (-)	38.76 (-)	(-) ^e	36.89 (-)	
	7	-	-	0.253 (-)	<40 (-)	39.88 (-)	(-) ^e	37.29 (-)	
	8	-	-	0.256 (-)	<40 (-)	36.99 (-)	(-) ^e	35.66 (-)	
	9	-	-	0.308 (-)	<40 (-)	(-) ^e	(-) ^e	36.28 (-)	
	10	-	-	0.473 (-)	<40 (-)	38.12 (-)	(-) ^e	36.55 (-)	
	11	-	-	0.319 (-)	<40 (-)	(-) ^e	(-) ^e	(-) ^e	
	12	-	-	0.400 (-)	<40 (-)	(-) ^e	36.89 (-)	(-) ^e	
	13	-	-	0.250 (-)	<40 (-)	(-) ^e	(-) ^e	(-) ^e	
14	-	-	0.322 (-)	<40 (-)	(-) ^e	(-) ^e	(-) ^e		
15	-	-	0.348 (-)	<40 (-)	(-) ^e	37.71 (-)	(-) ^e		

^a Clinical signs. *General*: weight loss (WL), dull coat (DC), pale mucous membranes (PM), renal pain (RP), hyperthermia (HY), syndrome. anorexia, apathy (S), generalized lymphadenomegaly (GL), partial lymphadenomegaly (PL), conjunctivitis (C), blepharitis (B), episcleritis (E). *Skin*: dermatitis (DT), alopecia (A), ulceration (U), desquamation (DS), hyperkeratosis (H).

^b ELISA SLA IgG2. Cut-off established: positive result (+); O.D. values >0.640; negative result (-); O.D. values <0.480.

^c IFAT. Cut-off established: positive result (+) titre ≥1/80; negative result (-) titre <1/80.

^d Real Time PCR. Cut-off established: positive result (+); Ct values <35; negative result (-); Ct values ≥35.

^e kDNA not detected at Ct=40.

Table 2
Real Time PCR results of *Leishmania* kDNA corporal distribution and location in different fragments of the hair and skin.

Animal	kDNA detection and quantification	Body area	Sample	No. of hairs employed	Real Time PCR results	
					Ct ^a (Assessment)	Estimated number of parasites ^b
A1	In different corporal zones	Lumbar	Whole hairs	5 units	32.06 (+)	1.92
		Prescapular	Whole hairs	5 units	31.03 (+)	3.50
		Ischium	Whole hairs	5 units	31.82 (+)	2.14
	In different parts of the hair	Ischium	Hair proximal segments	5 units	30.96 (+)	3.74
			Hair central segments	5 units	32.70 (+)	1.25
			Hair distal segments	5 units	28.73 (+)	15.21
	In different quantities of sample	Ischium	Whole hair	1 unit	34.59 (+)	0.37
			Whole hairs	2 units	33.18 (+)	0.91
			Whole hairs	5 units	31.81 (+)	2.14
			Whole hairs	10 units	29.48 (+)	9.55
	In epidermal keratinocytes	Ischium	Epidermal keratinocytes	1mg	24.89 (+)	170.27
A6	In different corporal zones	Frontal	Whole hairs	10 units	26.79 (+)	53.63
		Hock	Whole hairs	10 units	26.12 (+)	81.44
		Ischium	Whole hairs	10 units	23.98 (+)	301.43
	Without proteinase K treatment	Ischium	Whole hairs	10 units	28.44 (+)	129.22
	In different parts of the hair	Back	Whole hairs	5 units	29.10 (+)	13.13
			Hair shafts	5 units	27.70 (+)	30.50
			Hair follicles	5 units	32.46 (+)	1.67

^a Cut-off established: positive result (+): Ct values <35; negative result (-): Ct values ≥35.

^b Each parasite contains about of 10,000–20,000 copies of the minicircle kDNA.

in the recognition, isolation and removal of foreign DNA sequences. We tested if this DNA could be isolated from hair without keratin digestion, as previously stated for endogenous DNA (McNevin et al., 2005). The positive PCR results obtained without digestion with proteinase K suggest that parasite DNA is probably kidnapped among cells (in the extracellular matrix) and that it can be released after simple hair washes. The amount of parasite DNA that hair is able to eliminate and the quantity of hair/kg body removed in dogs every year (60–180 g) (Scott et al., 2001a), suggest that the hair has an important role in the detoxification of the organism.

Nowadays, the clinical diagnosis of canine leishmaniosis is based on different immunological techniques, such as IFAT and ELISA and also on parasite detection through microscope together with molecular techniques like conventional and Real Time PCR (Francino et al., 2006; Gomes et al., 2007; Rodríguez-Cortés et al., 2007). The selection of the best sample for PCR analysis is a very important matter to consider in the veterinarian practice. Lymph node biopsies provide high sensitivity results, but sampling could be difficult in dogs without lymphadenomegaly (Manna et al., 2004; Maia et al., 2009). Bone marrow aspirates seem to be a suitable alternative, but the collection is invasive and traumatic for animals (De Almeida Ferreira et al., 2012). The PCR analysis of skin biopsies also provide high sensitivity in the medical diagnosis of canine leishmaniosis even when compared with bone marrow (Manna et al., 2004; Rodríguez-Cortés et al., 2007; De Almeida Ferreira et al., 2012), since it has been stated that the main tissue reserve of the parasite in dogs is the skin (Solano-Gallego et al., 2001). On the other hand, many authors suggest that blood is the choice sample because the collection method is simple and slightly invasive, but the sensitivity obtained

is lower when compared with the other tissues described above (Manna et al., 2004; Francino et al., 2006). The use of hair for PCR analyses of DNA has many advantages over other methods because collection, transporting and storing is rather easy (Stolker et al., 2007) and the sampling process is non-invasive. We think that hair is a new sample to take in account in the clinical diagnosis of canine leishmaniosis, specially in field studies. We also suggest that this method could be applicable not only in domestic dogs, but also in wild carnivores where the study of leishmaniosis by molecular methods is still scarce (Sobrinho et al., 2008). The data presented in this paper describe a new method for a reliable diagnosis of leishmaniosis with a sensitivity similar to that obtained in blood samples even analyzing one single hair, although the use of at least five hairs is recommend to increase the sensitivity of the method.

Since the highest amount of parasite DNA was detected in the hair from the ischial zone of one of the *Leishmania* infected animals, we suggest this corporal zone as one of the choice area for sampling. However, we recommend to take samples at least from other two body regions (head, trunk) for more reliable results.

Future studies using hair samples are necessary to accurately determinate the sensitivity of Real Time PCR technique for the diagnosis of the different forms of canine leishmaniosis. Whether parasite kDNA could be detected only in recent cases of leishmaniosis or in other situation like corpses of human and animal fossils remain to be examined. The detection of parasitic diseases in dead bodies is difficult, being reported only by several archaeological references such as the isolation of *Trypanosoma cruzi* DNA in mummified corpses (Guhl et al., 1999; Guhl, 2005). Thus, we think that multiple applications of hair analysis could be developed to perform forensic and ancient

DNA detection for archeoparasitological studies in animal and human fossils. Hair is a contaminant-resistant tissue higher than bone and teeth samples. This fact is due to the hydrophobic nature of the cuticle proteins and the presence of keratin that avoid the penetration of contaminant extracorporeal DNA in hair (Gilbert et al., 2006). Based on the data presented, we believe that hair could have significant scientific and diagnostic value for the ongoing analysis of a *Leishmania* infection course. Moreover, we think that these data also add some insights to the understanding of the physiology of hair and epidermal keratinocytes and the possible involvement of these cells in the kidnapping and removal of foreign DNA in other infectious, neoplastic or autoimmune diseases.

It is known that the development of dermatitis is very variable among individuals due to the different host immune responses induced by *Leishmania* infection (Tapia et al., 1993). The role, however, that keratinocytes can play in primary and in already established infections is poorly known. As many other types of cells like leukocytes, macrophages and plasmocytes (Tapia et al., 1994) increasing evidences suggest that keratinocytes participate in cutaneous immune responses against pathogens observed in dermal and follicular inflammations that lead to the typical alopecia observed in leishmaniasis. Recently, it has been reported (Pivarcsi et al., 2005) that keratinocytes may play initiating roles by secreting cytokines and participate in the innate and acquired immune response against parasites (Girolomoni et al., 2006; Scott et al., 2001b). Furthermore, it is known that immunoglobulin receptors are present on keratinocytes (Cauza et al., 2005), and that these cells also express at least seven members of the human Toll-like receptors surface family (Pivarcsi et al., 2005). Our finding of anti-*L. infantum* immunoglobulins in keratinocytes suggests that a transepidermal elimination process of these proteins in the course of the disease is taking place. Keratinocytes may also participate in the mechanisms of control, elimination, and repair of damaged ecological niches. The presence of parasite kDNA in hair is probably connected with this metabolic and immunoregulatory function of keratinocytes that act as fixer cells of molecules for its subsequent elimination by the organism. This function may be extended along all the epidermal surfaces, as shown by the presence of parasite DNA sequences in keratinocytes from different body zones in infected animals.

In view of the data obtained we propose two mechanisms for the origin of foreign kDNA in the hair of infected animals, although the precise mechanisms have yet to be determined. One of them would be its direct incorporation in follicular cells, during keratinization process (Bengtsson et al., 2012; Harkey, 1993), due to local inflammation/dermatitis, that we consider the most important. But we do not exclude also the incorporation of this kDNA by migration from the bloodstream.

In conclusion, the large amounts of parasite kDNA sequestered and removed by growing hair suggest that it is a highly specialized tissue for the excretion of foreign organic toxic metabolites. The methodology described in this work could be useful to detect DNA molecules not only in cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis forms but also in diseases coursing with skin manifestations, such

as tuberculosis, sarcoidosis, histoplasmosis, and schistosomiasis. In all of these diseases, transepithelial elimination of microorganisms has been reported (Goette and Odom, 1986; Welykyj et al., 1991; Wood et al., 1976).

Acknowledgments

We would like to acknowledge the outstanding technical assistance of Mr. Manuel Gómez Blázquez, Mrs. Isabel Monroy Pérez, and Mrs. Victoria Baz Agudo.

This investigation was partially supported by grants from the research agreement SGTRI 112/06 between LETI Laboratories S.L.U. and University of Extremadura (Spain).

References

- Agusa, T., Kunito, T., Iwata, H., Monirith, I., Tana, T.S., Subramanian, A., Tanabe, S., 2005. Mercury contamination in human hair and fish from Cambodia: levels, specific accumulation and risk assessment. *Environ. Pollut.* 134, 79–86.
- Azadeh, B., Abdulla, F., 1994. Transepithelial elimination in cutaneous leishmaniasis. *Acta Derm. Venereol.* 75, 159.
- Azadeh, B., Samad, A., Ardehali, S., 1985. Histological spectrum of cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania tropica*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 79, 631–636.
- Bengtsson, C.F., Olsen, M.E., Brandt, L.Ø., Bertelsen, M.F., Willerslev, E., Tobin, D.J., Wilson, A.S., Thomas, H., Gilbert, P., 2012. DNA from keratinous tissue. Part I: hair and nail. *Ann. Anat.* 194, 17–25.
- Cauza, K., Hinterhuber, G., Dingelmaier-Hovorka, R., Brugger, K., Klosner, G., Horvat, R., Wolff, K., Foedinger, D., 2005. Expression of FcRn, the MHC class I-related receptor for IgG, in human keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.* 124, 132–139.
- Chuong, C.M., Nickoloff, B.J., Elias, P.M., Goldsmith, L.A., Macher, E., Maderison, P.A., Sundberg, J.P., Tagami, H., Plonka, P.M., Thestrup-Pedersen, K., Bernard, B.A., Schröder, J.M., Dotto, P., Chang, C.H., Williams, M.L., Feingold, K.R., King, L.E., Kligman, A.M., Rees, J.L., Christophers, E., 2002. What is the “true” function of skin? *Exp. Dermatol.* 11, 159–187.
- De Almeida Ferreira, S., Leite, R.S., Ituassu, L.T., Almeida, G.G., Souza, D.M., Fujiwara, R.T., Andrade, A.S.R., Melo, M.N., 2012. Canine skin and conjunctival swab samples for the detection and quantification of *Leishmania infantum* DNA in an endemic urban area in Brazil. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 6 (4), e1596.
- Dorea, J.G., Costa, J.M., Holzbecher, J., Ryan, D.E., Marsden, P.D., 1987. Antimony accumulation in hair during treatment of Leishmaniasis. *Clin. Chem.* 33 (11), 2081–2082.
- Elias, P.M., 2007. The skin barrier as an innate immune element. *Semin. Immunopathol.* 29, 3–14.
- Forman, R., Schneiderman, J., Klein, J., Graham, K., Greenwald, M., Koren, G., 1992. Accumulation of cocaine in maternal and fetal hair: the dose response curve. *Life Sci.* 50, 1333–1341.
- Francino, O., Altet, L., Sánchez-Robert, E., Rodríguez, A., Solano-Gallego, L., Alberola, J., Ferrer, L., Sánchez, A., Roura, X., 2006. Advantages of real-time PCR assay for diagnosis and monitoring of canine leishmaniasis. *Vet. Parasitol.* 137, 214–221.
- Gilbert, M.T.P., Menez, L., Janaway, R.C., Tobin, D.J., Cooper, A., Wilson, A.S., 2006. Resistance of degraded hair shafts to contaminant DNA. *Forensic Sci. Int.* 156, 208–212.
- Girolomoni, G., Tessari, G., Bos, J.D., 2006. The skin as an immunologic organ. In: Sarzi-Puttini, P., Doria, A., Girolomoni, G., Kuhn, A., Asherson, R. (Eds.), *Handbook of Systemic Autoimmune Diseases: Vol. 5. The Skin in Systemic Autoimmune Diseases*. Elsevier BV, Amsterdam, pp. 3–9.
- Goette, D.K., Odom, R.B., 1986. Transepithelial elimination of granulomas in cutaneous tuberculosis and sarcoidosis. *J. Am. Acad. Dermatol.* 14, 126–128.
- Gomes, A.H.S., Ferreira, I.M.R., Lima, M.L.S.R., Cunha, E.A., Garcia, A.S., Araújo, M.F.L., Pereira-Chioccola, V.L., 2007. PCR identification of *Leishmania* in diagnosis and control of canine leishmaniasis. *Vet. Parasitol.* 144, 234–241.
- Gratacós-Cubarsí, M., Castellari, M., Valero, A., García-Regueiro, J.A., 2006. Hair analysis for veterinary drug monitoring in livestock production. *J. Chromatogr. B* 834, 14–25.
- Gratacós-Cubarsí, M., García-Regueiro, J.A., Castellari, M., 2007. Assessment of enrofloxacin and ciprofloxacin accumulation in pig and calf hair by HPLC and fluorimetric detection. *Anal. Bioanal. Chem.* 387, 1991–1998.

- Guhl, F., 2005. ADN fósil: arqueoparasitología en América. *Rev. Acad. Colomb. Cienc.* 29 (111), 229–238.
- Guhl, F., Jaramillo, C., Vallejo, G.A., Yockteng, R., Cárdenas-Arroyo, F., Fornaciari, G., Arriaza, B., Aufderheide, A.C., 1999. Isolation of *Trypanosoma cruzi* DNA in 4000-year-old mummified human tissue from Northern Chile. *Am. J. Phys. Anthropol.* 108, 401–407.
- Harkey, M.R., 1993. Anatomy and physiology of hair. *Forensic Sci. Int.* 63, 9–18.
- Henderson, G.L., 1993. Mechanisms of drug incorporation into hair. *Forensic Sci. Int.* 63, 19–29.
- Kim, M., Kim, K., 2011. Biomonitoring of lead and cadmium in the hair and fingernails of elderly Korean subjects. *Biol. Trace Elem. Res.* 143, 794–802.
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods* 25, 402–408.
- Maia, C., Ramada, J., Cristóvão, J.M., Gonçalves, L., Campino, L., 2009. Diagnosis of canine leishmaniasis: conventional and molecular techniques using different tissues. *Vet. J.* 179, 142–144.
- Manna, L., Vitale, F., Reale, S., Caracappa, S., Pavone, L.M., Della Morte, R., Cringoli, G., 2004. Comparison of different tissue sampling for PCR-based diagnosis and follow up of canine visceral leishmaniasis. *Vet. Parasitol.* 125, 251–262.
- Maurer, M., Kostka, S.L., Siebenhaar, F., Moelle, K., Metz, M., Knop, J., Von Stebut, E., 2006. Skin mast cells control T cell-dependent host defense in *Leishmania major* infection. *FASEB J.* 20, 2460–2467.
- McNevin, D., Wilson-Wilde, L., Robertson, J., Kyd, J., Lennard, C., 2005. Short tandem repeat (STR) genotyping of keratinised hair. Part 1. Review of current status and knowledge gaps. *Forensic Sci. Int.* 153, 237–246.
- Moll, H., 1993. Epidermal Langerhans cells are critical for immunoregulation of cutaneous leishmaniasis. *Immunol. Today* 14 (8), 383–387.
- Musshoff, F., Madea, B., 2006. Review of biologic matrices (urine, blood, hair) as indicators of recent or ongoing cannabis use. *Ther. Drug Monit.* 28 (2), 155–163.
- No authors listed, 2006. Amplification efficiency of TaqMan gene expression assays. Applied Biosystems Application note. http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb_marketing/documents/generaldocuments/cms_040377.pdf (accessed 21.03.12).
- Patra, R.C., Swarup, D., Naresh, R., Kumar, P., Nandi, D., Shekhar, P., Roy, S., Ali, S.L., 2007. Tail hair as an indicator of environmental exposure of cows to lead and cadmium in different industrial areas. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 66, 127–131.
- Perrin, C., Taillan, B., Hofman, P., Mondain, V., Lefichoux, Y., Michiels, J.F., 1995. Atypical cutaneous histological features of visceral leishmaniasis in acquired immunodeficiency syndrome. *Am. J. Dermatopathol.* 17 (2), 145–150.
- Pfeiffer, I., Völkel, I., Täubert, H., Brenig, B., 2004. Forensic DNA-typing of dog hair: DNA-extraction and PCR amplification. *Forensic Sci. Int.* 141, 149–151.
- Pivarcsi, A., Nagy, I., Kemeny, L., 2005. Innate immunity in the skin: how keratinocytes fight against pathogens. *Curr. Immunol. Rev.* 1, 29–42.
- Reale, S., Maxia, L., Vitale, F., Glorioso, N.S., Caracappa, S., Vesco, G., 1999. Detection of *Leishmania infantum* in dogs by PCR with lymph node aspirates and blood. *J. Clin. Microbiol.* 37 (9), 2931–2935.
- Rodgers, M.R., Popper, S.J., Wirth, D.F., 1990. Amplification of kinetoplast DNA as a tool in the detection and diagnosis of *Leishmania*. *Exp. Parasitol.* 71, 267–275.
- Rodríguez-Cortés, A., Ojeda, A., López-Fuertes, L., Timón, M., Altet, L., Solano-Gallego, L., Sánchez-Robert, E., Francino, O., Alberola, J., 2007. A long term experimental study of canine visceral leishmaniasis. *Int. J. Parasitol.* 37, 683–693.
- Rutledge, R.G., Côte, C., 2003. Mathematics of quantitative kinetic PCR and the application of standard curves. *Nucleic Acids Res.* 31 (16), e93.
- Scott, D.W., Miller, W.H., Griffin, C.E., 2001a. Skin immune system and allergic skin diseases. In: Muller and Kirk's Small Animal Dermatology, 6th ed. W.B. Saunders, Philadelphia, pp. 543–666.
- Scott, D.W., Miller, W.H., Griffin, C.E., 2001b. Structure and function of the skin. In: Muller and Kirk's Small Animal Dermatology, 6th ed. W.B. Saunders, Philadelphia, pp. 1–70.
- Singh, S., 2006. New developments in diagnosis of leishmaniasis. *Indian J. Med. Res.* 123, 311–330.
- Sobrinho, R., Ferroglio, E., Oleaga, A., Romano, A., Millán, J., Revilla, M., Arnal, M.C., Trisciuglio, A., Gortázar, C., 2008. Characterization of widespread canine leishmaniasis among wild carnivores from Spain. *Vet. Parasitol.* 155 (3–4), 198–203.
- Solano-Gallego, L., Morell, P., Arboix, M., Alberola, J., Ferrer, L., 2001. 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.* 39 (2), 560–563.
- Stolker, A.A.M., Zuidema, T., Nielen, M.W.F., 2007. Residue analysis of veterinary drugs and growth-promoting agents. *Trends Anal. Chem.* 26 (10), 967–979.
- Stout, P.R., Claffey, D.J., Ruth, J.A., 2000. Incorporation and retention of radiolabeled *S*(+) and *R*(-) methamphetamine and *S*(+) and *R*(-) *N*-(*n*-butyl)-amphetamine in mouse hair after systemic administration. *Drug. Metab. Dispos.* 28 (3), 286–291.
- Suenaga, E., Nakamura, H., 2005. Evaluation of three methods for effective extraction of DNA from human hair. *J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 820, 137–141.
- Takiguchi, Y., Ishihara, R., Kato, R., Kamihara, S., Yokota, M., Uematsu, T., 2001. Measurement of flecainide in hair as an index of drug exposure. *J. Pharm. Sci.* 90 (11), 1891–1896.
- Tapia, F.J., Cáceres-Dittmar, G., Sánchez, M.A., Fernández, A.E., Convit, J., 1993. The cutaneous lesion in American leishmaniasis: leukocyte subsets, cellular interaction and cytokine production. *Biol. Res.* 26 (1–2), 239–247.
- Tapia, F.J., Cáceres-Dittmar, G., Sánchez, M.A., 1994. Inadequate epidermal homing leads to tissue damage in human cutaneous leishmaniasis. *Immunol. Today* 15 (4), 160–165.
- Uematsu, T., 1993. Utilization of hair analysis for therapeutic drug monitoring with a special reference to ofloxacin and to nicotine. *Forensic Sci. Int.* 63, 261–268.
- Weiss, J.B., 1995. DNA probes and PCR for diagnosis of parasitic infections. *Clin. Microbiol. Rev.* 8 (1), 113–130.
- Welykyj, S., Von Heimburg, A., Massa, M.C., Schmidt, K., Reddy, V., Gattuso, P., O'Keefe, P., 1991. Cutaneous lesions of histoplasmosis with transepidermal elimination in a patient with acquired immunodeficiency syndrome. *Cutis* 47 (6), 397–400.
- Wenzel, C., Adelung, D., Kruset, H., Wassermann, O., 1996. Trace metal accumulation and skin of the harbour seal, *Phoca vitulina*. *Mar. Pollut. Bull.* 26 (3), 152–155.
- Wood, M.G., Srolovitz, H., Schetman, D., 1976. Schistosomiasis, paraplegia and ectopic skin lesions as admission symptoms. *Arch. Dermatol.* 112 (5), 690–695.

3.2. First detection of *Leishmania infantum* kinetoplast DNA in hair of wild mammals: application of qPCR method to determine potential parasite reservoirs. Acta Trop. 128, (2013) 706-709.

Resumen

En el estudio anterior detectamos la presencia de ADNk de *Leishmania infantum* en el pelo de perros naturalmente infectados. Continuamos con nuestra línea de trabajo, esta vez enfocada a la detección del ADNk del parásito en el pelo de animales silvestres de distintas especies. Además, realizamos varios ensayos para determinar si el ADNk permanecía estable en el interior del pelo tras someter la muestra a condiciones medioambientales extremas.

Para llevar a cabo el estudio, se analizaron 68 muestras de pelo de 5 especies distintas de animales silvestres mediante qPCR: zorro (*Vulpes vulpes*), lobo (*Canis lupus*), garduña (*Martes foina*), rata común (*Rattus norvegicus*) y erizo (*Erinaceus europaeus*). Los resultados obtenidos confirmaron la presencia del ADNk de *L. infantum* en 14 de las 68 muestras analizadas, siendo positivo al menos un individuo de cada especie estudiada y encontrándose las cantidades más altas de ADNk en el pelo de los zorros. Una vez confirmada la positividad de las muestras, se escogieron pelos de un zorro positivo para realizar el estudio de estabilidad del ADNk en el pelo. Así, comprobamos que el material genético del parásito se mantiene estable tras someter el pelo a almacenamiento prolongado en congelación (-80°C) y desecación (56°C), exposición a rayos ultravioleta tipo C y tratamiento con sales de curtido. Sin embargo, no pudo detectarse ADNk tras simular condiciones de putrefacción mediante contaminación fecal.

MATERIALES, MÉTODOS Y RESULTADOS

Teniendo en cuenta nuestros resultados, la utilización del método qPCR-pelo para realizar estudios epidemiológicos en animales silvestres proporcionaría ventajas en cuanto a metodología. En primer lugar, el pelo es capaz de proteger el ADN parasitario localizado en su interior tras ser sometido a condiciones adversas, por lo que sería posible la utilización de muestras encontradas en la naturaleza. En segundo lugar, al ser una muestra no invasiva podría extraerse fácilmente sin anestesia, reduciendo el estrés de los animales, sin necesidad de instalaciones específicas ni condiciones especiales de conservación.

Hay que destacar que la vigilancia de los reservorios de la leishmaniosis supone una parte importante del control de la enfermedad, y que con este nuevo método podrían realizarse muestreos a un gran número de animales en un corto periodo de tiempo, sin causarles daño alguno, aportando información a la búsqueda de nuevos reservorios.



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Acta Tropica

journal homepage: www.elsevier.com/locate/actatropica

Short communication

First detection of *Leishmania infantum* kinetoplast DNA in hair of wild mammals: Application of qPCR method to determine potential parasite reservoirs



Rubén Muñoz-Madrid^{a,*}, Silvia Belinchón-Lorenzo^a, Virginia Iniesta^a,
Javier Fernández-Cotrino^a, Juan Carlos Parejo^b, Francisco Javier Serrano^a, Isabel Monroy^a,
Victoria Baz^a, Adela Gómez-Luque^a, Luis Carlos Gómez-Nieto^a

^a *LeishmanCeres Laboratory (GLP Compliance Certified), Parasitology Unit, Veterinary Faculty, University of Extremadura, Avenida de la Universidad s/n, 10003 Cáceres, Spain*

^b *Genetics Unit, Veterinary Faculty, University of Extremadura, Avenida de la Universidad s/n, 10003 Cáceres, Spain*

ARTICLE INFO

Article history:

Received 29 December 2012

Received in revised form 24 July 2013

Accepted 12 August 2013

Available online 20 August 2013

Keywords:

Hair

Leishmania infantum

Wild reservoirs

KinetoplastDNA (kDNA)

Real Time PCR

Diagnosis

ABSTRACT

The data presented in this paper describe the application of a method for a reliable and non-invasive diagnosis of leishmaniasis in wild reservoirs, based on the detection of *Leishmania infantum* kinetoplast DNA (kDNA) in hair samples by Real Time PCR (qPCR). The study has been performed on 68 ear/leg hair samples from 5 different wild species (*Vulpes vulpes*, *Canis lupus*, *Martes foina*, *Rattus norvegicus* and *Erinaceus europaeus*) from several geographic areas of West and North Spain. The presence of *Leishmania* kDNA was detected in 14 of the 68 analyzed samples, being the highest quantity of DNA observed in foxes. This is the first report of the presence of *Leishmania* in a hedgehog. The kDNA remained stable under the exposure of hair to different environmental conditions (freezing or high temperature, ultraviolet rays or treatment with tanning salts). This detection method could constitute a suitable alternative for the search of the parasite in wild hosts, due to the numerous advantages that hair samples present for collection, transport and storage processes.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Leishmaniasis are worldwide distributed zoonoses, caused by *Leishmania* protozoan and transmitted by sandfly vectors bite. The World Health Organization recommends the surveillance of wild and domestic hosts for epidemiological and prevalence analysis, as an important component of control strategies for zoonotic leishmaniasis (WHO technical report series, no. 949). Up to date, *Leishmania* parasites have been isolated from more than 70 different wild and domestic animal species belonging to several families: *Canidae*, *Muridae*, *Cricetidae*, *Cuniculidae*, *Leporidae*, *Procyonidae*, *Mustelidae*, *Felidae*, *Equidae* and *Bovidae*, among others. It is currently known that a large number of animals may be hosts of dermal, mucosal and visceral *Leishmania* species (Quinnell and Courtenay, 2009) that are responsible of human infections in the New World. In the Old World a relevant number of reservoirs have also been described (Reyes and Arrivillaga, 2009); several species of rodents behave as responsible of cutaneous forms of the disease,

whereas the domestic dog is considered to be the target host and main reservoir of visceral leishmaniasis caused by *L. infantum*, playing a key role in the transmission to humans (Ashford, 1996). In Spain, the first *Leishmania* isolation in a wild mammal was reported by Morillas Márquez et al. (1985) in black rat (*Rattus rattus*). Since then, several studies in wild animals have been performed (Portús et al., 2002; Sobrino et al., 2008; Millán et al., 2011; Molina et al., 2012). The searching of new wild reservoirs presents many difficulties. Most of times, anesthetic darts or traps are employed for the capture of alive specimens (Fowler, 2008). Sample collection causes additional stress to animals, mainly when lymph node or bone marrow samples are required for the detection of viscerotropic *Leishmania* species. Other additional problems come from the storage of samples in field trials and the need of specific facilities, which sometimes require a great economical support. For these reasons, most of the studies have been performed in corpses. In these cases fresh samples are difficult to obtain with the inconvenient of the tissues degradation that could interfere with the final results.

Several direct or indirect methods have been usually performed for the diagnosis of leishmaniasis. The employment of the highly sensitive Real Time PCR (qPCR) method for *Leishmania* DNA detection in skin biopsies, spleen or blood samples of wild animals

* Corresponding author. Tel.: +34 927 25 71 31; fax: +34 927 25 71 10.
E-mail addresses: rubenmunozvet@gmail.com, leishmanceres@gmail.com
(R. Muñoz-Madrid).

has been already reported (Talmi-Frank et al., 2010a,b; Gil de Mendonça et al., 2011).

Recently, it has been proposed the hair as a suitable sample to consider in the diagnosis of *Leishmania* infection by qPCR in the canine model (Belinchón-Lorenzo et al., 2013). The development of this method opens a new stage in the searching of animal hosts of *Leishmania* species. Thus, the objective of the present study has been to determine whether it is possible to apply this technique to detect the presence of *Leishmania* kDNA in wild animals that could be reservoirs of the disease. The stability of the parasite DNA has been also tested when hair is exposed to different conditions as freezing, desiccation, putrefaction, ultraviolet rays or tanning salts treatment.

2. Materials and methods

After extraction process, the quantity of parasite DNA present in each sample was estimated using a standard curve experiment, following the protocol described by Belinchón-Lorenzo et al. (2013). The purity, quality and concentration of exogenous DNA obtained from the samples after our extraction method was not assessed, but it was enough and suitable to allow correct amplifications by qPCR.

Samples were tested in triplicate and considered positive when threshold cycle (Ct) was lower than 35 (Applied Biosystems Application note, 2006) and when the amplification was detected in all the replicates.

2.1. *Leishmania* kinetoplast DNA (kDNA) detection by qPCR

A total of 68 samples (15–20 hairs from each animal) were carefully extracted with tweezers from clean zones of corpses (without presence of blood, wounds, etc.), to ensure the absence of contamination with other type of cells. The tweezers were always properly disinfected between samples. Hairs that proceeded from foxes (*Vulpes vulpes*), rats (*Rattus norvegicus*), beech martens (*Martes foina*), wolves (*Canis lupus*) and a hedgehog (*Erinaceus europaeus*) were analyzed (Table 1). All the corpses were collected in several areas of the West (Extremadura) and North (Asturias and Galicia) of Spain.

2.2. Stability study of *Leishmania* kDNA in hair

Hair samples from a *Leishmania* positive fox were exposed to 4 types of different environmental conditions (Table 2), in order to determine if they could affect to the qPCR result:

- Freezing: 5 hairs were analyzed before and after storage for 10 months at -80°C .
- High temperatures (desiccation): 10 hairs were introduced in a stove at 56°C for 4 months.
- Faecal contamination (putrefaction conditions): three samples of 5 hairs were incubated at 37°C with a stool sample:
 - Two of them were placed in a homogenized filtered solution of 1 g of stool sample in 10 ml of distilled water and incubated for 24 and 72 h, respectively.
 - The other one was placed on 1 g of stool sample and incubated for 24 h.
- Ultraviolet rays exposure: 5 hairs were introduced in a sterile microtube and exposed to the short wave ultraviolet C rays (X: 200–283 nm) of a laminar flux cabin for 72 h.
- Tanning salts treatment: a total of 5 hairs were deposited for 3 days in a solution that it is normally employed for fur

tanning: 0.2 g of potassium alum salt $[\text{AlK}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}]$ plus 0.2 g of sodium chloride salt (NaCl) in 5 ml of warm water.

After the performance of the respective processes, samples were stored at -80°C until DNA extraction and analysis, that were carried out together with a control sample (the same number of hairs from the same animal, but without any treatment), in each case.

3. Results

3.1. Detection and quantification of *Leishmania* kDNA by qPCR

As shown in Table 1, qPCR method was able to detect and quantify the presence of *Leishmania infantum* kDNA in the hair of 14 out of 68 analyzed samples (including 6 of 9 foxes, 3 of 3 beech martens, 2 of 6 rats, 2 of 49 wolves and the hedgehog) of the two body sections tested. The estimated number of parasites in all positive samples were quite variable, ranging from 0.41 to more than 11,000. Wolves were the species in which the lowest number of positive samples was found. The highest quantity of parasite DNA was observed in foxes, being the estimated number of parasites in hair of two individuals (F1 and F2) up to 1000 times greater than the observed in other species.

3.2. Stability study of *Leishmania* kDNA in hair

The different assays performed to analyze the stability of *L. infantum* kDNA in hairs showed a high rate of preservation to physical and chemical degradation agents (Table 2).

The storage of hair samples at freezing temperatures (-80°C) did not affect the qPCR results. It was also found that *Leishmania* kDNA was able to resist in hair 4 months under desiccation conditions (56°C). Moreover, after 72 h of exposure, neither the short length wave (UVC rays) nor the treatment with alum salts solution (used in fur tanning) degraded the totality of the parasitic genetic material contained in hairs, since the qPCR results remained positive after the influence of these external factors.

In contrast, the putrefaction conditions for 1 or 3 days at 37°C due to the exposure of hair to faecal contamination did not allow to amplify the kDNA in none of the samples analyzed.

4. Discussion

The current knowledge of the ecology of many parasitic diseases such as leishmaniasis has required a century of hard work to identify the potential hosts involved in the epidemiology of this disease in the different geographic areas. These studies in mammal reservoirs, especially wild animals, have needed in most cases many costly techniques to allow the detection of *Leishmania* parasites. Most of works are based on *post mortem* analysis, or *in vivo* sampling of animals trapped by laborious procedures and their subsequent release into natural habitats. In captive animals from zoos the problem is not minor because the sample collection entails a complex manipulation and requires deep sedation to avoid the stress of the individuals (Fowler, 2008).

The presence of foreign parasitic DNA in hair and epidermal keratinocytes of *Leishmania* infected animals (Belinchón-Lorenzo et al., 2013) has opened a suitable new scientific field to analyze the physiology and function of these epithelial cells during leishmaniasis, and possibly in other diseases. The qPCR-hair method allowed us to continue the search of other parasite reservoirs. This technique could be applied to epidemiological trials with significant methodological advantages. Hair samples are obtained by non-invasive ways without the need of anaesthesia. Thus, they could be collected in alive animals by rapid catch and release with lower

Table 1
Summary of species, geographic origin, sampling body area, Real Time PCR results and assessment of the 68 hair samples analyzed.

Region	Species	Animal ref.	Body area of hair sample	qPCR results ^a	
				Ct (assessment)	Estimated no. of parasites
Extremadura (West Spain)	Fox (<i>Vulpes vulpes</i>)	F-1	Leg	18.63 (+)	11,111.13
		F-2	Leg	18.67 (+)	10,651.27
		F-3	Ear	37.07 (-)	-
		F-4	Ear	36.79 (-)	-
		F-5	Ear	36.11 (-)	-
		F-6	Ear	28.14 (+)	33.88
		F-7	Ear	32.32 (+)	1.85
		F-8	Ear	29.78 (+)	10.69
		F-9	Ear	27.60 (+)	49.71
	Beech marten (<i>Martes foina</i>)	M-1	Leg	33.72 (+)	0.56
		M-2	Ear	29.88 (+)	10.00
		M-3	Ear	30.87 (+)	5.08
	Rat (<i>Rattus norvegicus</i>)	R-1	Leg	34.22 (+)	0.50
		R-2	Leg	31.83 (+)	1.87
		R-3	Leg	36.03 (-)	-
R-4		Leg	35.78 (-)	-	
R-5		Leg	35.58 (-)	-	
R-6		Leg	N.D.** (-)	-	
Asturias & Galicia (norturopam)	Hedgehog (<i>Erinaceous europaeus</i>)	H-1	Ear	33.51 (+)	0.81
		W-1	Ear	33.49 (+)	0.41
	Wolf (<i>Canis lupus</i>)	W-2	Ear	31.37 (+)	2.99
		W-3 to W-49	Ear	> 35 (-)	-

Cut-off established: positive result (+): Ct values < 35.

Negative result (-): Ct values ≥ 35.

^a Mean values of the three replicates of each sample.

** kDNA not detected at Ct = 40

stress than other conventional sampling methods. Moreover, the stability of the DNA in the samples is not affected by the temperature or environmental conditions in which they are stored and transported, since hairs are very resistant due to the hydrophobic nature of the cuticle and to the presence of keratin (Gilbert et al., 2006). This stability was demonstrated for endogenous DNA in all keratinized tissues (Bengston et al., 2012) and in mouse DNA samples after freezing and storing for 44 months (Garzel et al., 2010). But in our study, data suggested that hair protects also the foreign kDNA against external degradation. As expected, the storage of hair samples at freezing temperatures (-80 °C) and under desiccation did not affect the qPCR results, since both freezing and desiccation are processes that significantly reduce the free water required for the activity of enzymes and microorganisms and therefore provide desirable conditions for DNA conservation. For the same reason, the parasite DNA was neither degraded in the presence of tanning salts, since they are also employed to avoid the growth of microorganisms.

However, parasite DNA also could be extracted from hair and amplified by qPCR after maintenance at room temperatures and under the UVC rays, described by Guerrero-Beltrán and Barbosa-Cánovas (2004) as the most potent, damaging and denaturalizing

solar radiation. The results after exposure to putrefaction are the exception, suggesting that the hair contained in coprolites are not suitable for the search and isolation of parasite DNA because these samples present the ideal conditions for the growth of bacteria that could degrade nucleic acids.

In Spain, only two studies about the detection of *Leishmania* DNA by Real Time PCR in wolves (Sastre et al., 2008) or wild rabbits (Chitimia et al., 2011) have been reported, in which conventional samples (blood, spleen, skin, lymph node or bone marrow) were analyzed. As far as we know, this is the first time that *L. infantum* kDNA is detected by qPCR in hair of foxes, rats and beech martens (and in a hedgehog as a potential parasite reservoir). The low number of positive samples obtained from wolves may be due to their geographical origin, since the north of Spain is considered a non-endemic area of leishmaniasis (Miró et al., 2012).

Since we still do not know whether there is a correlation between the quantity of parasite DNA accumulated in hair and the parasite load in other organic tissues, future studies with higher number of naturally and experimentally infected animals are necessary to determine this correlation, the actual sensitivity of the hair-qPCR method in epidemiological studies, and also the chronobiology of the appearance of this extracorporeal DNA in the hair.

Table 2
Summary of assays performed and Real Time PCR results obtained after exposure of positive hair samples to different adverse environmental conditions.

Assay	Sample conditions	Ct ^a (assessment)
Freezing	Control (time 0)	31.81 (+)
	10 months at -80 °C	33.58 (+)
Desiccation	Control (time 0)	29.48 (+)
	4 months at 56 °C	29.83 (+)
None	Control 3 days at room temperature	28.73 (+)
	1 day in a stool solution (1 g/10 ml) at 37 °C	N.D.** (-)
	3 days in a stool solution (1 g/10 ml) at 37 °C	35.69 (-)
Exposure to	1 day on a stool sample at 37 °C	N.D.** (-)
	3 days of exposure	33.95 (+)
UVC rays	3 days of exposure	30.80 (+)
	Tanning salts treatment	3 days of exposure

Cut-off established: positive result (+): Ct values < 35; negative result (-): Ct values ≥ 35.

^a Mean value of the three replicates.

** kDNA not detected at Ct = 40.

Acknowledgments

We would like to acknowledge the outstanding technical assistance of Mr. Manuel Gómez Blázquez.

References

- Ashford, R.W., 1996. *Leishmaniasis reservoirs and their significance in control*. Clin. Dermatol. 14, 523–532.
- Belinchón-Lorenzo, S., Iniesta, V., Parejo, J.C., Fernández-Cotrina, J., Muñoz-Madrid, R., Soto, M., Alonso, C., Gómez Nieto, L.C., 2013. Detection of *Leishmania infantum* kinetoplast minicircle DNA by Real Time PCR in hair of dogs with leishmaniosis. Vet. Parasitol. 192 (1–3), 43–50.
- Bengston, C.F., Olsen, M.E., Brandt, L.O., Bertelsen, M.F., Willerslev, E., Tabin, D.J., Wilson, A.S., Gilbert, M.I.P., 2012. DNA from keratinous tissue, part I: hair and nail. Ann. Anat. 194, 17–25.
- Chitimia, L., Muñoz-García, C.I., Sánchez-Velasco, D., Lizana, V., Del Río, L., Murcia, L., Fisa, R., Riera, C., Giménez-Font, P., Jiménez-Montalbán, P., Martínez-Ramírez, Á., Meseguer-Meseguer, J.M., García-Bacete, I., Sánchez-Isarria, M.A., Sanchis-Monsonís, G., García-Martínez, J.D., Vicente, V., Segovia, M., Berriatua, E., 2011. Cryptic Leishmaniosis by *Leishmania infantum*, a feature of canines only? A study of natural infection in wild rabbits, humans and dogs in southeastern Spain. Vet. Parasitol. 181, 12–16.
- Fowler, M.E., 2008. Chemical restraint. In: *Restraint and Handling of Wild and Domestic Animals*. Wiley-Blackwell, Iowa, USA, pp 227–247.
- Garzel, L.M., Hankenson, F.C., Combs, J., Hankenson, K.D., 2010. Use of quantitative polymerase chain reaction analysis to compare quantity and stability of isolated murine DNA. Lab. Anim. 39 (9), 283–289.
- Gilbert, M.T.P., Menez, L., Janaway, R.C., Tobin, D.J., Cooper, A., Wilson, A.S., 2006. Resistance of degraded hair shafts to contaminant DNA. Forensic Sci. Int. 156, 208–212.
- Gil de Mendonça, P., Harsch, A., Mogl, C., Walther, B., Boje, J., Dimke, C., 2011. Molecular screening of wild rodent for *Leishmania infantum* in Germany. Acta Zool. Bulg. 63 (3), 307–311.
- Guerrero-Beltrán, J.A., Barbosa-Cánovas, G.V., 2004. Advantages and limitations on processing foods by UV light. Food Sci. Technol. Int. 10 (3), 0137–211.
- Millán, J., Zanet, S., Gomis, M., Trisciuglio, A., Negre, N., Ferroglia, E., 2011. An investigation into alternative reservoirs of canine leishmaniasis on the endemic island of Mallorca (Spain). Transbound. Emerg. Dis. 58, 352–357.
- Miró, G., Checa, R., Montoya, A., Hernández, L., Dado, D., Gálvez, R., 2012. Current situation of *Leishmania infantum* infection in shelter dogs in northern Spain. Parasit. Vector. 5, 60.
- Molina, R., Jiménez, M.I., Cruza, I., Iriso, A., Martín-Martín, I., Sevillano, O., Melero, S., Bernal, J., 2012. The hare (*Lepus granatensis*) as potential sylvatic reservoir of *Leishmania infantum* in Spain. Vet. Parasitol. 190, 268–271.
- Morillas Márquez, F., Benavides Delgado, I., González Castro, J., Reyes Magaña, A., Valero López, A., 1985. Découverte de *Leishmania sp.* dans des *Rattus rattus* de la province de Granade (Espagne). Ann. Parasitol. Hum. Comp. 60 (6), 768–770.
- Amplification efficiency of TaqMan gene expression assays. Applied Biosystems Application note. 2006 http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb_marketing/documents/generalduments/cms.040377.pdf (accessed 21.03.12).
- Portús, M., Gállego, M., Riera, C., Aisa, M.J., Fisa, R., Castillejo, S., 2002. Wild and domestic mammals in the life cycle of *Leishmania infantum* in southwest Europe. A literature review and studies performed in Catalonia (Spain). Rev. Iber. Parasitol. 62, 72–76.
- Quinnell, R.J., Courtenay, O., 2009. Transmission, reservoir hosts and control of zoonotic visceral leishmaniasis. Parasitology. 136, 1915–1934.
- Reyes, A., Arrivillaga, J., 2009. Fauna Mammalia asociada a los focos de leishmaniasis neotropical. Situación en Venezuela. Bol. Mal. Salud Amb. 49 (1), 35–52.
- Sastre, N., Francino, O., Ramírez, O., Enseñat, C., Sánchez, A., Altet, L., 2008. Detection of *Leishmania infantum* in captive wolves from Southwestern Europe. Vet. Parasitol. 158, 117–120.
- Sobrinho, R., Ferroglia, E., Oleaga, A., Romano, A., Millan, J., Revilla, M., Arnal, M.C., Trisciuglio, A., Gortázar, C., 2008. Characterization of widespread canine leishmaniasis among wild carnivores from Spain. Vet. Parasitol. 155, 198–203.
- Talmi-Frank, D., Jaffe, C.L., Nasereddin, A., Warburg, A., King, R., Svobodova, M., Peleg, O., Baneth, G., 2010a. *Leishmania tropica* in Rock Hyraxes (*Procapra capensis*) in a focus of human cutaneous leishmaniasis. Am. J. Trop. Med. Hyg. 82 (5), 814–818.
- Talmi-Frank, D., Kedem-Vaanunu, N., King, R., Bar-Gal, G.B., Ederly, N., Jaffe, C.L., Baneth, G., 2010b. *Leishmania tropica* infection in Golden Jackals and Red Foxes, Israel. Emerg. Infect. Dis. 16 (12), 1973–1975.
- World Health Organization Control of the leishmaniasis: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniases, 2010. WHO technical report series, 949.

3.3. Detection and chronology of parasitic kinetoplast DNA presence in hair of experimental *Leishmania major* infected BALB/c mice by Real Time PCR. Acta Trop. 128, (2013) 468-472.

Resumen

Para finalizar con el estudio del pelo como muestra no invasiva, en este trabajo se analizó el pelo de ratones infectados experimentalmente por la especie de tropismo cutáneo *Leishmania major* para comprobar si se producía el mecanismo de excreción de ADN exógeno a través del pelo observado en los trabajos anteriores durante el curso de la infección, tanto en el pelo del sitio de inoculación como en el de una zona alejada del mismo.

Para llevar a cabo el estudio, 4 ratones BALB/c fueron inoculados en ambas orejas con 1000 promastigotes metacíclicos de *L. major*. Se realizó el seguimiento de los ratones durante 35 días, tomándose semanalmente de 10 a 20 pelos de las orejas y de la pata trasera izquierda de cada animal. Estas muestras fueron analizadas por PCR cuantitativa a tiempo real (qPCR). Los resultados obtenidos confirmaron la presencia del ADNk de *L. major* en el pelo de los ratones. La incorporación de este material genético pudo detectarse en el pelo de la oreja a partir de la primera semana post-infección (1 animal positivo), observándose un aumento progresivo de la cantidad estimada de parásitos a lo largo del estudio. Los resultados mostraron que el ADNk de los parásitos previamente inoculados en la oreja también estaba presente en el pelo de la pata a partir de la tercera semana post-infección (3 animales positivos), indicando que se produce una diseminación del ADNk en zonas del organismo alejadas del sitio de infección. Por último, el pelo de ambas localizaciones de los 4 animales fue positivo a ADNk

MATERIALES, MÉTODOS Y RESULTADOS

en el punto final del estudio (quinta semana post-infección), siendo la cantidad de ADNk obtenida en el pelo de la oreja (sitio de inoculación) 20 veces mayor que en el de la pata (zona alejada).

Estos resultados confirman la capacidad del pelo como tejido especializado en el secuestro y eliminación de ADN exógeno. Finalmente, en este estudio también se comprobó que existe una clara correlación entre los análisis convencionales utilizados para realizar el seguimiento de la infección experimental en ratón y los resultados obtenidos en el pelo. Por ello queremos destacar la importancia del pelo como una nueva muestra a tener en cuenta en estudios con ratones, ya que este modelo es muy utilizado para ensayos de nuevas estrategias terapéuticas y de vacunación.



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Acta Tropica

journal homepage: www.elsevier.com/locate/actatropica

Detection and chronology of parasitic kinetoplast DNA presence in hair of experimental *Leishmania major* infected BALB/c mice by Real Time PCR

Virginia Iniesta^{a,*}, Silvia Belinchón-Lorenzo^a, Manuel Soto^b, Javier Fernández-Cotrino^a, Rubén Muñoz-Madrid^a, Isabel Monroy^a, Victoria Baz^a, Adela Gómez-Luque^a, Juan Carlos Parejo^c, Carlos Alonso^b, Luis Carlos Gómez Nieto^a

^a *LeishmanCeres Laboratory (GLP Compliance Certified). Parasitology Unit. Veterinary Faculty, University of Extremadura, Avenida de la Universidad s/n, 10003 Cáceres, Spain*

^b *Severo Ochoa Molecular Biology Center, Molecular Biology Department. CSIC-UAM, Calle Nicolás Cabrera, 28049 Madrid, Spain*

^c *Genetics Unit. Veterinary Faculty, University of Extremadura, Avenida de la Universidad s/n, 10003 Cáceres, Spain*

ARTICLE INFO

Article history:

Received 22 February 2013

Received in revised form 10 July 2013

Accepted 13 July 2013

Available online 2 August 2013

Keywords:

Hair

Leishmania major

Mice

Kinetoplast DNA (kDNA)

Real time PCR

Keratinocytes

ABSTRACT

Hair can accumulate foreign chemical or biological substances. Recently, it has been reported that parasite DNA can also be detected in the hair of *Leishmania infantum* infected dogs. The aim of this work has been to find out whether parasite DNA incorporates in the hair of *Leishmania major* experimentally infected animals. For this purpose, a group of 4 BALB/c mice, intradermally inoculated in both ears with 1000 *L. major* V1 strain promastigote forms, was monitored for parameters associated to the infection during 35 days. Weekly, ear swelling was measured, and hair samples from ears and leg were collected. Blood samples were obtained before challenge and at day 35 post infection, when parasite load was measured in ear, lymph node and spleen by limit dilution. Ear swelling and other parameters observed in the infected mice were consistent with those described for this model. The presence of parasite kinetoplast DNA (kDNA) was detected by Real Time PCR in all ear and leg hair samples at the final timepoint. These data suggests that hair is a specialized tissue in the sequestration and removal of foreign DNA. Detection of DNA in hair could be, therefore, a useful tool to chronologically record the infection process during experimental mice assays.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Experiments carried out in the *Leishmania major* (*L. major*) infection-mouse model have shown that the genetic predisposition for susceptibility or resistance to infection in different mice strains correlates with the dominance of an IL-4 driven Th2 response that causes disease or an IL-12 driven, IFN- γ dominated Th1 response that promotes healing and parasite clearance (Sacks and Noben-Trauth, 2002). Thus, the use of resistant C57BL/6 and susceptible BALB/c mice has allowed to have a deeper understanding of the immune response during *Leishmania* infection. These models have been widely employed to screen vaccine candidates against *Leishmania* (Mendez et al., 2003; Ramírez et al., 2010). The dominant Th1 response elicited in C57BL/6 mice leads to localized and benign lesions that resolve spontaneously. In contrast, the

predominant Th2 response generated in BALB/c leads to a severe and non-spontaneously healing lesion, with ulceration, necrosis and extensive inflammatory reaction that produces the development of systemic disease (Sacks and Noben-Trauth, 2002), which finally drives to a visceral dissemination of the parasite to draining lymph nodes, liver and spleen (Kurey et al., 2009) that could cause even the death of the animal (Sacks and Melby, 1998).

In the mouse models, the site for injection most frequently used is the hind footpad, employing a range of 10^5 – 10^7 parasites (Sacks and Melby, 1998; Belkaid et al., 1998). Nevertheless, it has been reported that BALB/c mice develop cutaneous lesions in infections that mimic natural conditions using a lower number of parasites (10–1000) inoculated intradermally in the ears (Belkaid et al., 1998; Courret et al., 2003).

In most of experimental *Leishmania* infection assays monitoring is done by serological methods (Iborra et al., 2003; Iniesta et al., 2008). The presence of parasites is diagnosed by immunostaining (Cangussú et al., 2009), culture microtitration or microscopical observation of tissue samples smears (Mendez et al., 2003). Nowadays, molecular methods are becoming increasingly important,

* Corresponding author. Tel.: +34 927 25 71 31; fax: +34 927 25 71 10.
E-mail addresses: leishmanceres@gmail.com, virginia.iniesta75@gmail.com (V. Iniesta).

specially quantitative PCR. In 2002, Nicolas et al. developed a highly sensitive and specific Real time PCR method that was able to detect and quantify *Leishmania* in mouse tissues. The samples employed were obtained mainly after necropsy. Recently it has been reported that the hair may be considered as a suitable sample for the diagnosis of *Leishmania infantum* (*L. infantum*) by Real time PCR in the canine model (Belinchón-Lorenzo et al., 2013). Following this finding, the aim of this work has been to find out whether in *L. major* experimentally infected animals DNA could also be found incorporated into the hair during a follow up period of infection. For this purpose we have analyzed if parasite kinetoplast DNA (kDNA) could be detected and quantified by Real time PCR in the hair of *L. major* infected BALB/c mice. This kDNA is comprised of two units, the maxicircles (present in a number of 30–50 copies/parasite, with 20–40 kb in length) and the minicircles (present in a number of 10,000–20,000 copies/parasite with 1 kb in length), as stated by Rodgers et al. (1990). The chronology of appearance of kDNA close to the inoculation site (ear), as well as in other separate body areas (leg) has been determined, monitoring the process for five weeks.

2. Materials and methods

2.1. Mice, parasites and experimental challenge

Four-six week old female BALB/c mice ($n=4$) were purchased from Harlan Interfauna Ibérica S.A. (Barcelona, Spain). *L. major* parasites clone V1 (MHOM/IL/80/Friedlin) were kept in a virulent state by passage in BALB/c mice. *L. major* amastigotes were obtained and transformed to promastigotes by culturing at 26 °C in Schneider's medium (Gibco, BRL, Grand Island, NY, USA) supplemented with 20% foetal calf serum. Metacyclic promastigotes of *L. major* (clone V1) were isolated from stationary cultures by negative selection as described by Sacks et al. (1985) using peanut agglutinin (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA). 1000 metacyclic forms were injected into the dermis (i.d.) of both ears of each mouse in a volume of 10 μ l. The evolution of the ear lesion was weekly monitored measuring the diameter of the indurations with a metric calliper. The Bioethical Committees of CBMSO (ref. CEEA-CBMSO-10-044) and UAM (ref. CEI-28-713) approved all animal handling methods and the infection procedures described (Research project FIS PI11/00095).

2.2. Sample collection

A quantity of about 10–20 hair samples were weekly taken using tweezers from the region surrounding both ears and from the left leg of each animal and stored at –80 °C until DNA extraction. The sample collection in clean body areas (avoiding wounds, blood spots, ...) assured the absence of contamination of hair with other type of cells, and the tweezers were always carefully disinfected with 1% SuredisVT® (Diversey, BCN, Spain) between samples. Blood was obtained by retroorbital bleeding just before challenge (day 0) and final timepoint (five weeks post-infection). The ears, retro-mandibular draining lymph nodes (DLNs) and spleen from each mouse were taken after euthanasia for parasite load determination by limiting dilution.

2.3. Serological analysis

ELISA method was used for the semi-quantitative detection of specific IgG, IgG1 and IgG2a antibodies against the total soluble antigen (SLA) of *L. major* at the two points of analysis. First, 96 wells ELISA plates were coated with 2 μ g/ml of SLA antigen (obtained from *L. major* promastigotes clone V1 as described in Iborra et al. (2005)). Sera were (1:100) diluted and tested in duplicate. Peroxidase-conjugated IgG (1:1000), IgG1 (1:1000) and

IgG2a (1:500) purchased from Nordic Immunological Laboratories (Tilburg, The Netherlands) were used as secondary antibodies. Orto-phenylenediamine-dihydrochloride (Dako A/S, Glostrup, Denmark) was used as a peroxidase substrate. After 15 min, the reaction was stopped by the addition of 50 μ l of 1 M H₂SO₄, and the absorbance was read at 450 nm. For each timepoint, results were expressed as the mean O.D \pm SD of four sera assayed individually.

2.4. Parasite load determination by limiting dilution

The number of parasites was determined in ear, DLN and spleen by a limiting dilution assay (Buffet et al., 1995). Briefly, ears were recovered from infected BALB/c mice. The ventral and dorsal sheets of the infected ears were separated and deposited in Dulbecco's modified Eagle medium containing Liberase C1 enzyme blend (50 μ g/ml). After 2 h of incubation at 37 °C, the tissues were cut into small pieces, homogenized and filtered using a cell strainer (70 μ m pore size). The homogenized tissue was serially diluted in a 96-well flat-bottomed microtiter plate containing Schneider's medium plus 20% FCS in triplicates. The number of viable parasites was determined from the highest dilution at which promastigotes could be grown up to 7 days of incubation at 26 °C. For the determination of the number of parasites in the retro-mandibular DLNs and spleens, tissue samples were recovered, mechanically dissociated and then filtered and serially diluted as above. In all cases parasite load is expressed as the number of parasites in the whole organ.

2.5. DNA extraction and PCR analysis of hair samples

Each one of the hair samples were put into screw-cap sterile microtubes and incubated in 250 μ l of lysis buffer (10 Mm TrisCl, 0.1 MEDTA, 0.5% SDS + 20 μ g/ml pancreatic RNase - Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) for two hours at 37 °C. Proteinase K was added to a final concentration of 150 mg/ml and incubated at 56 °C overnight. Then, 200 μ l of supernatant were collected and stored at –80 °C. DNA was obtained using the UltraCleanBloodSpin kit (MoBio Laboratories, Carlsbad, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. The detection and quantification of *L. major* kDNA were performed by Real time PCR, as previously described (Francino et al., 2006; Belinchón-Lorenzo et al., 2013). PCR reactions were performed in a Step One Plus Real time PCR System (Applied Biosystems Laboratories, Foster City, CA, USA) in a final volume of 25 μ l (5 μ l of DNA + 20 μ l of Reaction Mix), containing 20 μ M of each primer (Leish1: 5'-AACTTTTCTGGTCTCCGGGTAG-3' and Leish2: 5'-ACCCCCAGTTTCCCGCC-3'), 10 μ M of TaqMan Probe (FAM-5'-AAAAATGGGTCAGAAAT-3'-non fluorescent quencher-MGB), and the Maxima Probe/ROX qPCR Master Mix (Fermentas GmbH Laboratories, St. Leon-Rot, Germany). The thermal cycling profile used was 50 °C for 2 min, 95 °C for 10 min, 40 cycles at 95 °C for 15 s and 60 °C for 1 min. Positive (DNA extracted from 55,000 *L. infantum* promastigotes MCAN/ES/1996/BCN150, zymodeme MON-1) and negative (DNA extracted from a healthy dog blood sample) controls were included in the assay. To detect and quantify *Leishmania* kDNA in the hair, a standard curve was carried out (Rutledge and Côté, 2003). To perform this curve the DNA from six quantities of *L. infantum* parasites (MCAN/ES/1996/BCN150, zymodeme MON-1) ranging from 15,360 to 15 (dilution factor \times 4) was extracted and analyzed together with the hair samples in triplicate. Samples were considered positive when the Ct of each one was lower than 35 (Applied Biosystems Application Note, 2006) and when the amplification was detected in all the replicates.

3. Results

The experimental infection led to the typical time course generation of dermal lesions detected in the ear at the inoculation

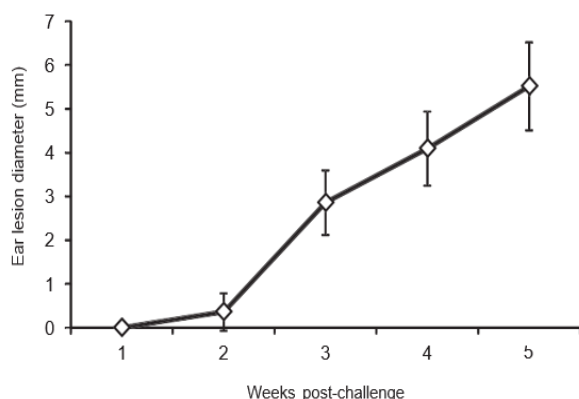


Fig. 1. Course of *Leishmania major* infection in BALB/c mice. Values represent the mean lesion diameter \pm SD.

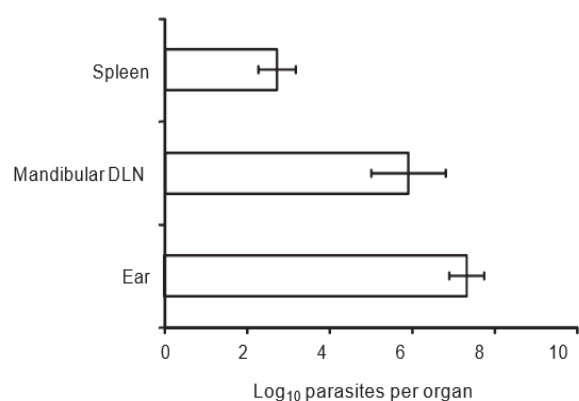


Fig. 2. Parasite burden after challenge. Five weeks after infection mice were euthanized and parasites in ear dermis, retromandibular draining lymph node (DLN) and in spleen were individually determined by a limit dilution assay. Results are expressed as the mean \pm SD of eight ears, four spleens and the mandibular draining lymph nodes from four mice.

site (Fig. 1) characterized by progressive erythema, swelling and ulceration. At week 5th post challenge the lesions reached a mean diameter of about 5 mm and animals were euthanized. The isolation and quantification of the parasite load done by limiting dilution (Fig. 2) indicated that the highest amount of amastigotes was present in the skin of the ear (mean of 2×10^7 parasites per lesion). Live parasites were also detected in the retromandibular DLN and in spleen although in lower amounts (mean of 1×10^6 parasites and mean of 520 parasites per organ, respectively). Uncontrolled *L. major* replication was correlated with the induction of a non-protective Th2 response, evidenced by the presence of dominant

IgG1 antibodies against parasite SLA antigen at week 5th post infection, reaching values between 2 and 3 times higher than IgG2a at the same timepoint (data not shown).

The implementation of the Real time PCR technique to hair samples in the course of the infection revealed, as reflected in Table 1, that parasitic kDNA was detected in the hair of all the infected mice. The incorporation of kDNA in the hair was progressive, being present close to the site of inoculation (ear) from the first week post challenge, and in healthy skin of a far zone (leg) starting from the third week. At the final time point (5th weeks post-infection) the kDNA was detected in the hair from both the injured ear and the healthy limbs of all the mice.

The quantification also allowed distinguishing various parasitic kDNA loads included over time in hairs from both ear and leg dermal areas (Table 1). In the ear hair a progressive increase of kDNA from the first week (mean of 0.13 estimated parasites) to the 5th week (mean of 205.77 estimated parasites) was observed. At the final timepoint all hair samples were PCR positive, being the kDNA load in ear more than 20 times higher than that found in healthy legs.

4. Discussion

It has been shown that hair is involved in the recognition, isolation and removal of foreign DNA sequences since parasite kDNA can be sequestered in the hair of *L. infantum* naturally infected dogs (Belinchón-Lorenzo et al., 2013). We have tested whether *L. major* kDNA could be also detected in the hair of experimentally infected mice. The *L. major*-*Mus musculus* cutaneous leishmaniasis model was used to examine, quantify and monitor the chronology of the DNA appearance in hair of both the inoculation site and in a distal body area, by Real time PCR. For this purpose, mice were intradermally inoculated in both ears with *L. major* V1 strain at a dose of 1000 metacyclic promastigote forms, that mimics a natural infection by *Phlebotomus papatasi* but without salivary gland sonicate (Belkaid et al., 1998).

The monitoring of experimental *L. major*-mice infection model is usually based on the employment of immunological techniques (Iborra et al., 2003; Iniesta et al., 2008) and also on parasite detection through microscope together with molecular techniques like conventional and Real time PCR (Buffet et al., 1995; Nicolas et al., 2002). The use of hair for PCR analyses has many advantages over other methods. It should be noticed that while the frequently blood sampling during infection could interfere with the experimental assay, the collection of hair samples is non-invasive and they are easy to store (Stolker et al., 2007).

Our results showed the presence of *L. major* kDNA in the hair close to the inoculation site as well as in body areas far from the infection site. The swelling size measured, previously described for this infection model (Ramírez et al., 2010), seems to be directly correlated to the detection of parasite DNA in ears, which progres-

Table 1
Real time PCR results of the analysis of hair from ear and leg of Balb/C mice infected by *Leishmania major*.

Timepoint post-challenge	Real time PCR results			
	Ear hair		Leg hair	
	No. positives (Ct < 35)	Mean of estimated no. of parasites ^a	No. positives (Ct < 35)	Mean of estimated no. of parasites ^a
Week 0	0	0	0	0
Week 1	1	0.13	0	0
Week 2	3	41.01	0	0
Week 3	4	102.93	3	2.04
Week 4	4	60.32	3	8.30
Week 5	4	205.77	4	8.48

^a Average quantity of the positive samples. Each parasite contains about of 10,000–20,000 copies of the minicircle kDNA

sively increased along the experimental assay. Therefore, it is most likely that the detection and the increase in parasite DNA could be a manifestation of the infection rate in the ear's injured skin.

In view of the data obtained we propose two potential mechanisms for the origin of foreign kDNA in the hair of infected animals. One of them would be the direct incorporation of the parasite DNA among keratinocytes of skin and hair at the site of inoculation. Along with this suggestion is the observation that *L. major* amastigotes are detected in all epidermal layers and even in hair follicles of patients with cutaneous leishmaniasis (Karram et al., 2012). This phenomenon is known as "transepidermal elimination", whose mechanism is still largely unknown. Once parasite DNA is incorporated among keratinocytes it could be passed upward into the formed hair during the keratinization process. It cannot be excluded, on the other hand, that kDNA is incorporated into the hair by migration from the bloodstream, since the detection of DNA from other pathogens in blood has been reported (Corless et al., 2001; Kami et al., 2001; Kim et al., 2008; Farias et al., 2010). We think that this last mechanism would explain the presence of *L. major* kDNA in the hair of non-injured skin areas.

In summary, we consider that these data add some insights to the understanding of the physiology of hair and the involvement of this highly specialized tissue in the excretion of foreign organic toxic metabolites, and therefore in the sequestration and removal of parasite DNA. Based on the results presented we believe that hair samples could have significant scientific value for a reliable and high sensitive diagnosis of an ongoing *L. major* infection course. It provides data about the chronology of the parasite spreading at the injured and uninjured sites that can be correlated in time with the rest of analysis conventionally used for monitoring the infection and disease progression.

5. Conclusions

In conclusion, these findings, together with those previously described regarding the detection of parasitic DNA in *L. infantum* naturally infected dogs (Belinchón-Lorenzo et al., 2013) or in wild reservoirs (unpublished results), reveals a largely unknown novel mechanism of hair physiology and represents a new diagnostic method applicable to the study of different types of both natural and experimental leishmaniasis. Since the mice model is usually employed for testing new treatments as well as vaccine strategies, the detection of foreign DNA in hair could improve and facilitate the analysis of the effectiveness of anti-*Leishmania* vaccines and drugs.

In addition, we consider that the methodology described in this work may be useful to detect DNA molecules not only in cutaneous and mucocutaneous forms of leishmaniasis but also in diseases coursing with skin manifestations in which transepithelial elimination of microorganisms has been reported (Wood et al., 1976; Welykyj et al., 1991; Goette and Odom, 1986). If so, hair samples could be used to diagnose and monitor the progressive spreading of infection and the manifestations of several infectious diseases.

Acknowledgments

We would like to acknowledge the outstanding technical assistance of Mr. Manuel Gómez Blázquez, Ms. María Vega and Ms. Laura Ramirez. The study was supported by grants from Ministerio de Ciencia e Innovación FIS P111/00095 and from the Instituto de Salud Carlos III within the Network of Tropical Diseases Research (RICET RD06/0021/0008), as well as from the research agreement SGTRI 112/06 (University of Extremadura, Spain). A CBMSO institutional grant from Fundación Ramón Areces is also acknowledged.

References

- Belinchón-Lorenzo, S., Iniesta, V., Parejo, J.C., Fernández-Cotrino, J., Muñoz-Madrid, R., Soto, M., Alonso, C., Gómez-Nieto, L.C., 2013. Detection of *Leishmania infantum* kinetoplast minicircle DNA by real time PCR in hair of dogs with leishmaniasis. *Veterinary Parasitology* 192, 43–50.
- Belkaid, Y., Kamhawi, S., Modi, G., Valenzuela, J., Noben-Trauth, N., Rowton, E., Ribeiro, J., Sacks, D.L., 1998. Development of a natural model of cutaneous leishmaniasis: powerful effects of vector saliva and saliva preexposure on the long-term outcome of *Leishmania major* infection in the mouse ear dermis. *Journal of Experimental Medicine* 188 (10), 1941–1953.
- Buffet, P.A., Sulahian, A., Garin, Y.J., Nassar, N., Derouin, F., 1995. Culture microtitration: a sensitive method for quantifying *Leishmania infantum* in tissues of infected mice. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 39 (9), 2167–2168.
- Cangussú, S.D., Souza, C.C., Campos, C.F., Vieira, L.Q., Afonso, L.C., Arantes, R.M., 2009. Histopathology of *Leishmania major* infection: revisiting *L. major* histopathology in the ear dermis infection model. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 104 (6), 918–922.
- Corless, C.E., Guiver, M., Borrow, R., Edwards-Jones, V., Fox, A.J., Kaczmarek, E.B., 2001. Simultaneous detection of *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae*, and *Streptococcus pneumoniae* in suspected cases of meningitis and septicemia using Real-time PCR. *Journal of Clinical Microbiology* 39 (4), 1553.
- Courret, N., Lang, T., Milon, G., Antoine, J.C., 2003. Intradermal inoculations of low doses of *Leishmania major* and *Leishmania amazonensis* metacyclic promastigotes induce different immunoparasitic processes and status of protection in BALB/c mice. *International Journal for Parasitology* 33 (12), 1373–1383.
- Farias, M.E.M., LaPointe, D.A., Atkinson, C.T., Czerwonka, C., Shrestha, R., Jarvi, S.I., 2010. Taqman Real-time PCR detects avipoxvirus DNA in blood of Hawaii amakihi (*Hemignathus virens*). *PLoS ONE* 5 (5), e10745.
- Francino, O., Altet, L., Sánchez-Robert, E., Rodríguez, A., Solano-Gallego, L., Alberola, J., Ferrer, L., Sánchez, A., Roura, X., 2006. Advantages of real-time PCR assay for diagnosis and monitoring of canine leishmaniasis. *Veterinary Parasitology* 137, 214–221.
- Goette, D.K., Odom, R.B., 1986. Transepithelial elimination of granulomas in cutaneous tuberculosis and sarcoidosis. *Journal of the American Academy of Dermatology* 14 (1), 126–128.
- Iborra, S., Soto, M., Carrión, J., Nieto, A., Fernández, E., Alonso, C., Requena, J.M., 2003. The *Leishmania infantum* acidic ribosomal protein P0 administered as a DNA vaccine confers protective immunity to *Leishmania major* infection in BALB/c mice. *Infection and Immunity* 71 (11), 6562–6572.
- Iborra, S., Carrión, J., Anderson, C., Alonso, C., Sacks, D., Soto, M., 2005. Vaccination with the *Leishmania infantum* acidic ribosomal P0 protein plus CpG oligodeoxynucleotides induces protection against cutaneous leishmaniasis in C57BL/6 mice but does not prevent progressive disease in BALB/c mice. *Infection and Immunity* 73 (9 Sep), 5582–5842.
- Iniesta, V., Corraliza, I., Carcelén, J., Gómez, L., Fernández-Cotrino, J., Parejo, J.C., Carrión, J., Soto, M., Alonso, C., Gómez-Nieto, L.C., 2008. *Leishmania major* infection in susceptible and resistant mice elicit a differential humoral response against a total soluble fraction and defined recombinant antigens of the parasite. *Parasitology Research* 102, 887–893.
- Kami, M., Fukui, T., Ogawa, S., Kazuyama, Y., Machida, U., Tanaka, Y., Kanda, Y., Kashima, T., Yamazaki, Y., Hamaki, T., Mori, S., Akiyama, H., Mutou, Y., Sakamaki, H., Osumi, K., Kimura, S., Hirai, H., 2001. Use of real-time PCR on blood samples for diagnosis of invasive aspergillosis. *Clinical Infectious Diseases* 33 (9), 1504–1512.
- Karram, S., Loya, A., Hamam, H., Habib, R.H., Khalifeh, I., 2012. Transepidermal elimination in cutaneous leishmaniasis: a multiregional study. *Journal of Cutaneous Pathology* 39 (4), 406–412.
- Kim, C.M., Blanco, L.B., Alhassan, A., Iseki, H., Yokoyama, N., Xuan, X., Igarashi, I., 2008. Diagnostic real-time PCR assay for the quantitative detection of *Theileria equi* from equine blood samples? *Veterinary Parasitology* 151 (2–4), 158–163.
- Kurej, I., Kobets, T., Havelková, H., Slapničková, M., Quan, L., Trtková, K., Gregov, I., Svobodová, M., Stassen, A.P., Hutson, A., Demant, P., Lipoldová, M., 2009. Distinct genetic control of parasite elimination, dissemination, and disease after *Leishmania major* infection. *Immunogenetics* 61 (9), 619–633.
- Mendez, S., Tabbara, K., Belkaid, Y., Bertholet, S., Verthelyi, D., Klinman, D., Seder, R.A., Sacks, D.L., 2003. Coinjection with CpG-containing immunostimulatory oligodeoxynucleotides reduces the pathogenicity of a live vaccine against cutaneous leishmaniasis but maintains its potency and durability. *Infection and Immunity* 71 (9), 5121–5129.
- Nicolas, L., Prina, E., Lang, T., Milon, G., 2002. Real-time PCR for detection and quantitation of *Leishmania* in mouse tissues. *Journal of Clinical Microbiology* 40 (5), 1666–1669.
- No authors listed, 2006. Amplification efficiency of TaqMan gene expression assays. Applied Biosystems Application note. http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb_marketing/documents/generaldocuments/cms_040377.pdf (accessed 21 March 2012).
- Ramirez, L., Iborra, S., Cortés, J., Bonay, P., Alonso, C., Barral-Netto, M., Soto, M., 2010. BALB/c mice vaccinated with *Leishmania major* ribosomal proteins extracts combined with CpG oligodeoxynucleotides become resistant to disease caused by a secondary parasite challenge. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 181690.
- Rodgers, M.R., Popper, S.J., Wirth, D.F., 1990. Amplification of kinetoplast DNA as a tool in the detection and diagnosis of *Leishmania*. *Experimental Parasitology* 71, 267–275.

- Rutledge, R.G., Côte, C., 2003. Mathematics of quantitative kinetic PCR and the application of standard curves. *Nucleic Acids Research* 31 (16), e93.
- Sacks, D.L., Hieny, S., Sher, A., 1985. Identification of cell surface carbohydrate and antigenic changes between non infective and infective developmental stages of *Leishmania major* promastigotes. *Journal of Immunology* 135 (1), 564–569.
- Sacks, D.L., Melby, P.C., 1998. Animal models for the analysis of immune responses to leishmaniasis. *Current Protocols in Immunology*, 19.2. 1–19.2.20.
- Sacks, D., Noben-Trauth, N., 2002. The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. *Nature Reviews Immunology* 2 (11), 845–858.

3.4. First detection of *Leishmania* kDNA in canine cerumen samples by qPCR. Vet. Parasitol. 228, (2016) 65-68.

Resumen

En la actualidad existe una gran controversia sobre cuál es la muestra ideal para el diagnóstico molecular de la leishmaniosis canina. La mayoría de las muestras comúnmente utilizadas se obtienen de manera invasiva, por ello es importante la búsqueda de nuevos métodos no invasivos de diagnóstico como alternativa. Recientemente hemos descrito que el pelo es capaz de acumular ADNk de *Leishmania*, siendo una muestra adecuada para el diagnóstico. Continuando con la búsqueda de métodos alternativos, realizamos un estudio para valorar el uso del cerumen canino, enfocado a la detección de ADNk del parásito en esta muestra mediante qPCR.

Para realizar el estudio, una población de 38 perros fue analizada por métodos inmunológicos (ELISA e IFI) y dividida en dos grupos, A (33 naturalmente infectados por *Leishmania infantum*) y B (5 perros sanos). De cada uno de los animales se tomó una muestra de cerumen mediante hisopos de algodón. Además se obtuvieron muestras de sangre, ganglio linfático y médula ósea, todas ellas de extracción invasiva. Todas las muestras fueron analizadas por qPCR. Nuestros resultados demostraron que el ADNk de *Leishmania* puede detectarse en muestras de cerumen de perros con leishmaniosis. La sensibilidad obtenida (90,9%) fue similar a la alcanzada en las muestras de médula ósea (88,5%) y muy superior a la de la sangre (57,6%), siendo la muestra más sensible el ganglio linfático (100%). Todas las muestras de los animales del grupo B fueron negativas.

MATERIALES, MÉTODOS Y RESULTADOS

Mediante este estudio se ha comprobado que se produce una excreción de ADN exógeno parasitario al cerumen, y que este ADN puede detectarse por qPCR con alta sensibilidad. Hasta la fecha, esta es la primera referencia que existe sobre la presencia de ADNk de *Leishmania* en el cerumen canino. Aunque la cantidad de ADNk detectada en el cerumen fue baja, consideramos que es suficiente para asegurar el diagnóstico de la enfermedad en la mayoría de los casos, ya que los resultados fueron confirmados con el resto de técnicas realizadas. El uso de cerumen para análisis moleculares supone numerosas ventajas: su extracción no es invasiva y no necesita condiciones especiales de almacenamiento y transporte, además de que proporciona una sensibilidad similar a la obtenida con muestras invasivas. Por todo ello proponemos el cerumen como una nueva muestra a tener en cuenta para el diagnóstico molecular de la leishmaniosis canina.



Contents lists available at ScienceDirect

Veterinary Parasitology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/vetpar

Short communication

First detection of *Leishmania* kDNA in canine cerumen samples by qPCR



Silvia Belinchón-Lorenzo^{a,*}, Juan Carlos Parejo^b, Virginia Iniesta^a,
 Javier Fernández-Cotrina^a, Rubén Muñoz-Madrid^a, Isabel Monroy^a, Victoria Baz^a,
 Adela Gómez-Luque^a, Francisco Javier Serrano-Aguilera^a, José Luis Barneto^a,
 Luis Carlos Gómez-Nieto^a

^a *LeishmanCeres Laboratory (GLP Compliance Certificated), Parasitology Unit, Veterinary Faculty, University of Extremadura, Avenida de la Universidad s/n, 10003 Cáceres, Spain*

^b *Genetics Unit, Veterinary Faculty, University of Extremadura, Avenida de la Universidad s/n, 10003 Cáceres, Spain*

ARTICLE INFO

Article history:

Received 19 February 2016

Received in revised form 15 April 2016

Accepted 16 May 2016

Keywords:

Cerumen

Leishmania infantum

Dog

Kinetoplast DNA (kDNA)

Real Time PCR

ABSTRACT

Nowadays, searching for alternative non-invasive methods for molecular diagnosis of canine visceral leishmaniasis is getting increasingly important. We previously described the presence of *Leishmania* kinetoplast DNA (kDNA) in canine hair; in this case we hypothesized whether foreign DNA might be present in cerumen of dogs with leishmaniasis, and be detected by Real time quantitative PCR (qPCR). A population of 38 dogs that lived in *Leishmania* endemic areas was divided in two groups: A (33 dogs with confirmed leishmaniasis by serological techniques) and B (5 healthy dogs). Blood, lymph node, bone marrow and cerumen samples from all animals were tested for the presence of parasite kDNA. Our method was 100% specific, and in dogs from group A, *Leishmania infantum* kDNA was detected and quantified in the 100% of lymph node samples, in 90.9% of cerumen samples, in 88.5% of the bone marrow samples and in 57.6% of the blood samples. The qPCR-cerumen is a new non-invasive method that shows a high potential for the diagnosis of zoonotic visceral leishmaniasis.

© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Leishmaniasis is one of the most important parasitic diseases, endemic in more than 88 countries affecting millions of people (Mutiso et al., 2013) and classified inside category 1 by the World Health Organization. Dogs have been implicated as the main reservoir of *Leishmania infantum* (*L. infantum*) due to its close relationship with humans (Dantas-Torres, 2007), and it is known that the disease affects dogs from all continents except Oceania (Dantas-Torres et al., 2012). For these reasons, it is important to design new diagnostic methods to early detect the canine infection.

Currently, the clinical diagnosis of canine leishmaniasis can be performed using different methods: parasite detection through microscope, several immunological tests and also molecular techniques such as conventional and Real Time PCR (qPCR) (Maia and Campino, 2008).

There is a controversy about which is the best sample for PCR analysis in canine leishmaniasis. Lymph node, bone marrow and skin biopsies provide high sensitivity results (Solano-Gallego et al., 2001; De Almeida Ferreira et al., 2012). Blood samples have lower sensitivity (Solano-Gallego et al., 2011), although the collection is easier (Manna et al., 2004). However, all these samples are obtained by invasive methods that cause animal distress and owner reluctance, so it is important to test non-invasive samples as an alternative. In this way, recent evidences suggest the potential use of conjunctival, oral, nasal, ear and vulvar swabs for sampling, taking cells from the mucosa or from other anatomical regions (De Almeida Ferreira et al., 2012; Ferreira et al., 2013; Hernández et al., 2015). Moreover, it has been previously reported that hair is a suitable sample for the molecular diagnosis of leishmaniasis in dogs, mice and wild mammals (Belinchón-Lorenzo et al., 2013; Iniesta et al., 2013; Muñoz-Madrid et al., 2013), as it does not cause any harm or stress to the animals, and the sensitivity of the technique is similar to that obtained using blood samples.

In this paper we have focused on the sampling of cerumen, since it has been described the presence of high parasite load in the skin

* Corresponding author.

E-mail addresses: sibelo@unex.es, leishmanceres@gmail.com, leishmanceres@unex.es (S. Belinchón-Lorenzo).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2016.05.021>

0304-4017/© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

of the canine ear compared to the skin of other corporal zones in dogs with leishmaniosis (Travi et al., 2001; Xavier et al., 2006).

Therefore, our objectives were to evaluate canine cerumen as a new non-invasive sample suitable to detect *L. infantum* kDNA by qPCR in dogs with leishmaniosis and compare the obtained results with those from the invasive samples generally employed for diagnosis: bone marrow, lymph node and blood.

2. Materials and methods

2.1. Animals

A population of 38 dogs from a leishmaniosis endemic area was selected based on the results for SLA ELISA and IFAT techniques, performed as described elsewhere (Belinchón-Lorenzo et al., 2013), and divided in two groups:

- Dogs with confirmed leishmaniosis (group A; n = 33). The majority of the dogs showed at least one of the typical clinical signs of the disease: lymphadenopathy, ocular (blepharitis, keratoconjunctivitis, etc.), cutaneous (alopecia, desquamation, ulcers, etc.) and general signs (apathy, weight loss, weakness, hyperthermia, etc.). Only one dog was asymptomatic.

- Healthy dogs (group B; n = 5). They did not present any clinical sign.

2.2. Sampling

Blood and cerumen samples from all dogs, 37 lymph node samples and 31 bone marrow samples were collected. Blood samples were obtained by fine-needle aspiration from cephalic vein and deposited in EDTA coated tubes. Lymph node biopsies were obtained by fine-needle aspiration and homogenized in 1 ml of sterile PBS. Bone marrow biopsies were obtained by sternal puncture and aspiration and included in EDTA coated tubes. Finally, a double tipped sterile cotton swab (previously treated 40 min with UV rays) was inserted into the ear of the dogs and swabbed against the surface of the vertical ear canal to obtain cerumen samples, cut in halves and introduced in a screw cap sterile microtube. Once processed, all samples were stored at -80°C until DNA extraction.

2.3. DNA extraction

One cotton tip with cerumen sample per dog was incubated in 250 μl of lysis buffer (10 mM TrisCl, 0.1 M EDTA, 0.5% SDS + 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ pancreatic RNase) for two hours at 37°C . Proteinase K was added to a final minimum concentration of 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ and incubated at 56°C overnight. For DNA extraction, 200 μl of supernatant obtained from processed cotton swabs, 100 μl of whole blood, 100 μl of homogenized lymph node biopsies and 50 μl of bone marrow were used. DNA from all samples was obtained using the UltraClean BloodSpin kit (MoBio Laboratories, Carlsbad, CA, USA) according to the manufacturer's instructions.

2.4. qPCR assays

Reactions were carried out in 96 wells PCR plates in a final volume of 20 μl (4 μl of DNA + 16 μl of Reaction Mix), containing 20 μM of each primer, 10 μM of TaqMan Probe, and the iTaq Universal Probes Supermix (Biorad Laboratories, Hercules, CA). Primers, probe and the thermal cycling profile used are described elsewhere (Francino et al., 2006). Each amplification run contained positive and negative controls. All qPCR analyses were performed in a Step One Plus Real Time PCR System (Applied Biosystems Laboratories, Foster City, CA, USA). A standard curve was carried out (Rutledge and Côté, 2003) using DNA extracted from six quantities

of *L. infantum* parasites (MCAN/ES/1996/BCN150, zymodeme MON-1) ranging from 50,000 to 0.5 (dilution factor $\times 10$). The threshold cycle (Ct) corresponding to the Y-intercept of each analysis (that is, the expected Ct value for the estimated quantity of 1 parasite) was used as cut-off, being positive those samples whose Ct values were \leq Y-intercept value of each assay.

2.5. Statistical analyses

Statistical analysis was performed using R version 3.2.3 (R Core Team, 2015). Relationships among diagnostic results were estimated by the non-parametric coefficient rho of Spearman (r) since data did not meet assumptions of normality. The p-values were adjusted by the method of Benjamini and Hochberg (1995) in order to control the false discovery rate due to the multiple comparisons. Corrected p-values < 0.05 were considered statistically significant.

3. Results

Table 1 shows the antibody levels (IFAT and ELISA), presence or absence of clinical signs and qPCR results of dogs from group A (with confirmed leishmaniosis) and B (healthy).

Dogs from group A were positive for both serological techniques with different intensity, as it is shown in Table 1. The percentages of appearance of the typical clinical signs of leishmaniosis in this group were: 81.8% for lymphadenopathy, 78.8% for cutaneous signs, 42.4% for ocular signs and 15.2% for systemic clinical signs.

All dogs from group B were negative by both IFAT and ELISA methods and did not show any clinical sign (Table 1).

Respect to the qPCR technique, the reliability of the results obtained was assessed by the R^2 coefficient data (from 0.996 to 0.999), slope (from -3.38 to -3.20) and the high efficiency reached (between 97.83% and 105.42%).

Regarding qPCR sensitivity, we could detect *Leishmania* kDNA in cerumen of 30 out of 33 dogs from group A (90.9%), higher to that obtained for bone marrow (88.5%, 23+/26). The highest sensitivity (100%, 32+/32) was obtained in lymph node and the lowest in blood samples (57.6%, 19+/33).

There were 12 dogs with negative result for blood-qPCR and with positive result for cerumen-qPCR, whereas there was only one dog (no. 31) positive to blood-qPCR and negative to cerumen-qPCR. The proportion of cases detected in cerumen was not significantly different from lymph node and bone marrow, but it was respect to blood samples ($p < 0.01$).

The highest quantities of parasites were obtained in bone marrow and lymph node (Table 1). Although the parasite load in cerumen samples was, in general, nearest to that obtained in blood and significantly different than lymph node and bone marrow, is worth to note that the quantity of kDNA detected in cerumen showed a better correlation with the parasite load present in target organs. Thus, most of dogs with a number of estimated parasites less than 10^3 in bone marrow and lymph node showed low amount of kDNA in cerumen (less than 20 parasites per swab) and the highest kDNA concentrations observed in bone marrow and/or lymph node corresponded to the highest quantities detected in cerumen.

On the other hand, the specificity of qPCR assays was the 100% applied to all kind of samples taken from healthy dogs of the group B (Table 1).

The statistical analysis showed a significant correlation between the antibody titers determined by both immunological tests and the concentration of *Leishmania* kDNA obtained by qPCR in all the samples ($p < 0.05$). Likewise, the presence of clinical signs and qPCR analyses were significantly correlated $p < 0.01$; being the lymphadenopathy highly correlated with the lymph node qPCR ($r = 0.65$; $p < 0.01$).

Table 1
Summary of clinical signs, immunological and qPCR results of dogs from group A (with leishmaniosis) and B (healthy).

GROUP	ANIMAL No.	CLINICAL SIGNS ^a	IMMUNOLOGICAL ANALYSES		qPCR ANALYSES ^d (Estimated mean quantity of parasites)			
			SLA IgG2 ELISA ^b (O.D.)	IFAT ^c (Titre)	Bone marrow	Lymph node	Blood	Cerumen
A	1	O,C	0.53	1/80	N	2.48	N	19.58
	2	-	0.534	1/80	553.44	5.87	N	6.44
	3	LN,C	0.946	1/320	476.94	684.96	N	15.57
	4	C	0.766	1/320	5.14	1.91	N	10.69
	5	LN,C	0.858	1/640	N	57.56	N	30.2
	6	LN,C	0.611	1/320	105.14	9.26 × 10 ³	N	39.67
	7	LN,C	0.798	1/320	2.94	4.02	N	7.6
	8	C	0.937	>1/640	N	1.39	N	1.9
	9	LN,C	0.997	>1/640	2.52	6.23	N	9.01
	10	LN,C	0.929	1/320	3.08 × 10 ⁶	1.70 × 10 ⁵	260.12	538.13
	11	LN,C	1.063	>1/640	3.23 × 10 ⁵	648.1	18.9	381.48
	12	LN,C,O	0.712	1/320	9.90 × 10 ⁴	7.83 × 10 ⁴	16.29	65.62
	13	LN,C,O	1.003	>1/640	3.30 × 10 ⁶	1.50 × 10 ⁶	528.03	510.06
	14	LN,C,O	0.987	1/640	1.81 × 10 ⁴	8.45 × 10 ⁴	17.69	19.5
	15	LN,C	1.063	>1/640	3.77 × 10 ⁵	9.02 × 10 ⁴	92.3	411.12
	16	LN,C,O	1.019	>1/640	4.53 × 10 ⁵	6.65 × 10 ⁵	N	455.38
	17	LN,C,O	0.95	1/640	822.28	948.22	N	339.69
	18	LN,C,O	0.977	>1/640	8.55 × 10 ⁴	6.52 × 10 ⁴	14.17	317.7
	19	G,LN,C,O	1.042	1/640	N.D.	3.81 × 10 ³	2.41	13.15
	20	LN	0.984	1/80	N.D.	N.D.	N	5.33
	21	G,LN,C,O	0.983	1/640	N.D.	1.51 × 10 ⁴	27.33	121.27
	22	LN,C,O	0.969	1/640	N.D.	1.49 × 10 ³	25.63	2.03
	23	LN	0.949	1/640	4.42 × 10 ⁵	9.98 × 10 ⁵	17.88	5.18 × 10 ³
	24	LN,C	0.957	1/640	1.98 × 10 ⁵	4.59 × 10 ⁵	30.49	48.65
	25	C,O	0.938	1/640	7.67 × 10 ⁵	1.53 × 10 ⁵	60.64	26.46
	26	G,C,LN	0.91	>1/640	5.53 × 10 ⁵	1.64 × 10 ⁵	2.24 × 10 ⁴	84.81
	27	C,LN,O	0.735	1/640	2.89 × 10 ⁷	1.86 × 10 ⁶	1.09 × 10 ³	360.42
	28	G,LN,O	0.922	1/640	N.D.	7.28 × 10 ⁵	258.68	35.26
	29	LN	0.767	1/320	209.02	523.94	3.5	1.77
	30	C	0.878	>1/640	2.04 × 10 ⁴	1.52 × 10 ⁴	29.6	51.75
	31	G, LN	0.918	>1/640	5.32 × 10 ⁴	1.51 × 10 ⁴	318.15	N
	32	LN,C,O	0.951	1/640	N.D.	1.60 × 10 ⁵	N	N
	33	LN	0.839	>1/640	N.D.	2.22 × 10 ⁵	N	N
% Sensitivity (X positives / Y total samples analyzed)					88.5% (23/26)	100% (32/32)	57.6% (19/33)	90.9% (30/33)
B	34	-	N (0.347)	N (<1/40)	N	N	N	N
	35	-	N (0.352)	N (<1/40)	N	N	N	N
	36	-	N (0.323)	N (<1/40)	N	N	N	N
	37	-	N (0.206)	N (<1/40)	N	N	N	N
	38	-	N (0.337)	N (<1/40)	N	N	N	N
	% Specificity (X negatives / Y total samples analyzed)					100% (5/5)	100% (5/5)	100% (5/5)

N: negative, N.D.: Not determined (absence of sample).

^a Clinical signs: O (ocular signs: blepharitis, keratoconjunctivitis, etc.), G (general signs: apathy, weight loss, weakness, hyperthermia, etc.), LN (lymphadenopathy), C (cutaneous signs: alopecia, desquamation, ulcers, etc.).

^b SLA IgG2 ELISA: positive O.D. ≥ 0.497 (set as the mean of O.D. values plus 3SD of a population of 30 healthy dogs).

^c IFAT: positive titre ≥ 1/80.

^d qPCR: Positive result is considered when Ct ≤ Y-intercept value of each assay (data not shown). Estimated quantity of parasites detected per 100 µl (bone marrow/blood/diluted lymph node biopsy) and per one cotton swab with cerumen sample.

It is important to highlight that the results obtained with cerumen-qPCR method were strongly correlated with those obtained with the qPCR analyses performed with bone marrow (r = 0.82, p < 0.01), lymph node (r = 0.70, p < 0.01) and in a lesser extent with the blood results (r = 0.54, p < 0.01). Significant coefficients (p < 0.01) were also found between the cerumen-qPCR and the presence of clinical signs (r = 0.53) and between this technique and the antibody titers tested by ELISA and IFAT (r = 0.50–0.45).

4. Discussion

The results obtained in this work showed that *Leishmania* kDNA can be isolated, detected and quantified by qPCR in cerumen samples obtained with cotton swabs from dogs with leishmaniosis. As far as we know, this is the first report of the presence of *Leishmania* kDNA in canine cerumen samples.

Cerumen has been investigated as a medium for the biological monitoring of xenobiotics (Guy et al., 1999), even pesticides and metals have been detected in human cerumen (Krishnan and Que Hee, 1992) and also Hepatitis B virus DNA (Parizad et al., 2011).

Because of the composition of the cerumen (desquamated epithelial cells along with the secretions from the sebaceous and ceruminous glands) (Cole, 2009), we suggest that *Leishmania* kDNA would be incorporated to this sample by transepidermal elimination. This phenomenon has been described for *Leishmania* parasites in all epidermal layers, hair follicles and eccrine sweat glands (Perrin et al., 1995; Espinel et al., 2004; Karram et al., 2012). However, it cannot be excluded the incorporation of *Leishmania* kDNA to cerumen by migration from the bloodstream, because ear and the ear canal itself receive blood from a high number of arteries (Steven-Sparks, 2012).

The cerumen-qPCR method showed a sensitivity similar to that obtained using lymph node samples, and higher to that obtained using bone marrow samples. According to many authors, blood was the sample with the lowest sensitivity (Leite et al., 2010; De Almeida Ferreira et al., 2012; Lombardo et al., 2012): 12 dogs that were negative in blood had positive results in cerumen-qPCR and, on the contrary, only one dog was positive to blood and negative to cerumen.

Although the parasite load obtained in cerumen is low, we consider that it is enough to ensure the diagnosis of the disease in most cases, as the results were confirmed with the rest of the methods performed.

Despite the DNA extracted from cerumen showed low yield (data not shown), we could detect *Leishmania* kDNA in cerumen of 30 out of 33 dogs with leishmaniasis, regardless of the presence of clinical lesions in the aural zone (as some dogs only showed lymphadenopathy), even in the asymptomatic dog. We think that the target used (kDNA) and the clinical condition of the canine population have improved the sensitivity of the technique, but it would be necessary to perform future studies to accurately determine the chronobiology of the *Leishmania* kDNA incorporation to cerumen during the course of the disease.

Finally, the use of cerumen for molecular analyses presents many advantages. The collection of this sample is harmless and easy, and there is no need of specific conditions for transport and storage (though we recommend to freeze samples when a long term storage is needed). So, we propose the cerumen as a new sample to take into account for the molecular diagnosis of canine leishmaniasis.

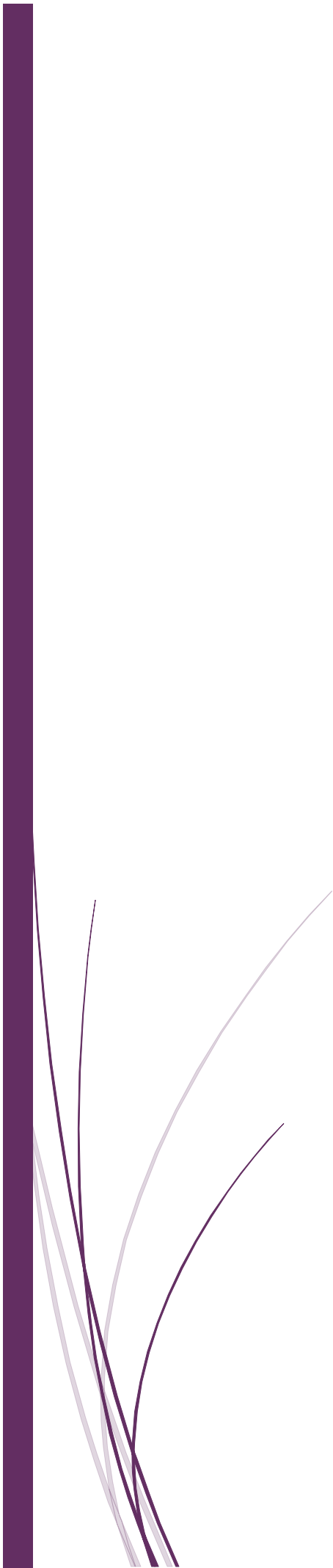
Acknowledgment

This investigation was partially supported by grants from the research agreement SGTRI 112/06 between LETI Laboratories S.L.U. and University of Extremadura (Spain).

References

- Belinchón-Lorenzo, S., Iniesta, V., Parejo, J.C., Fernández-Cotrino, J., Muñoz-Madrid, R., Soto, M., Alonso, C., Gómez Nieto, L.C., 2013. Detection of *Leishmania infantum* kinetoplast minicircle DNA by Real Time PCR in hair of dogs with leishmaniasis. *Vet. Parasitol.* 192, 43–50.
- Benjamini, Y., Hochberg, Y., 1995. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *J. R. Stat. Soc. Series B. Stat. Methodol.* 57, 289–300.
- Cole, L.K., 2009. Anatomy and physiology of the canine ear. *Vet. Dermatol.* 20 (5–6), 412–421.
- Dantas-Torres, F., Solano-Gallego, L., Baneth, G., Ribeiro, V.M., de Paiva-Cavalcanti, M., Otranto, D., 2012. Canine leishmaniasis in the Old and New Worlds: unveiled similarities and differences. *Trends Parasitol.* 28 (12), 531–538.
- Dantas-Torres, F., 2007. The role of dogs as reservoirs of *Leishmania* parasites: with emphasis on *Leishmania (Leishmania) infantum* and *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Vet. Parasitol.* 149, 139–146.
- De Almeida Ferreira, S., Leite, R.S., Ituassu, L.T., Almeida, G.G., Souza, D.M., Fujiwara, R.T., Andrade, A.S.R., Melo, M.N., 2012. Canine skin and conjunctival swab samples for the detection and quantification of *Leishmania infantum* DNA in an endemic urban area in Brazil. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 6 (4), e1596.
- Espinel, M.L., Martín-Jaramillo, J.A., Meléndez-Guerrero, B., Vázquez-Navarrete, S., 2004. Leishmaniasis with transepidermal elimination phenomenon. Description of two cases in patients with AIDS. *Actas Dermosifiliogr.* 95 (6), 390–393.
- Ferreira, S.d.A., Almeida, G.G., Silva, S.d.O., Vogas, G.P., Fujiwara, R.T., 2013. Nasal, oral and ear swabs for canine visceral leishmaniasis diagnosis: new practical approaches for detection of *Leishmania infantum* DNA. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 7 (4), e2150.
- Francino, O., Altet, L., Sánchez-Robert, E., Rodríguez, A., Solano-Gallego, L., Alberola, J., Ferrer, L., Sánchez, A., Roura, X., 2006. Advantages of real-time PCR assay for diagnosis and monitoring of canine leishmaniasis. *Vet. Parasitol.* 137, 214–221.
- Guy, R.H., Hostýnek, J.J., Hinz, R.S., Lorence, C.R., 1999. Metals and the skin. In: *Topical Effects and Systemic Absorption*. Marcel Dekker Inc., New York, USA, pp. 448.
- Hernández, L., Montoya, A., Checa, R., Dado, D., Gálvez, R., Otranto, D., Latrofa, M.S., Baneth, G., Miró, G., 2015. Course of experimental infection of canine leishmaniasis: follow-up and utility of noninvasive diagnostic techniques. *Vet. Parasitol.* 207, 149–155.
- Iniesta, V., Belinchón-Lorenzo, S., Soto, M., Fernández-Cotrino, J., Muñoz-Madrid, R., Monroy, I., Baz, V., Gómez-Luque, A., Parejo, J.C., Alonso, C., Gómez Nieto, L.C., 2013. Detection and chronology of parasitic kinetoplast DNA presence in hair of experimental *Leishmania major* infected BALB/c mice by Real Time PCR. *Acta Trop.* 128, 468–472.
- Karram, S., Loya, A., Hamam, H., Habib, R.H., Khalifeh, I., 2012. Transepidermal elimination in cutaneous leishmaniasis: a multiregional study. *J. Cutan. Pathol.* 39 (4), 406–412.
- Krishnan, U., Que Hee, S.S., 1992. Ear wax: a new biological monitoring medium for metals? *Bull. Environ. Contam Toxicol.* 48 (4), 481–486.
- Leite, R.S., Ferreira Sde, A., Ituassu, L.T., de Melo, M.N., de Andrade, A.S., 2010. PCR diagnosis of visceral leishmaniasis in asymptomatic dogs using conjunctival swab samples. *Vet. Parasitol.* 170, 201–206.
- Lombardo, G., Pennisi, M.G., Lupo, T., Miglizzo, A., Capri, A., Solano-Gallego, L., 2012. Detection of *Leishmania infantum* DNA by real-time PCR in canine oral and conjunctival swabs and comparison with other diagnostic techniques. *Vet. Parasitol.* 184 (1), 10–17.
- Maia, C., Campino, L., 2008. Methods for diagnosis of canine leishmaniasis and immune response to infection. *Vet. Parasitol.* 158 (4), 274–287.
- Manna, L., Vitale, F., Reale, S., Caracappa, S., Pavone, L.M., Della Morte, R., Cringoli, G., 2004. Comparison of different tissue sampling for PCR-based diagnosis and follow up of canine visceral leishmaniasis. *Vet. Parasitol.* 125, 251–262.
- Muñoz-Madrid, R., Belinchón-Lorenzo, S., Iniesta, V., Fernández-Cotrino, J., Parejo, J.C., Serrano, F., Monroy, I., Baz, V., Gómez-Luque, A., Gómez Nieto, L.C., 2013. First detection of *Leishmania infantum* kinetoplast DNA in hair of wild mammals: application of qPCR method to determine potential parasite reservoirs. *Acta Trop.* 180, 706–709.
- Mutiso, J.M., Macharia, J.C., Gicheru, M.M., Ozwara, H., 2013. Immunology of leishmaniasis. *Sci. Parasitol.* 14 (2), 51–61.
- Parizad, E.G., Kalani, M.T., Parizad, E.G., Andi, S.A.A., Matin, H.G., 2011. The study of cerumen hepatitis B infection in chronic hepatitis B patients by Real-Time PCR. *IJORL* 23 (2), 29–36.
- Perrin, C., Taillan, B., Hofman, P., Mondain, V., Lefichoux, Y., Michiels, J.F., 1995. Atypical cutaneous histological features of visceral leishmaniasis in acquired immunodeficiency syndrome. *Am. J. Dermatopathol.* 17 (2), 145–150.
- R Core Team, 2015. R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, URL <https://www.R-project.org/>.
- Rutledge, R.G., Côte, C., 2003. Mathematics of quantitative kinetic PCR and the application of standard curves. *Nucleic Acids Res.* 31 (16), e93.
- Solano-Gallego, L., Morell, P., Arboix, M., Alberola, J., Ferrer, L., 2001. 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.* 39 (2), 560–563.
- Solano-Gallego, L., Miró, G., Koutinas, A., Cardoso, L., Pennisi, M.G., Ferrer, L., Bourdeau, P., Oliva, G., Baneth, G., 2011. LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniasis. *Parasit. Vectors.* 4, 86.
- Steven-Sparks C.K., 2012. Anatomical studies of canine vascular and ligamentous ear structures with relevance to acute-onset deafness. PhD dissertation.
- Travi, B.L., Tabares, C.J., Cadena, H., Ferro, C., Osorio, Y., 2001. Canine visceral leishmaniasis in Colombia: relationship between clinical and parasitologic status and infectivity for sand flies. *Am. J. Trop. Med Hyg.* 64 (3–4), 119–124.
- Xavier, S.C., de Andrade, H.M., Monte, S.J., Chiarelli, I.M., Lima, W.G., Michalick, M.S., Tafuri, W.L., Tafuri, W.L., 2006. Comparison of paraffin-embedded skin biopsies from different anatomical regions as sampling methods for detection of *Leishmania* infection in dogs using histological, immunohistochemical and PCR methods. *BMC Vet. Res.* 8, 2–17.

4. DISCUSIÓN



4. DISCUSIÓN

Mediante la realización de este trabajo hemos conseguido detectar por primera vez, utilizando el método molecular qPCR, material genético parasitario (ADNk) de la especie *Leishmania infantum* en el pelo y queratinocitos de perros con leishmaniosis confirmada y en el pelo de diversas especies de mamíferos silvestres. Además, también detectamos ADNk del parásito *Leishmania major* en el pelo de ratones BALB/c infectados experimentalmente. Por último, el ADNk de *L. infantum* también pudo detectarse en el cerumen de perros con leishmaniosis diagnosticada.

El pelo es una muestra que puede ser fácilmente recogida, transportada y almacenada. Su obtención es no invasiva y por consiguiente no causa daño ni dolor a los animales (Gratacós-Cubarsí *et al.*, 2006). Para seleccionar el pelo como posible candidato para el diagnóstico molecular de la leishmaniosis nos basamos en descripciones previas sobre la capacidad innata de este anejo cutáneo de acumular y excretar sustancias extrañas al organismo y en las propiedades de los queratinocitos, principales componentes del pelo.

Numerosos estudios han demostrado la incorporación de sustancias exógenas y tóxicos medioambientales en el pelo. En humanos se ha detectado la presencia de trazas de metales (Agusa *et al.*, 2005; Kim y Kim, 2011), drogas (Forman *et al.*, 1992; Musshoff y Madea, 2006), medicamentos y residuos del tabaco (Uematsu, 1993; Takiguchi *et al.*, 2001). También se han realizado análisis del pelo de numerosas especies animales, habiéndose detectado medicamentos veterinarios en bovinos, caballos y cerdos (Gratacós-Cubarsí *et al.*, 2006; Gratacós-Cubarsí *et al.*, 2007), drogas en ratones (Stout *et al.*, 2000) y trazas de metales en bovinos e incluso en focas (Patra *et al.*, 2007; Wenzel *et al.*, 1993).

DISCUSIÓN

En la práctica veterinaria el pelo de los animales se considera muy útil a la hora de detectar sustancias no autorizadas (como agentes potenciadores del crecimiento), ya que los compuestos que se incorporan en la rígida estructura capilar permanecen retenidos mucho más tiempo que en cualquier otro tejido debido a su baja actividad metabólica (Gratacós-Cubarsí *et al.*, 2006), incluso mucho tiempo después de que el animal haya sido tratado con estas sustancias (Stolker *et al.*, 2007).

Se han propuesto varios mecanismos para explicar cómo se acumulan todas estas sustancias en el pelo (Henderson, 1993). En primer lugar, por difusión pasiva desde el torrente sanguíneo a las células del pelo durante su formación. Este mecanismo tiene mucho sentido, ya que la base del folículo está rodeada de una densa red de capilares (Gratacós-Cubarsí *et al.*, 2006). En segundo lugar, las sustancias exógenas pueden acumularse en el pelo a través de las secreciones de las glándulas apocrinas una vez que el pelo se ha formado. Por último, los contaminantes medioambientales podrían incorporarse al pelo una vez que éste ha emergido al exterior desde la piel. A pesar de todas estas hipótesis, el proceso real aún no se conoce.

Los queratinocitos, principales componentes del pelo (Gratacós-Cubarsí *et al.*, 2006), pueden secretar citoquinas y participar en la respuesta inmune innata y adquirida frente a los parásitos (Scott *et al.*, 2001b; Pivarsci *et al.*, 2005; Girolomoni *et al.*, 2006). Además, en estas células se localizan receptores de inmunoglobulinas (Cauza *et al.*, 2005), y pueden expresar al menos siete miembros de los receptores de superficie tipo Toll o TLRs, proteínas que forman parte del sistema inmune innato (Pivarsci *et al.*, 2005), participando de manera activa en la inmunidad frente a los patógenos. Gracias a estos receptores los

queratinocitos pueden mediar en el reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs), moléculas muy conservadas presentes en los microorganismos, y ser capaces de identificar una amplia variedad de patógenos (Pivarsci *et al.*, 2005). Los queratinocitos producen además péptidos antimicrobianos, fundamentales para los mecanismos de defensa de la epidermis del hospedador (Pivarsci *et al.*, 2005; Nestlé *et al.*, 2009).

En cuanto a la relación entre los TLRs y la leishmaniosis, en estudios experimentales se ha demostrado que los TLR-2, 4 y 9 participan en la respuesta inmunológica frente a *Leishmania* (Díaz *et al.*, 2014). Otros estudios confirman la importancia de estos receptores en el inicio de la patogénesis de la enfermedad, así como en la resistencia o susceptibilidad en modelos con ratones y cultivos celulares (Tuon *et al.*, 2008). Sin embargo, aún no se conoce en profundidad el papel de los TLRs en la Lcan, aunque en un estudio reciente se detectaron altos niveles de TLR-2 en lesiones cutáneas de perros con leishmaniosis en comparación con zonas de piel sana de animales no infectados (Esteve *et al.*, 2015).

En resumen, los queratinocitos epidérmicos pueden ser considerados como unas potentes células inmunitarias capaces de inducir una respuesta inmune innata y adaptativa.

Las propiedades de los queratinocitos junto con la capacidad del pelo de acumular materiales exógenos descrita anteriormente nos llevaron a pensar en que el ADNk de *Leishmania* podría incorporarse al pelo y ser detectado mediante el método molecular qPCR.

DISCUSIÓN

Una vez elegida la muestra, el primer paso para desarrollar el método analítico pelo-qPCR fue extraer el ADN del pelo. Esta matriz contiene cantidades muy bajas de ADN endógeno (Vigilant, 1999); sin embargo, se ha podido extraer con éxito ADN mitocondrial, presente en mayor número de copias (McNevin *et al.*, 2005).

El pelo se genera a partir del folículo piloso durante el proceso denominado queratinización, el cual implica la división de los queratinocitos, y posteriormente la síntesis de grandes cantidades de la proteína queratina (Bengtsson *et al.*, 2012). Por ello, para poder extraer ADN a partir de muestras de pelo es necesario realizar una digestión previa de la queratina. La mayoría de los protocolos de extracción recomienda una digestión de al menos 8 horas a 56°C en presencia de SDS (detergente utilizado para lisar células) y proteinasa K (proteasa sérica capaz de digerir la queratina). Según algunos autores también debe utilizarse un agente reductor para romper los puentes disulfuro que se forman entre los polipéptidos (McNevin *et al.*, 2005), aunque otros afirman que este reactivo reduce de manera significativa la cantidad de ADN extraído (Kalbe *et al.*, 1988). Según lo descrito por McNevin *et al.* (2005), para extraer con éxito ADN del pelo, la solución de lisis utilizada para la digestión previa debe contener un tampón con pH de entre 7,5 y 9, un detergente, una sal, un agente quelante y una proteinasa. En nuestro caso, utilizamos todos esos componentes para estandarizar nuestra solución de lisis para extraer ADN del pelo. Estos reactivos fueron, siguiendo el orden descrito anteriormente, tampón Tris-HCl con pH 8, SDS, NaCl, EDTA y proteinasa K. El uso de la solución de lisis nos permitió obtener un sobrenadante a partir del cual se realizó una extracción satisfactoria del ADN del pelo de las distintas especies estudiadas con un kit comercial, confirmada por

los resultados de qPCR, a pesar de que la cantidad de ADN endógeno obtenida fue pobre, en concordancia con lo descrito por *Vigilant, 1999*.

Para poder detectar la presencia de ADN de *Leishmania* en el pelo con total fiabilidad fue necesario utilizar un método molecular capaz de adaptarse a todo tipo de muestras y lo más sensible y específico posible, características que reúne la técnica qPCR (*Tsokana et al., 2014*). La eficacia del ensayo depende del método de extracción de ADN empleado, la muestra biológica analizada, el protocolo de PCR desarrollado o adaptado, del ADN diana seleccionado para la amplificación y del número de copias en el que se encuentre (*Baneth y Aroch, 2008*). Además esta técnica es altamente sensible cuando existen cargas parasitarias bajas (*Tsokana et al., 2014*).

En el desarrollo de nuestro estudio utilizamos el método qPCR validado en nuestro laboratorio, empleando reactivos basados en tecnología Taqman, los cuales proporcionan un incremento en la especificidad del ensayo (*Veras et al., 2014*). Como ADN diana se utilizó el material genético localizado en la mitocondria del parásito, llamado ADN del kinetoplasto o ADNk. Este material genético está formado por dos tipos de unidades, los maxicírculos y los minicírculos, estos últimos presentes en un número de 10.000–20.000 copias/parásito (*Rodgers, 1990*). El ADNk es uno de los más utilizados como diana en el diagnóstico molecular de la leishmaniosis, ya que la existencia de una región de unos 200 pares de bases conservada entre las diferentes especies de *Leishmania* del Viejo y Nuevo Mundo (*Reale et al., 1999*), unida al alto número de copias del minicírculo, aumentan de manera significativa la sensibilidad del método qPCR (*Reale et al., 1999; Francino et al., 2006; Rodríguez-Cortés et al., 2007; Veras et al., 2014*). Por último, el empleo de una recta patrón de cantidades

DISCUSIÓN

conocidas de ADN de *L. infantum* nos permitió realizar una cuantificación absoluta del ADNk presente en cada muestra.

Mediante el uso de esta técnica conseguimos detectar por primera vez y de forma sensible y específica ADNk de *Leishmania* en el pelo y queratinocitos de perros con leishmaniosis confirmada, en el pelo de diversas especies de mamíferos silvestres y en el de ratones infectados experimentalmente.

En el primer trabajo desarrollado en la tesis, enfocado en el análisis del pelo de perros con leishmaniosis, pudimos detectar y cuantificar por primera vez utilizando el método qPCR ADNk de *L. infantum* en el pelo de la oreja del 69,2% de la población estudiada (9 animales de 13). La mayoría de estos perros presentaba al menos uno de los típicos signos clínicos de la enfermedad, siendo sólo uno de ellos asintomático. La qPCR de ganglio confirmó la positividad de los animales, previamente diagnosticada mediante las técnicas inmunológicas ELISA e IFI.

En cuanto al análisis de las muestras de perros sanos, los resultados de qPCR fueron negativos para todos los tipos de muestra, incluyendo el pelo, lo cual indica que el método es 100% específico.

El análisis de las distintas secciones de un mismo pelo procedente de un animal con leishmaniosis también mostró la presencia de ADNk, indicando que el material genético del parásito se encuentra almacenado a lo largo de toda la longitud del pelo, siendo mayor la cantidad detectada en el tallo que el folículo piloso. Esto demuestra que no es necesario que la muestra de pelo contenga la raíz para poder realizar este tipo de análisis, pudiendo obtenerlo tanto cortándolo con tijeras como extrayéndolo con pinzas.

Además, se pudo detectar y cuantificar ADNk en el pelo de todas las zonas corporales estudiadas (cabeza, tronco y extremidades), incluso a partir de un único pelo.

También se observó que existe una correlación directa entre el número de pelos analizados y la cantidad de ADNk obtenida; aunque podría utilizarse únicamente un pelo para el análisis, lo recomendable sería analizar un número de entre 5 y 10 pelos para aumentar la sensibilidad del diagnóstico.

Por último, el análisis de los queratinocitos epidérmicos obtenidos mediante el raspado de la piel de uno de los animales con leishmaniosis mostró una alta concentración de ADNk parasitario.

En definitiva, según nuestros resultados, el pelo, además de poder acumular tóxicos y excretar sustancias extrañas (Gratacós-Cubarsí *et al.*, 2006), podría ser también un tejido especializado en el secuestro, acumulación y eliminación de ADN exógeno. La cantidad de pelo corporal que los perros pierden al año por kg (60-180g) (Scott *et al.*, 2001a), junto con el ADN parasitario que esta muestra puede eliminar, sugieren que el pelo tiene un papel importante en la detoxificación del organismo.

La presencia de ADNk parasitario en el pelo está probablemente conectado con la capacidad de los queratinocitos para reconocer una amplia variedad de patógenos (Pivarsci *et al.*, 2005), actuando como células fijadoras de moléculas que posteriormente eliminan del organismo. Esta función podría extenderse por toda la superficie epidérmica, al haberse detectado secuencias de ADN parasitario en el pelo de diferentes zonas corporales procedentes de los animales infectados.

DISCUSIÓN

La mayoría de los péptidos antimicrobianos derivados de los queratinocitos son capaces de matar o inactivar una amplia variedad de microorganismos, principalmente formando poros que permeabilizan las membranas microbianas (Pivarsci *et al.*, 2005), por lo que podrían causar la ruptura de los parásitos con la consiguiente liberación del ADNk.

Además, el hallazgo de ADNk de *L. infantum* en queratinocitos epidérmicos sugiere que se está llevando a cabo una eliminación transepidermal de este material genético exógeno en los animales enfermos, fenómeno previamente descrito para amastigotes de *Leishmania* a través de los queratinocitos de todas las capas epidérmicas, folículos pilosos y glándulas sudoríparas ecrinas (Perrin *et al.*, 1995; Espinel *et al.*, 2004; Karram *et al.*, 2012).

A pesar de que es recomendable realizar una digestión previa del pelo con proteinasa K (McNevin *et al.*, 2005), en nuestros ensayos comprobamos que el ADNk se podía extraer del pelo sin digerir la queratina. Los resultados positivos obtenidos del análisis del pelo sin digestión previa sugieren que parte del ADN parasitario se encuentra probablemente localizado entre los queratinocitos de la corteza y puede ser liberado tras simples lavados del pelo con una solución tamponada. Sin embargo, la cantidad de ADNk aumentó al tratar la muestra con proteinasa K, por lo que consideramos este paso necesario para obtener mayor sensibilidad en el método.

En vista de los datos obtenidos, proponemos dos hipótesis para explicar el origen del ADNk de *L. infantum* en el pelo de perros con leishmaniosis:

1) Incorporación directa del ADNk a los queratinocitos del folículo piloso. Tras la lisis de los parásitos por parte de las células del sistema inmune del

hospedador (Gupta *et al.*, 2013) se liberaría el ADNk parasitario, que sería reconocido y fijado por los queratinocitos, incorporándose finalmente al pelo en crecimiento secuestrado por estas células.

2) Migración desde el torrente sanguíneo. El ADNk circulante podría llegar a toda la superficie corporal vía sanguínea, incorporándose al pelo durante el proceso de formación del mismo.

En términos generales, nuestro hallazgo supone implicaciones importantes en el diagnóstico molecular de la Lcan. Actualmente existe una gran controversia sobre cuál es la mejor muestra para diagnosticar la enfermedad mediante PCR. Las biopsias de piel proporcionan alta sensibilidad y especificidad (Saridomichelakis y Koutinas, 2014), al igual que las de ganglio y médula (Maia *et al.*, 2009; De Almeida Ferreira *et al.*, 2012). Sin embargo, la toma de estas muestras es invasiva y traumática para los animales. Por otra parte, algunos autores consideran a la sangre como muestra de elección al ser más fácil de obtener, aunque proporciona una sensibilidad más baja comparada con las anteriormente descritas (Francino *et al.*, 2006). Nuestros resultados concuerdan con los de los autores citados, ya que obtuvimos la mayor sensibilidad al analizar muestras de ganglio y la menor con las muestras de sangre. Sin embargo, según De Andrade y Melo (2014), la muestra ideal para el diagnóstico molecular de la Lcan además de proporcionar una alta sensibilidad, debería ser no invasiva y de obtención rápida e indolora. Ya que el pelo reúne todas estas características, proponemos el análisis de esta muestra como un nuevo método de diagnóstico no invasivo y fiable para la Lcan. A pesar de que la cantidad más alta de ADN parasitario se detectó en el pelo de la zona isquial de uno de los animales con leishmaniosis, sugerimos que lo ideal sería analizar pelos de varias regiones

DISCUSIÓN

corporales para aumentar la sensibilidad del método, en concreto el pelo de la punta de la oreja, puesto que se ha demostrado que esta zona puede albergar gran cantidad de parásitos (Moura *et al.*, 2008).

Consideramos además, que esta técnica podría emplearse en estudios arqueoparasitológicos de restos humanos y animales, debido a que el pelo es un tejido muy resistente a la contaminación gracias a la naturaleza hidrófoba de las proteínas de la cutícula y a la presencia de queratina (Gilbert *et al.*, 2006). Así mismo, este método podría ser útil para detectar moléculas de ADN exógeno en otras enfermedades parasitarias, bacterianas o fúngicas, con posibilidad de ser aplicado en humanos.

Recientemente, varios grupos de investigación confirmaron nuestros hallazgos de la presencia de ADNk en el pelo de perros con leishmaniosis visceral tanto en Brasil como en España, concluyendo que el pelo es un importante marcador de la presencia de la infección en el perro y destacando la fácil obtención y almacenamiento de la muestra (Gonçalves *et al.*, 2016), además de indicar que es apropiado para monitorizar la eficacia del tratamiento con antimonio de meglumina (Corpas-López *et al.*, 2016).

En conclusión, los resultados sugieren una clara función metabólica (excretora) y defensiva (inmunológica) del pelo y los queratinocitos epidérmicos en esta infección parasitaria, y unas claras aplicaciones diagnósticas.

Una vez conseguimos detectar ADN parasitario en el pelo de un hospedador mamífero, se nos planteó la cuestión de que si esta técnica podría implementarse en la búsqueda de reservorios silvestres de la leishmaniosis visceral.

A pesar de que el perro doméstico es considerado como el hospedador definitivo y el principal reservorio de la leishmaniosis visceral causada por *L. infantum* (Ashford, 1996), la vigilancia de los hospedadores silvestres se considera una importante estrategia para controlar la enfermedad (OMS, 2010).

Actualmente se conocen multitud de especies de mamíferos silvestres que pueden ser hospedadores (o reservorios potenciales) de especies que provocan leishmaniosis dérmicas, mucosas y viscerales (Quinnell y Courtenay, 2009). Como ejemplo, en España se ha detectado ADN de *L. infantum* en cánidos y félicos silvestres, roedores, vivérridos, herpéstidos, mustélidos y lagomorfos (Sobrino *et al.*, 2008; Chitimia *et al.*, 2011, Millán *et al.*, 2011; Molina *et al.*, 2012, Del Río *et al.*, 2014). En todos estos casos se analizaron muestras invasivas, tales como sangre, bazo o hígado.

En general, el estudio de animales silvestres presenta muchas dificultades. La mayoría de veces se emplean dardos anestésicos o trampas para la captura de ejemplares vivos (Fowler, 2008). La recogida de muestras provoca estrés a los individuos, sobre todo cuando se requieren biopsias de ganglio linfático o de médula ósea. Otros problemas adicionales provienen de la conservación de las muestras en los ensayos de campo, con el inconveniente de la degradación de los tejidos, lo cual podría interferir con los resultados finales.

Por estas razones enfocamos el segundo trabajo de la presente tesis al análisis mediante qPCR de 68 muestras de pelo procedente de distintos mamíferos silvestres con el fin de detectar ADNk de *Leishmania*. Gracias a este estudio conseguimos detectar y cuantificar por primera vez material genético de *Leishmania* en el pelo de 6/9 zorros (*Vulpes vulpes*), 3/3 garduñas (*Martes foina*),

DISCUSIÓN

2/6 ratas (*Rattus norvegicus*), 2/49 lobos (*Canis lupus*) y 1/1 erizo (*Erinaceus europaeus*).

Las mayores cantidades de ADNk se hallaron en los zorros, siendo el número estimado de parásitos en el pelo de dos individuos (F1 y F2) de hasta 1000 veces mayor que la observada en otras especies.

El desarrollo de este método abre una nueva etapa en la búsqueda de reservorios de las especies de *Leishmania* de tropismo visceral (y posiblemente de las responsables de las formas cutáneas y mucocutáneas), ya que podría aplicarse en ensayos epidemiológicos proporcionando numerosas ventajas en cuanto a la metodología, pudiendo tomar muestras de un gran número de individuos en un corto periodo de tiempo. Las muestras de pelo se obtienen de manera no invasiva sin necesidad de anestesia. Por ello, podrían ser recogidas de los animales vivos mediante captura y liberación rápida, provocando menor estrés a los individuos que el que sufren cuando se utilizan las técnicas convencionales de muestreo. Además, como se indicó anteriormente, el pelo no necesita condiciones especiales de conservación.

Es de destacar que nuestro método ha sido aplicado con éxito en animales de la familia *Leporidae*, implicados recientemente como reservorios secundarios de *L. infantum* debido a un brote de leishmaniosis humana que está teniendo lugar en Madrid desde el año 2009 (Molina *et al.*, 2012). En un estudio llevado a cabo en 2015 se analizó el pelo de 17 conejos y 9 liebres, resultando positivos por qPCR 22 de los animales y confirmándose las ventajas de utilizar pelo en estudios de campo y su idoneidad para demostrar la presencia de *L. infantum* en lepóridos (García-Seco *et al.*, 2015).

Por último, esta metodología podría ser de utilidad diagnóstica en animales salvajes mantenidos en cautividad en zoológicos situados en zonas endémicas de leishmaniosis ya que, al considerarse en riesgo de infección, es recomendable confirmar la presencia del parásito en estos animales (Souza *et al.*, 2014).

Una cuestión muy importante surgida a raíz del análisis de las muestras de mamíferos silvestres fue evaluar la estabilidad del ADNk de *Leishmania* en el interior del pelo, hecho orientado especialmente al estudio de cadáveres encontrados en la naturaleza o al de especímenes disecados pertenecientes a museos u otras entidades. Para ello, varias muestras de uno de los zorros fueron sometidas a una simulación de distintas condiciones medioambientales extremas (congelación, desecación, putrefacción por contaminación fecal y acción de los rayos solares), y artificiales (tratamiento con sales de alumbre de potasio, utilizada en el curtido de pieles). Estas muestras se analizaron por qPCR, comparando sus resultados con muestras control del mismo animal (pelos que no habían recibido ningún tratamiento).

Previamente ya había sido demostrada la estabilidad del ADN endógeno en el interior de todos los tejidos queratinizados (Bengston *et al.*, 2012). Los datos obtenidos en este estudio sugieren que el pelo también puede proteger material genético exógeno (ADNk de *Leishmania*) frente a condiciones adversas.

Como era de esperar, ni el almacenamiento prolongado de las muestras de pelo en congelación (10 meses a -80°C), ni bajo condiciones de desecación (4 meses a 56°C) afectaron a los resultados de qPCR, ya que ambos procesos reducen de manera significativa el agua libre que requieren las enzimas y los microorganismos y por lo tanto proporcionan condiciones deseables para la conservación del ADN. Por la misma razón, el ADNk tampoco se degradó tras

DISCUSIÓN

72 horas en presencia de las sales de curtido, las cuales se emplean para evitar el crecimiento de microorganismos.

Cabe destacar que el ADNk también pudo extraerse y amplificarse mediante qPCR a partir de pelo expuesto 72 horas a la acción de rayos ultravioleta tipo C, descritos como la radiación solar más potente, dañina y desnaturalizante (Guerrero-Beltrán y Barbosa-Cánovas, 2004). Sin embargo, el ADNk no pudo detectarse a partir de las muestras sometidas a putrefacción, sugiriendo que el pelo contenido en coprolitos no es adecuado para la búsqueda de ADN, ya que las heces presentan las condiciones ideales para el crecimiento de bacterias que degradan los ácidos nucleicos como fuente de energía.

En definitiva, este estudio ha demostrado que el análisis molecular del pelo de mamíferos silvestres podría utilizarse como método diagnóstico de la leishmaniosis visceral para poder ampliar el conocimiento sobre los hospedadores y reservorios de la enfermedad, siendo además una muestra que protege al ADN parasitario de diferentes condiciones adversas.

Tras finalizar estos dos estudios, y para ampliar nuestros conocimientos sobre la capacidad del pelo para albergar ADNk en su interior, se analizó la cronología de la incorporación del ADNk al pelo durante el curso de una infección experimental por la especie de tropismo cutáneo *L. major* utilizando el modelo ratón BALB/c.

El uso del modelo ratón ha permitido profundizar en las características de la respuesta inmune durante la infección por *Leishmania*, ya que en los ratones BALB/c la respuesta Th2 generada conduce a una lesión severa con ulceración,

necrosis y una extensa reacción inflamatoria que produce el desarrollo de la enfermedad sistémica (Sacks y Noben-Trauth, 2002).

Para realizar el estudio, se utilizó el modelo animal de leishmaniosis cutánea *L. major*-*Mus musculus* con el fin de examinar, cuantificar y monitorizar mediante qPCR la cronología de la aparición del ADN parasitario en el pelo correspondiente al sitio de inoculación y en el de una zona corporal alejada del mismo. La duración del estudio fue de 35 días, tomándose cada semana entre 10 y 20 pelos de la oreja (sitio de inoculación) y de la pata (zona alejada). Los resultados de la qPCR del pelo obtenido de ambas zonas se compararon con los proporcionados por la técnica dilución límite y el tamaño del diámetro de la lesión de la oreja (sitio de inoculación).

Utilizando el método qPCR se pudo detectar ADNk de *L. major* en el pelo procedente del sitio de inoculación (oreja) de uno de los animales a partir de la 1ª semana post infección, aumentando gradualmente el número de animales positivos durante el transcurso del experimento. Por otro lado, en la zona alejada (pata), se comenzó a detectar a partir de la 3ª semana post infección. A punto final, todas las muestras fueron positivas, obteniéndose una cantidad de ADNk en la oreja 20 veces mayor que en la pata.

La infección experimental dio como resultado la generación de las típicas lesiones localizadas en el sitio de inoculación, caracterizadas por eritema, induración y ulceración. Parece ser que el tamaño de la inflamación descrito previamente para este modelo (Ramírez *et al.*, 2010) está directamente correlacionado con la detección de ADN parasitario en la oreja, la cual aumentó progresivamente durante el ensayo experimental. Por lo tanto, es probable que la detección y el incremento en la cantidad de ADN parasitario sea una manifestación del grado

DISCUSIÓN

de la infección en la piel lesionada de la oreja. Además, tras la necropsia de los animales, mediante la técnica de la dilución límite se comprobó que la cantidad más alta de parásitos se obtuvo en la piel de la oreja.

Estos resultados han reforzado nuestro punto de vista sobre las ventajas del uso del pelo para análisis moleculares. Al igual que se indicó anteriormente, proponemos dos mecanismos potenciales para explicar el origen del ADNk en el pelo de los animales infectados. El primero de ellos podría ser la incorporación directa del ADN parasitario en los queratinocitos de la piel y el pelo en el sitio de inoculación. Una vez que el ADN parasitario está incorporado entre los queratinocitos, podría pasar al pelo en formación durante el proceso de queratinización. El segundo mecanismo que proponemos es la incorporación del ADNk al pelo mediante la migración del mismo por el torrente sanguíneo, ya que así se podría explicar la presencia de ADNk de *L. major* en el pelo de las zonas de piel sana alejadas del sitio de inoculación.

Por último, nuestros análisis proporcionan datos sobre la cronología de la dispersión del ADN parasitario tanto en las zonas sanas como en las lesionadas, los cuales pueden correlacionarse en el tiempo con el resto de análisis utilizados generalmente para monitorizar la infección y la progresión de la enfermedad. La monitorización del modelo de infección experimental ratón se realiza como norma general empleando técnicas inmunológicas (Iborra *et al.*, 2003; Iñiesta *et al.*, 2008), además de detectar los parásitos mediante microscopía junto con técnicas moleculares como PCR convencional y a tiempo real (Buffet *et al.*, 1995; Nicolas *et al.*, 2002). Cabe destacar que las frecuentes tomas de sangre durante la infección podrían interferir con el ensayo experimental. Aunque ya se conocía un método sensible y específico de PCR a tiempo real capaz de detectar y

cuantificar ADN de *Leishmania* en tejidos de ratón (Nicolas *et al.*, 2002), las muestras empleadas se obtuvieron tras la necropsia.

Teniendo en cuenta todo lo anterior, podemos afirmar que el análisis por qPCR del pelo proporciona un gran valor científico para un diagnóstico fiable y sensible durante una infección en curso de *L. major*. Además, la detección de ADN exógeno en el pelo de ratón podría mejorar y facilitar el análisis de la efectividad de vacunas y fármacos anti-*Leishmania*, ya que este modelo es comúnmente utilizado para estudiar nuevos tratamientos y estrategias vacunales.

Como hemos comprobado, la toma de muestras no invasivas para realizar análisis moleculares supone una gran ventaja, ya que no se produce ningún daño a los animales y además, en el caso de animales de compañía, su obtención es aceptada por los propietarios. Los resultados de sensibilidad obtenidos en los tres estudios realizados utilizando el pelo nos llevó a la búsqueda de otros métodos alternativos no invasivos apropiados para el diagnóstico molecular de la leishmaniosis.

Al igual que sucede en el pelo, también se ha descrito que el cerumen es capaz de acumular sustancias exógenas tales como pesticidas y metales (Krishnan y Que Hee, 1992), además de haber sido utilizado como medio para la monitorización biológica de compuestos sintéticos (Guy *et al.*, 1999). También se ha descrito la presencia de ADN del virus de la hepatitis B en cerumen humano (Parizad *et al.*, 2011). Esta muestra se compone de los productos secretados por las glándulas sebáceas y ceruminosas localizadas en el canal auditivo (Beatrice *et al.*, 2009) y por células epiteliales queratinizadas descamadas, es decir, queratinocitos (Cole, 2009). La composición del cerumen junto con la

DISCUSIÓN

capacidad de acumular tóxicos y ADN descrita anteriormente nos llevaron a pensar en que el ADNk de *Leishmania* podría incorporarse al cerumen, bien por eliminación transepidérmica (Karram *et al.*, 2012) o por migración a través del torrente sanguíneo, ya que la oreja y el propio canal auditivo reciben sangre de un gran número de arterias (Steven-Sparks, 2012).

Hay que añadir que el cerumen es también una muestra muy sencilla de obtener utilizando hisopos de algodón y que, al igual que el pelo, no necesita condiciones especiales de almacenaje o conservación.

Por todas estas razones, el último trabajo incluido en la tesis fue diseñado para examinar la posible participación del cerumen de perros con leishmaniosis en el aislamiento y eliminación de secuencias exógenas de ADN del parásito, analizando las muestras por qPCR.

El cerumen se obtuvo frotando sobre la superficie del canal auditivo externo con un hisopo de algodón previamente tratado con rayos UV. Para extraer el ADN del cerumen se utilizó el mismo proceso empleado para las muestras de pelo, obteniéndose un sobrenadante a partir del cual se realizó una extracción satisfactoria del ADN con un kit comercial, confirmada por los resultados de qPCR.

Los resultados obtenidos en este trabajo mostraron que el ADNk de *Leishmania* pudo detectarse y cuantificarse en el cerumen de 30 de los 33 perros con leishmaniosis analizados, proporcionando la primera descripción de la presencia de ADN parasitario en muestras de cerumen canino. El ADNk se obtuvo independientemente de la presencia de lesiones cutáneas en la oreja, ya que algunos de los perros sólo mostraron linfadenopatía, detectándose incluso en un animal asintomático.

La utilización de hisopos de algodón como soporte para la toma de muestras está cobrando cada vez más importancia para el diagnóstico molecular de la Lcan (De Andrade y Melo, 2014). Numerosos autores han demostrado que el hisopo conjuntival es adecuado para el diagnóstico molecular de la leishmaniosis visceral en perros tanto sintomáticos como asintomáticos, e incluso en zonas no endémicas, mostrando una alta sensibilidad comparada con la obtenida para muestras invasivas (Strauss-Ayali *et al.*, 2004; Leite *et al.*, 2010; Lombardo *et al.*, 2012; De Almeida Ferreira *et al.*, 2012; Ferreira *et al.*, 2013; Geisweid *et al.*, 2013; Carvalho Ferreira *et al.*, 2014). Por el contrario, otros autores obtuvieron baja sensibilidad utilizando esta muestra, afirmando que sólo es adecuada en los casos en los que existan cargas parasitarias elevadas (Galletti *et al.*, 2011). Los hisopos orales también se han estudiado, proporcionando resultados contradictorios. Mientras que algunos autores obtuvieron baja sensibilidad analizando estas muestras (Lombardo *et al.*, 2012), otros describieron que el grado de positividad obtenido fue similar al alcanzado mediante muestras invasivas (Ferreira *et al.*, 2013). Estos mismos autores también estudiaron el uso de hisopos nasales y auriculares (obtenidos frotando con un hisopo la superficie interna de la oreja previamente desinfectada). Los resultados que proporcionaron los hisopos nasales fueron equivalentes a los obtenidos analizando muestras invasivas, sin embargo con los auriculares se obtuvo una baja sensibilidad, no siendo posible determinar la carga parasitaria en este tipo de muestra. Finalmente, en un estudio experimental de publicación reciente (Hernández *et al.*, 2015), los autores obtuvieron mayor carga parasitaria analizando hisopos de la mucosa de la vulva en comparación con la hallada en

DISCUSIÓN

hisopos orales y conjuntivales, pero menor que la obtenida analizando muestras invasivas.

Teniendo lo anterior en cuenta, creemos que los resultados contradictorios obtenidos analizando distintos tipos de muestras no invasivas obtenidas con hisopos son debidos a los diferentes protocolos de PCR utilizados (ADN diana, tipo de reactivos, etc.), así como a los distintos métodos de extracción de ADN empleados para cada uno de los ensayos.

Volviendo a nuestro estudio, el método cerumen-qPCR mostró una sensibilidad similar a la obtenida en el análisis de muestras de ganglio linfático y algo mayor a la proporcionada por las muestras de médula ósea. De acuerdo con las publicaciones de otros autores (Strauss-Ayali *et al.*, 2004; Leite *et al.*, 2010; De Almeida Ferreira *et al.*, 2012; Lombardo *et al.*, 2012), la menor sensibilidad la obtuvimos en el análisis de las muestras de sangre: 12 perros con resultados negativos en sangre mostraron resultados positivos para la qPCR de cerumen. La especificidad del método fue del 100% en todos los casos.

Aunque la carga parasitaria obtenida en el cerumen fue baja, la consideramos suficiente para asegurar el diagnóstico de la enfermedad en la mayoría de los casos, ya que los resultados fueron confirmados por el resto de las técnicas empleadas.

Creemos que la diana utilizada (ADNk) y la condición clínica de la población canina estudiada han mejorado la sensibilidad de la técnica, aunque es necesario realizar futuros estudios para determinar con fiabilidad la cronobiología de la incorporación del ADNk de *Leishmania* al cerumen en el transcurso de la enfermedad.

La utilización de cerumen para análisis de PCR presenta numerosas ventajas. La recogida de la muestra es no invasiva, rápida (apropiada para poblaciones de perros con un gran número de individuos) y muy sencilla, y que las muestras no necesitan condiciones especiales de transporte y conservación (aunque recomendamos congelarlas cuando sea necesario un almacenaje a largo plazo).

Por estas características proponemos el cerumen como una nueva muestra a tener en cuenta para el diagnóstico molecular de la Lcan.

Tras la realización de los cuatro trabajos incluidos en la tesis podemos afirmar que los queratinocitos epidérmicos, el pelo y el cerumen son muestras no invasivas apropiadas para el diagnóstico molecular de las leishmaniosis. Además, hemos contribuido a ampliar el conocimiento de la fisiología del pelo y del cerumen al comprobar que son capaces de retener material genético exógeno, en nuestro caso ADNk parasitario de *L. infantum* y *L. major*. Futuras investigaciones podrían ampliar el conocimiento sobre estas muestras y su aplicación en el diagnóstico de la leishmaniosis visceral. Por ejemplo, sería muy interesante comparar la sensibilidad del pelo frente al cerumen con estudios epidemiológicos a gran escala analizando un gran número de individuos, a ser posible con distintas características (sintomáticos y asintomáticos). Otra cuestión a tener en cuenta sería comprobar si la sensibilidad del método qPCR-pelo aumenta al utilizar pelo procedente de lesiones dérmicas frente al sano. Por último, confirmar la utilidad de nuestro método para el análisis de muestras humanas supondría un importante avance para el diagnóstico de la enfermedad en las zonas más afectadas.

A thick, dark purple vertical bar is positioned on the left side of the page. From the bottom of this bar, several thin, curved lines in shades of purple and grey extend upwards and outwards, creating an abstract, organic shape.

5. CONCLUSIONES

5. CONCLUSIONES

1. Los queratinocitos epidérmicos, el pelo y el cerumen son muestras no invasivas apropiadas para el diagnóstico molecular de las leishmaniosis.
2. Se ha demostrado la presencia del ADN del kinetoplasto de *Leishmania infantum* en el pelo y queratinocitos procedentes de perros con leishmaniosis y en el pelo de diversas especies de mamíferos silvestres.
3. Se ha determinado la cronología de la incorporación del ADN del kinetoplasto de *Leishmania major* al pelo mediante un modelo experimental con ratones BALB/c.
4. Se ha comprobado que el pelo, tras ser sometido a diferentes condiciones adversas, es capaz de proteger el ADN de *Leishmania* contenido en su interior.
5. Se ha demostrado la presencia del ADN del kinetoplasto de *Leishmania infantum* en el cerumen de perros con leishmaniosis.
6. El método qPCR desarrollado, enfocado al análisis del pelo y el cerumen de perros con leishmaniosis, proporciona resultados con una sensibilidad equiparable a la obtenida con muestras invasivas y con el 100% de especificidad.
7. La utilización de pelo y cerumen para el diagnóstico molecular de la leishmaniosis canina conlleva una serie de ventajas debido a su obtención no invasiva, sin necesidad de condiciones especiales de transporte, almacenaje o conservación.
8. Se ha ampliado el conocimiento de la fisiología de la piel y sus anejos al comprobar que son capaces de retener y eliminar material biológico exógeno: el ADN del kinetoplasto de *Leishmania infantum* y *Leishmania major*.

A thick, dark purple vertical bar is positioned on the left side of the page. From the bottom of this bar, several thin, curved lines in shades of purple and grey extend upwards and to the right, creating an abstract, organic shape.

6. BIBLIOGRAFÍA

6. BIBLIOGRAFÍA

- Abranches, P., Silva-Pereira, M.C.D., Conceição-Silva, F.M., Santos-Gomes, G.M., Janz, J.G., 1991. Canine leishmaniasis: pathological and ecological factors influencing transmission of infection. *J Parasitol* 77 (4), 557-561.
- Agusa, T., Kunito, T., Iwata, H., Monirith, I., Tana, T.S., Subramanian, A., Tanabe, S., 2005. Mercury contamination in human hair and fish from Cambodia: levels, specific accumulation and risk assessment. *Environ Pollut* 134 (1), 79-86.
- Akhoundi, M., Kuhls, K., Cannet, A., Votýpka, J., Marty, P., Delaunay, P., Sereno, D., 2016. A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of *Leishmania* Parasites and Sandflies. *PLoS Negl Trop Dis* 10 (3), e0004349.
- Altet, L., Francino, O., Solano-Gallego, L., Renier, C., Sánchez, A., 2002. Mapping and Sequencing of the Canine NRAMP1 Gene and Identification of Mutations in Leishmaniasis-Susceptible Dogs. *Infect Immun* 70 (6), 2763-2771.
- Alvar, J., Cañavate, C., Molina, R., Moreno, J., Nieto, J., 2004. Canine Leishmaniasis. *Adv Parasitol* 57, 1-88.
- Alvar, J., Velez, I.D., Bern, C., Herrero, M., Desjeux, P., Cano, J., Jannin, J., Den Boer, M., WHO Leishmaniasis Control Team, 2012. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PloS One* 7 (5), e35671.
- Amela, C., Suárez, B., Isidoro, B., Sierra, M.J., Santos, S., Simón, F., 2012. Evaluación del riesgo de transmisión de *Leishmania infantum* en España. Centro de Coordinación de Alertas y Emergencias sanitarias (CCAES). Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad.
- Antoine, J.C., Prina, E., Jouanne, C., Bongrand, P., 1990. Parasitophorous vacuoles of *Leishmania amazonensis*-infected macrophages maintain an acidic pH. *Infect Immun* 58 (3), 779-787.
- Antoniou, M., Gramiccia, M., Molina, R., Dvorak, V., Volf, P., 2013. The role of indigenous phlebotomine sandflies and mammals in the spreading of leishmaniasis agents in the Mediterranean region. *Euro Surveill* 18 (30), 20540.
- Arce, A., Estirado, A., Ordobas, M., Sevilla, S., García, N., Moratilla, N., De la Fuente, S., Martínez, A.M., Pérez, A.M., Aránguez, E., Iriso, A., Sevillano, O., Bernal, J., Vilas, F., 2013. Re-emergence of leishmaniasis in Spain: community outbreak in Madrid, Spain, 2009 to 2012. *Euro Surveill* 18 (30), 20546.
- Ashford, R.W., 1996. Leishmaniasis reservoirs and their significance in control. *Clin Dermatol* 14, 523-532.
- Ashford, R.W., 2000. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. *Int J Parasitol* 30, 1269-1281.

BIBLIOGRAFÍA

- Aslan, H., Oliveira, F., Meneses, C., Castrovinci, P., Gomes, R., Teixeira, C., Derenge, C.A., Orandle, M., Gradoni, L., Oliva, G., Fischer, L., Valenzuela, J.G., Kamhawi, S., 2016. New Insights Into the Transmissibility of *Leishmania infantum* From Dogs to Sand Flies: Experimental Vector-Transmission Reveals Persistent Parasite Depots at Bite Sites. *J Infect Dis* 213 (11), 1752-1761.
- Bailey, H., Bishop, W.J., 1959. Leishman-Donovan bodies and donovaniasis. Sir William Boog Leishman, 1865-1926; Charles Donovan, 1863-1951. *Brit J Vener Dis* 35 (1), 8-9.
- Baneth, G., 2006. Leishmaniasis. En: *Infectious Diseases of the Dog and Cat*. Editado por C.G. Greene. Elsevier.
- Baneth, G., Aroch, I., 2008. Canine leishmaniasis: a diagnostic and clinical challenge. *Vet J* 175 (1), 14-15.
- Baneth, G., Koutinas, A.F., Solano-Gallego, L., Bourdeau, P., Ferrer, L., 2008. Canine leishmaniasis - new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. *Trends Parasitol* 24 (7), 324-330.
- Bari, A.U., 2006. Chronology of cutaneous leishmaniasis: An overview of the history of the disease. *JPAD* 16, 24-27.
- Barrouin-Melo, S.M., Lorangeira, D.F., Trigo, J., Aguiar, P.H.P., Conrado-dos-Santos, W.L., Pontes-de-Carvalho, L., 2004. Comparison between Splenic and Lymph Node Aspirations as Sampling Methods for the Parasitological Detection of *Leishmania chagasi* Infection in Dogs. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 99 (2), 195-197.
- Bayoumi, A.H.M., Marks, R., 1980. Transepidermal elimination: studies with an animal model. *Br J Exp Path* 61, 560-566.
- Beatrice, F., Buccolo, S., Cavallo, R., 2009. Earwax, clinical practice. *Acta Otorhinolaryngol Ital* 29 (1), 1-20.
- Bengtsson, C.F., Olsen, M.E., Brandt, L.O., Bertelsen, M.F., Willerslev, E., Tobin, D.J., Wilson, A.S., Gilbert, M.T., 2012. DNA from keratinous tissue. Part I: hair and nail. *Ann Anat* 194 (1), 17-25.
- Bernard, Q., Jaulhac, B., Boulanger, N., 2015. Skin and arthropods: an effective interaction used by pathogens in vector-borne diseases. *Eur J Dermatol* 25 (1), 18-22.
- Besteiro, S., Williams, R.A., Coombs, G.H., Mottram, J.C., 2007. Protein turnover and differentiation in *Leishmania*. *Int J Parasitol* 37 (10), 1063-1075.
- Bogdan, C., Röllinghoff, M., 1998. The immune response to *Leishmania*: mechanisms of parasite control and evasion. *Int J Parasitol* 28, 121-134.
- Botet, J., Portús, M., 1996. La leishmaniosis en la España peninsular. Revisión histórico-bibliográfica (1912-1985). *Rev San Hig Púb* 67, 255-266.

- Bragulla, H., Budras, K.D., Mülling, C., Reese, S., König, H.E., 2005. Tegumento común (Integumentum commune). En: Anatomía de los animales domésticos. Texto y atlas en color. Tomo 2: órganos, sistema circulatorio y sistema nervioso. Editado por H.E. König y H.G. Liebich. Editorial Médica Panamericana.
- Buffet, P.A., Sulahian, A., Garin, J.F., Nassar, N., Derouin, F., 1995. Culture Microtitration: a Sensitive Method for Quantifying *Leishmania infantum* in Tissues of Infected Mice. Antimicrob Agents Chemother 39 (9), 2167-2168.
- Campino, L., Maia, C., 2013. The Role of Reservoirs: Canine Leishmaniasis. En: Drug Resistance in *Leishmania* Parasites. Consequences, Molecular Mechanisms and Possible Treatments. Editado por A. Ponte-Sucre, E. Díaz, y M. Padrón-Nieves. Springer, Londres.
- Carvalho Ferreira, A.L., Carregal, V.M., De Almeida Ferreira, S., Leite, R.S., De Andrade, A.S., 2014. Detection of *Leishmania infantum* in 4 different dog samples by real-time PCR and ITS-1 nested PCR. Diagn Microbiol Infect Dis 78 (4), 418-421.
- Castrillón-Rivera, L.E., Ramos, A.P., Desgarennes, C.P., 2008. La función inmunológica de la piel. Dermatología Rev Mex 52 (5), 211-224.
- Cauza, K., Hinterhuber, G., Dingelmaier-Hovorka, R., Brugger, K., Klosner, G., Horvat, R., Wolff, K., Foedinger, D., 2005. Expression of FcRn, the MHC Class I-Related Receptor for IgG, in Human Keratinocytes. J Invest Dermatol 124, 132-139.
- Chattopadhyaya, D.P., 2011. History of Science, Phylosophy and Culture in Indian Civilization. Volume XIII, Part 2: From Physiology and Chemistry to Biochemistry. Centre for Studies in Civilizations, Pearson Longman.
- Chitimia, L., Muñoz-García, C.I., Sánchez-Velasco, D., Lizana, V., Del Río, L., Murcia, L., Fisa, R., Riera, C., Gimenez-Font, P., Jimenez-Montalbán, P., Martínez-Ramírez, A., Meseguer-Meseguer, J.M., García-Bacete, I., Sánchez-Isarria, M.A., Sanchís-Monsonis, G., García-Martínez, J.D., Vicente, V., Segovia, M., Berriatua, E., 2011. Cryptic Leishmaniosis by *Leishmania infantum*, a feature of canines only? A study of natural infection in wild rabbits, humans and dogs in southeastern Spain. Vet Parasitol 181 (1), 12-16.
- Ciaramella, P., Corona, M., 2003. Canine Leishmaniasis: Clinical and Diagnostic Aspects. Comp Cont Educ Pract 25 (5), 358-369.
- Ciaramella, P., Oliva, G., De Luna, R., Gradoni, L., Ambrosio, R., Cortese, L., Scalone, A., Persechino, A., 1997. A retrospective clinical study of canine leishmaniasis in 150 dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. Vet Rec 141, 539-543.
- Cole, L.K., 2010. Anatomy and physiology of the canine ear. Vet Dermatol 21 (2), 221-231.
- Corpas-López, V., Merino-Espinosa, G., Acedo-Sánchez, C., Díaz-Sáez, V., Morillas-Márquez, F., Martín-Sánchez, J., 2016. Hair parasite load as a new biomarker for monitoring treatment response in canine leishmaniasis. Vet Parasitol 223, 20-25.

BIBLIOGRAFÍA

- Costa, J., 2004. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo real. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 22 (5), 299-305.
- Courtenay, O., Carson, C., Calvo-Bado, L., Garcez, L.M., Quinnell, R.J., 2014. Heterogeneities in *Leishmania infantum* infection: using skin parasite burdens to identify highly infectious dogs. *PLoS Negl Trop Dis* 8, e2583.
- Cox, F.E.G., 2002. History of Human Parasitology. *Clin Microbiol Rev* 15 (4), 595-612.
- Criado-Fornelio, A., Gutiérrez-García, L., Rodríguez-Caabeiro, F., Reus-García, E., Roldán-Soriano, M.A., Díaz-Sánchez, M.A., 2000. A parasitological survey of wild red foxes (*Vulpes vulpes*) from the province of Guadalajara, Spain. *Vet Parasitol* 92, 245-251.
- Cupolillo, E., Medina-Acosta, E., Noyes, H., Momen, H., Grimaldi, G.J., 2000. A revised classification for *Leishmania* and *Endotrypanum*. *Parasitol Today* 16 (4), 142-144.
- Dantas-Torres, F., 2007. The role of dogs as reservoirs of *Leishmania* parasites, with emphasis on *Leishmania (Leishmania) infantum* and *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Vet Parasitol* 149 (3-4), 139-146.
- Dantas-Torres, F., Solano-Gallego, L., Baneth, G., Ribeiro, V.M., De Paiva-Cavalcanti, M., Otranto, D., 2012. Canine leishmaniasis in the Old and New Worlds: unveiled similarities and differences. *Trends Parasitol* 28 (12), 531-538.
- De Almeida Ferreira, S., Leite, R.S., Ituassu, L.T., Almeida, G.G., Souza, D.M., Fujiwara, R.T., De Andrade, A.S., Melo, M.N., 2012. Canine skin and conjunctival swab samples for the detection and quantification of *Leishmania infantum* DNA in an endemic urban area in Brazil. *PLoS Negl Trop Dis* 6 (4), e1596.
- De Andrade, A.S.R., Melo, M.N., 2014. Non-invasive molecular diagnosis of canine visceral leishmaniasis using conjunctival swab samples. En: *Leishmaniasis-Trends in Epidemiology, Diagnosis and Treatment*. Editado por D.M. Claborn. InTech.
- Del Río, L., Chitimia, L., Cubas, A., Victoriano, I., De la Rúa, P., Gerrikagoitia, X., Barral, M., Muñoz-García, C.I., Goyena, E., García-Martínez, D., Fisa, R., Riera, C., Murcia, L., Segovia, M., Berriatua, E., 2014. Evidence for widespread *Leishmania infantum* infection among wild carnivores in *L. infantum* periendemic northern Spain. *Prev Vet Med* 113 (4), 430-435.
- Desjeux, P., 2004. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 27 (5), 305-318.
- Díaz, N.L., Zerpa, O., Tapia, F.J., 2014. Expresión de TLR2, 4, 9 y presencia de células tipo NK CD56 positivas en lesiones de pacientes con diferentes formas de clínicas de leishmaniasis cutánea americana. *B Malariol Salud Amb* 54 (1), 20-28.

- Díaz-Sáez, V., Merino-Espinosa, G., Morales-Yuste, M., Corpas-López, V., Pratlong, F., Morillas-Márquez, F., Martín-Sánchez, J., 2014. High rates of *Leishmania infantum* and *Trypanosoma abiasi* infection in wild rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) in sympatric and syntrophic conditions in an endemic canine leishmaniasis area: epidemiological consequences. *Vet Parasitol* 202 (3-4), 119-127.
- Duprey, Z.H., Steurer, F.J., Rooney, J.A., Kirchhoff, L.V., Jackson, J.E., Rowton, E.D., Schantz, P.M., 2006. Canine Visceral Leishmaniasis, United States and Canada, 2000–2003. *Emerg Infect Dis* 12 (3), 440-446.
- Ehrchen, J.M., Roebrock, K., Foell, D., Nippe, N., Von Stebut, E., Weiss, J.M., Munck, N.A., Viemann, D., Varga, G., Muller-Tidow, C., Schuberth, H.J., Roth, J., Sunderkotter, C., 2010. Keratinocytes determine Th1 immunity during early experimental leishmaniasis. *PLoS Pathog* 6 (4), e1000871.
- Espinel, M.L., Martín-Jaramillo, J.A., Meléndez-Guerrero, B., Vázquez-Navarrete, S., 2004. Leishmaniasis con fenómeno de eliminación transepidérmica. Descripción de dos casos en pacientes con sida. *Actas Dermosifiliogr* 95 (6), 390-393.
- Esteve, L.O., Saz, S.V., Hosein, S., Solano-Gallego, L., 2015. Histopathological findings and detection of Toll-like receptor 2 in cutaneous lesions of canine leishmaniosis. *Vet Parasitol* 209 (3-4), 157-163.
- Fernández-Bellon, H., Solano-Gallego, L., Bardagi, M., Alberola, J., Ramis, A., Ferrer, L., 2006. Immune response to *Leishmania infantum* in healthy horses in Spain. *Vet Parasitol* 135 (2), 181-185.
- Fernández-Cotrina, J., 2016. Estudios de inmunogenicidad, seguridad y eficacia de la Vacuna Q frente a la leishmaniosis canina. Departamento de Medicina y Sanidad animal. Facultad de Veterinaria, Universidad de Extremadura. Tesis Doctoral.
- Fernández-Cotrina, J., Iniesta, V., Belinchón-Lorenzo, S., Muñoz-Madrid, R., Serrano, F., Parejo, J.C., Gómez-Gordo, L., Soto, M., Alonso, C., Gómez-Nieto, L.C., 2013. Experimental model for reproduction of canine visceral leishmaniosis by *Leishmania infantum*. *Vet Parasitol* 192, 118-128.
- Ferreira, S.d.A., Ituassu, L.T., De Melo, M.N., De Andrade, A.S., 2008. Evaluation of the conjunctival swab for canine visceral leishmaniasis diagnosis by PCR-hybridization in Minas Gerais State, Brazil. *Vet Parasitol* 152 (3-4), 257-263.
- Ferreira, S.d.A., Almeida, G.G., Silva, S.O., Vogas, G.P., Fujiwara, R.T., De Andrade, A.S., Melo, M.N., 2013. Nasal, oral and ear swabs for canine visceral leishmaniasis diagnosis: new practical approaches for detection of *Leishmania infantum* DNA. *PLoS Negl Trop Dis* 7 (4), e2150.
- Fisa, R., Gállego, M., Castillejo, S., Aisa, M.J., Serra, T., Riera, C., Carrió, J., Gállego, J., Portús, M., 1999. Epidemiology of canine leishmaniosis in Catalonia (Spain). The example of the Priorat focus. *Vet Parasitol* 83, 87-97.

BIBLIOGRAFÍA

- Fisa, R., Riera, C., Gállego, M., Manubens, J., Portús, M., 2001. Nested PCR for diagnosis of canine leishmaniosis in peripheral blood, lymph node and bone marrow aspirates. *Vet Parasitol* 99, 105-111.
- Forman, R., Schneiderman, J., Klein, J., Graham, K., Greenwald, M., Koren, G., 1992. Accumulation of cocaine in maternal and fetal hair; the dose response curve. *Life Sci* 50, 1333-1341.
- Fowler, M.E., 2008. *Restraint and Handling of Wild and Domestic Animals*. John Wiley & Sons. Blackwell Publishing.
- Francino, O., Altet, L., Sánchez-Robert, E., Rodríguez, A., Solano-Gallego, L., Alberola, J., Ferrer, L., Sánchez, A., Roura, X., 2006. Advantages of real-time PCR assay for diagnosis and monitoring of canine leishmaniosis. *Vet Parasitol* 137 (3-4), 214-221.
- Franco, A.O., Davies, C.R., Mylne, A., Dedet, J.P., Gállego, M., Ballart, C., Gramiccia, M., Gradoni, L., Molina, R., Gálvez, R., Morillas-Márquez, F., Barón-López, S., Pires, C.A., Afonso, M.O., Ready, P.D., Cox, J., 2011. Predicting the distribution of canine leishmaniasis in western Europe based on environmental variables. *Parasitology* 138 (14), 1878-1891.
- Galletti, E., Bonilauri, P., Bardasi, L., Fontana, M.C., Ramini, M., Renzi, M., Dosa, G., Merialdi, G., 2011. Development of a minor groove binding probe based real-time PCR for the diagnosis and quantification of *Leishmania infantum* in dog specimens. *Res Vet Sci* 91 (2), 243-245.
- García, N., Moreno, I., Álvarez, J., De la Cruz, M.L., Navarro, A., Pérez-Sancho, M., García-Seco, T., Rodríguez-Bertos, A., Conty, M.L., Torano, A., Prieto, A., Domínguez, L., Domínguez, M., 2014. Evidence of *Leishmania infantum* infection in rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) in a natural area in Madrid, Spain. *Biomed Res Int* 2014, 318254.
- García-Río, I., Daudén, E., Ballester-Díez, M., Fraga, J., García-Díez, A., 2010. Leishmaniasis y nodulosis reumatoide en paciente con infección por el virus de la inmunodeficiencia humana. *Actas Dermosifiliogr* 101 (2), 164-167.
- García-Seco, T., De la Cruz, M.L., Ortega-García, M.V., Pérez-Sancho, M., Moreno, I., Domínguez, M., Prieto, A., Domínguez, L., García, N., 2015. Evaluation of hair samples as target to direct detection of *Leishmania spp.* in *Leporidae*. En: 6th Congress of European Microbiologists, Federation of European Microbiological Societies, The Netherlands, Maastricht. Comunicación en Póster.
- Gaskin, A.A., Schantz, P., Jackson, J., Birkenheuer, A., Tomlinson, L., Gramiccia, M., Levy, M., Steurer, F., Kollmar, E., Hegarty, B.C., Ahn, A., Breitschwerdt, E.B., 2002. Visceral Leishmaniasis in a New York Foxhound Kennel. *J Vet Intern Med* 16, 34-44.

- Geisweid, K., Weber, K., Sauter-Louis, C., Hartmann, K., 2013. Evaluation of a conjunctival swab polymerase chain reaction for the detection of *Leishmania infantum* in dogs in a non-endemic area. *Vet J* 198 (1), 187-192.
- Gil-Prieto, R., Walter, S., Alvar, J., De Miguel, A.G., 2011. Epidemiology of leishmaniasis in Spain based on hospitalization records (1997-2008). *Am J Trop Med Hyg* 85 (5), 820-825.
- Gilbert, M.T., Menez, L., Janaway, R.C., Tobin, D.J., Cooper, A., Wilson, A.S., 2006. Resistance of degraded hair shafts to contaminant DNA. *Forensic Sci Int* 156 (2-3), 208-212.
- Girolomoni, G., Tessari, G., Bos, J.D., 2006. The Skin as an Immunologic Organ. En: *Handbook of Systemic Autoimmune Diseases: Vol.V. The Skin in Systemic Autoimmune Diseases*. Editado por P. Sarzi-Puttini, A. Doria, G. Girolomoni, A. Khun y R. Asherson. Elsevier BV, Amsterdam.
- Gomes, Y.M., Paiva Cavalcanti, M., Lira, R.A., Abath, F.G., Alves, L.C., 2008. Diagnosis of canine visceral leishmaniasis: biotechnological advances. *Vet J* 175 (1), 45-52.
- Gómez-Nieto, L.C., 1990. Epidemiología y clínica de la leishmaniosis canina en Cáceres. Departamento de Medicina y Sanidad animal. Facultad de Veterinaria, Universidad de Extremadura. Tesis Doctoral.
- Gonçalves, R.D.S., Franke, C.R., Magalhaes-Junior, J.T., Souza, B.M., Solca, M.S., Lorangeira, D.F., Barrouin-Melo, S.M., 2016. Association between *Leishmania infantum* DNA in the hair of dogs and their infectiousness to *Lutzomyia longipalpis*. *Vet Parasitol* 232, 43-47.
- Gramiccia, M., Gradoni, L., 2005. The current status of zoonotic leishmaniasis and approaches to disease control. *Int J Parasitol* 35 (11-12), 1169-1180.
- Gratacós-Cubarsí, M., Castellari, M., Valero, A., García-Regueiro, J.A., 2006. Hair analysis for veterinary drug monitoring in livestock production. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 834 (1-2), 14-25.
- Gratacós-Cubarsí, M., García-Regueiro, J.A., Castellari, M., 2007. Assessment of enrofloxacin and ciprofloxacin accumulation in pig and calf hair by HPLC and fluorimetric detection. *Anal Bioanal Chem* 387 (6), 1991-1998.
- Guerrero-Beltrán, J.A., Barbosa-Cánovas, G.V., 2004. Advantages and Limitations on Processing Foods by UV Light. *Food Sci Technol Int* 10 (3), 137-147.
- Gupta, G., Oghumu, S., Satoskar, A.R., 2013. Mechanisms of immune evasion in leishmaniasis. *Adv Appl Microbiol* 82, 155-184.
- Guy, R.H., Hostýnek, J.J., Hinz, R.S., Lorence, C.R., 1999. *Metals and the Skin - Topical Effects and Systemic Absorption*. New York Basel.
- Handman, E., 1999. Cell Biology of *Leishmania*. *Adv Parasitol* 44, 1-39.

BIBLIOGRAFÍA

- Hantash, B.M., Bedi, V.P., Sudireddy, V., Struck, S.K., Herron, G.S., Chan, K.F., 2006. Laser-induced transepidermal elimination of dermal content by fractional photothermolysis. *J Biomed Opt* 11 (4), 041115.
- Henderson, G.L., 1993. Mechanisms of drug incorporation into hair. *Forensic Sci Int* 63, 19-29.
- Hernández, L., Montoya, A., Checa, R., Dado, D., Gálvez, R., Otranto, D., Latrofa, M.S., Baneth, G., Miró, G., 2015. Course of experimental infection of canine leishmaniasis: Follow-up and utility of noninvasive diagnostic techniques. *Vet Parasitol* 207 (1-2), 149-155.
- Herrador, Z., Gherasim, A., Jimenez, B.C., Granados, M., San Martín, J.V., Aparicio, P., 2015. Epidemiological changes in leishmaniasis in Spain according to hospitalization-based records, 1997-2011: raising awareness towards leishmaniasis in non-HIV patients. *PLoS Negl Trop Dis* 9 (3), e0003594.
- Hosein, S., Blake, D.P., Solano-Gallego, L., 2017. Insights on adaptive and innate immunity in canine leishmaniasis. *Parasitology* 144 (1), 95-115.
- Iborra, S., Soto, M., Carrión, J., Nieto, A., Fernández, E., Alonso, C., Requena, J.M., 2003. The *Leishmania infantum* Acidic Ribosomal Protein P0 Administered as a DNA Vaccine Confers Protective Immunity to *Leishmania major* Infection in BALB/c Mice. *Infect Immun* 71 (11), 6562-6572.
- Iniesta, L., Fernández-Barredo, S., Bulle, B., Gómez, M.T., Piarroux, R., Gállego, M., Alunda, J.M., Portús, M., 2002. Diagnostic Techniques To Detect Cryptic Leishmaniasis in Dogs. *Clin Vaccine Immunol* 9 (5), 1137-1141.
- Iniesta, V., Corraliza, I., Carcelén, J., Gordo, L.G., Fernández-Cotrina, J., Parejo, J.C., Carrión, J., Soto, M., Alonso, C., Nieto, C.G., 2008. *Leishmania major* infection in susceptible and resistant mice elicit a differential humoral response against a total soluble fraction and defined recombinant antigens of the parasite. *Parasitol Res* 102 (5), 887-893.
- Kalbe, J., Kuropka, R., Meyer-Stork, L.S., Sauter, S.L., Loss, P., Henco, K., Riesner, D., Höcker, H., Berndt, H., 1988. Isolation and characterization of high-molecular mass DNA from hair shafts. *Biol Chem* 369, 413-416.
- Karram, S., Loya, A., Hamam, H., Habib, R.H., Khalifeh, I., 2012. Transepidermal elimination in cutaneous leishmaniasis: a multiregional study. *J Cutan Pathol* 39 (4), 406-412.
- Killick-Kendrick, R., 1999. Biology of sand fly vectors of Mediterranean canine leishmaniasis. En: *Canine Leishmaniasis: an update*. Editado por R. Killick-Kendrick. Proceedings of the International Canine Leishmaniasis Forum. Hoechst Roussel Vet, Wiesbaden.

- Killick-Kendrick, R., Rioux, J.A., 2002. Mark-release-recapture of sand flies fed on leishmanial dogs: the natural lifecycle of *Leishmania infantum* in *Phlebotomus ariasi*. *Parassitologia* 44 (1-2), 67-71.
- Kim, M., Kim, K., 2011. Biomonitoring of lead and cadmium in the hair and fingernails of elderly Korean subjects. *Biol Trace Elem Res* 143 (2), 794-802.
- Krishnan, U., Que Hee, S.S., 1992. Ear Wax: A New Biological Monitoring Medium for Metals?. *Bull Environ Contam Toxicol* 48, 481-486.
- Lachaud, L., Marchergui-Hammami, S., Chabbert, E., Dereure, J., Dedet, J.P., Bastien, P., 2002. Comparison of Six PCR Methods Using Peripheral Blood for Detection of Canine Visceral Leishmaniasis. *J Clin Microbiol* 40 (1), 210-215.
- Lainson, R., Shaw, J.J., 1987. Evolution, classification and geographical distribution. En: *The leishmaniasis in biology and medicine. Volume I. Biology and epidemiology.* Editado por W. Peters y R. Killick-Kendrick. Academic Press, Londres.
- Leite, R.S., Ferreira S. de A., Ituassu, L.T., De Melo, M.N., De Andrade, A.S., 2010. PCR diagnosis of visceral leishmaniasis in asymptomatic dogs using conjunctival swab samples. *Vet Parasitol* 170 (3-4), 201-206.
- Léveillé, R., Partington, B.P., Biller, D.S., Miyabayashi, T., 1993. Complications after ultrasound guided biopsy of abdominal structures in dogs and cats: 246 cases (1984-1991). *J Am Vet Med Assoc* 203 (3), 413-415.
- Lewis, D.H., Peters, W., 1977. The resistance of intracellular *Leishmania* parasites to digestion by lysosomal enzymes. *Ann Trop Med Parasit* 71 (3), 295-312.
- Life Technologies, 2012. Real time PCR handbook.
http://find.lifetechnologies.com/Global/FileLib/qPCR/RealTimePCR_Handbook_Update_FLR.pdf.
- Lombardo, G., Pennisi, M.G., Lupo, T., Migliazzo, A., Capri, A., Solano-Gallego, L., 2012. Detection of *Leishmania infantum* DNA by real-time PCR in canine oral and conjunctival swabs and comparison with other diagnostic techniques. *Vet Parasitol* 184 (1), 10-17.
- Madeira, M.F., Figueiredo, F.B., Pinto, A.G., Nascimento, L.D., Furtado, M., Mouta-Confort, E., De Paula, C.C., Bogio, A., Gomes, M.C., Bessa, A.M., Passos, S.R., 2009. Parasitological diagnosis of canine visceral leishmaniasis: is intact skin a good target?. *Res Vet Sci* 87 (2), 260-262.
- Maia, C., Campino, L., 2008. Methods for diagnosis of canine leishmaniasis and immune response to infection. *Vet Parasitol* 158 (4), 274-287.
- Maia, C., Campino, L., 2011. Can domestic cats be considered reservoir hosts of zoonotic leishmaniasis?. *Trends Parasitol* 27 (8), 341-344.

BIBLIOGRAFÍA

- Maia, C., Cardoso, L., 2015. Spread of *Leishmania infantum* in Europe with dog travelling. *Vet Parasitol* 213 (1-2), 2-11.
- Maia, C., Ramada, J., Cristovão, J.M., Goncalves, L., Campino, L., 2009. Diagnosis of canine leishmaniasis: conventional and molecular techniques using different tissues. *Vet J* 179 (1), 142-144.
- Manna, L., Vitale, F., Reale, S., Caracappa, S., Pavone, L.M., Morte, R.D., Cringoli, G., Staiano, N., Gravino, A.E., 2004. Comparison of different tissue sampling for PCR-based diagnosis and follow-up of canine visceral leishmaniosis. *Vet Parasitol* 125 (3-4), 251-262.
- Manna, L., Reale, S., Vitale, F., Gravino, A.E., 2009. Evidence for a relationship between *Leishmania* load and clinical manifestations. *Res Vet Sci* 87 (1), 76-78.
- Maroli, M., Feliciangeli, M.D., Bichaud, L., Charrel, R.N., Gradoni, L., 2013. Phlebotomine sandflies and the spreading of leishmaniasis and other diseases of public health concern. *Med Vet Entomol* 27 (2), 123-147.
- Martínez, V., Quilez, J., Sánchez, A., Roura, X., Francino, O., Altet, L., 2011. Canine leishmaniasis: the key points for qPCR result interpretation. *Parasit Vectors* 4, 57.
- Mary, C., Faraut, F., Lascombe, L., Dumon, H., 2004. Quantification of *Leishmania infantum* DNA by a real-time PCR assay with high sensitivity. *J Clin Microbiol* 42 (11), 5249-5255.
- McNevin, D., Wilson-Wilde, L., Robertson, J., Kyd, J., Lennard, C., 2005. Short tandem repeat (STR) genotyping of keratinised hair. Part 1. Review of current status and knowledge gaps. *Forensic Sci Int* 153 (2-3), 237-246.
- Menn, B., Lorentz, S., Naucke, T.J., 2010. Imported and travelling dogs as carriers of canine vector-borne pathogens in Germany. *Parasit Vectors* 3, 34.
- Mettler, M., Grimm, F., Capelli, G., Camp, H., Deplazes, P., 2005. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assays, an immunofluorescent-antibody test, and two rapid tests (immunochromatographic-dipstick and gel tests) for serological diagnosis of symptomatic and asymptomatic *Leishmania* infections in dogs. *J Clin Microbiol* 43 (11), 5515-5519.
- Michalsky, É.M., Rocha, M.F., Da Rocha Lima, A.C.V.M., França-Silva, J.C., Pires, M.Q., Oliveira, F.S., Pacheco, R.S., Dos Santos, S.L., Barata, R.A., Romanha, A.J., Fortes-Dias, C.L., Dias, E.S., 2007. Infectivity of seropositive dogs, showing different clinical forms of leishmaniasis, to *Lutzomyia longipalpis* phlebotomine sand flies. *Vet Parasitol* 147 (1-2), 67-76.
- Millán, J., Zanet, S., Gomis, M., Trisciuglio, A., Negre, N., Ferroglio, E., 2011. An investigation into alternative reservoirs of canine leishmaniasis on the endemic island of Mallorca (Spain). *Transbound Emerg Dis* 58 (4), 352-357.

- Millán, J., Ferroglio, E., Solano-Gallego, L., 2014. Role of wildlife in the epidemiology of *Leishmania infantum* infection in Europe. *Parasitol Res* 113 (6), 2005-2014.
- Miranda, S., Roura, X., Picado, A., Ferrer, L., Ramis, A., 2008. Characterization of sex, age, and breed for a population of canine leishmaniasis diseased dogs. *Res Vet Sci* 85 (1), 35-38.
- Miró, G., Cardoso, L., Pennisi, M.G., Oliva, G., Baneth, G., 2008. Canine leishmaniasis-new concepts and insights on an expanding zoonosis: part two. *Trends Parasitol* 24 (8), 371-377.
- Mohebali, M., Taran, M., Zarei, Z., 2004. Rapid detection of *Leishmania infantum* infection in dogs: comparative study using an immunochromatographic dipstick rk39 test and direct agglutination. *Vet Parasitol* 121 (3-4), 239-245.
- Molina, R., Jiménez, M.I., Cruz, I., Iriso, A., Martín-Martín, I., Sevillano, O., Melero, S., Bernal, J., 2012. The hare (*Lepus granatensis*) as potential sylvatic reservoir of *Leishmania infantum* in Spain. *Vet Parasitol* 190 (1-2), 268-271.
- Molyneux, D.H., Ashford, R.W., 1983. The biology of *Trypanosoma* and *Leishmania*, parasites of man and domestic animals. Taylor and Francis, Londres.
- Morales-Yuste, M., Morillas-Márquez, F., Díaz-Sáez, V., Barón-López, S., Acedo-Sánchez, C., Martín-Sánchez, J., 2012. Epidemiological implications of the use of various methods for the diagnosis of canine leishmaniasis in dogs with different characteristics and in differing prevalence scenarios. *Parasitol Res* 111 (1), 155-164.
- Moreno, J., Alvar, J., 2002. Canine leishmaniasis: epidemiological risk and the experimental model. *Trends Parasitol* 18 (9), 399-405.
- Morgado, F.N., Cavalcanti, A.D., Miranda, L.H., O'Dwyer, L.H., Silva, M.R., Menezes, R.C., Andrade da Silva, A.V., Boite, M.C., Cupolillo, E., Porrozzi, R., 2016. *Hepatozoon canis* and *Leishmania spp.* coinfection in dogs diagnosed with visceral leishmaniasis. *Rev Bras Parasitol Vet* 25 (4), 450-458.
- Moura, E.P., Ribeiro, R.R., Sampaio, W.M., Lima, W.G., Alves, C.F., Melo, F.A., Melo, M.N., Tafuri, W.L., Tafuri, W.L., Michalick, M.S., 2008. Histopathological and parasitological analysis of skin tissues biopsies from two distinct anatomical areas of the ears of dogs naturally infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi*. *Braz J Vet Pathol* 1 (1), 10-15.
- Mullis, K., 1990. The Unusual Origin of the Polymerase Chain Reaction. *Sci Am* 262 (4), 56-61.
- Muniesa, A., Peris, A., Castillo, J.A., De Blas, I., 2016. Variations in seroprevalences of canine leishmaniasis: Could it be a consequence of the population structure?. *Vet Parasitol* 226, 5-9.

BIBLIOGRAFÍA

- Musshoff, F., Madea, B., 2006. Review of Biologic Matrices (Urine, Blood, Hair) as Indicators of Recent or Ongoing Cannabis Use. *Ther Drug Monit* 28, 155-163.
- Nestlé, F.O., Di Meglio, P., Qin, J.Z., Nickoloff, B.J., 2009. Skin immune sentinels in health and disease. *Nat Rev Immunol* 9 (10), 679-691.
- Nicolas, L., Prina, E., Lang, T., Milon, G., 2002. Real-Time PCR for Detection and Quantitation of *Leishmania* in Mouse Tissues. *J Clin Microbiol* 40 (5), 1666-1669.
- Nieto, C.G., Navarrete, I., Habela, M., Hernández-Rodríguez, S., 1992. Seroprevalence of canine leishmaniasis around Cáceres, Spain. *Prev Vet Med* 13, 173-178.
- Nieto, C.G., García-Alonso, M., Requena, J.M., Mirón, C., Soto, M., Alonso, C., Navarrete, I., 1999. Analysis of the humoral immune response against total and recombinant antigens of *Leishmania infantum*: correlation with disease progression in canine experimental leishmaniasis. *Vet Immunol Immunopathol* 67, 117-130.
- Oliva, G., Scalone, A., Foglia Manzillo, V., Gramiccia, M., Pagano, A., Di Muccio, T., Gradoni, L., 2006. Incidence and time course of *Leishmania infantum* infections examined by parasitological, serologic, and nested-PCR techniques in a cohort of naive dogs exposed to three consecutive transmission seasons. *J Clin Microbiol* 44 (4), 1318-1322.
- OMS, 2010. Control de las leishmaniasis: informe de una reunión del Comité de Expertos de la OMS sobre el Control de las Leishmaniasis, Ginebra, 22 a 26 de marzo de 2010. OMS: Serie de informes técnicos 949.
- OMS, 2015. Third WHO report on neglected tropical diseases: Investing to overcome the global impact of neglected tropical diseases. WHO Document Production Services, Geneva, Switzerland
- OMS, 2016. Leishmaniasis in high-burden countries: an epidemiological update based on data reported in 2014. *Wkly Epidemiol Rec* 91 (22), 287-296.
- Otranto, D., Paradies, P., Sasanelli, M., Leone, N., De Caprariis, D., Chirico, J., Spinelli, R., Capelli, G., Brandonisio, O., 2005. Recombinant K39 dipstick immunochromatographic test: a new tool for the serodiagnosis of canine leishmaniasis. *J Vet Diagn Invest* 17, 32-37.
- Oumeish, O.Y., 1999. Cutaneous leishmaniasis: a historical perspective. *Clin Dermatol* 17, 249-254.
- Paiva-Cavalcanti, M., Regis-da-Silva, C.G., Gomes, Y.M., 2010. Comparison of real-time PCR and conventional PCR for detection of *Leishmania (Leishmania) infantum* infection: a mini-review. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis* 16 (4), 537-542.
- Palatnik-de-Sousa, C.B., Day, M.J., 2011. One Health: the global challenge of epidemic and endemic leishmaniasis. *Parasit Vectors* 4, 197.

- Papadogiannakis, E.I., Koutinas, A.F., 2015. Cutaneous immune mechanisms in canine leishmaniosis due to *Leishmania infantum*. *Vet Immunol Immunopathol* 163 (3-4), 94-102.
- Parizad, E.G., Taherikalani, M., Mozaffar-Sabet, N.A., Asmar, M., Gholami-Parizad, S., Khosravi, A., Emaneini, M., Asadollahi, P., 2011. Cerumen as a potential risk for transmission of Hepatitis B virus. *Acta Microbiol Immunol Hung* 58 (2), 105-112.
- Pasparakis, M., Haase, I., Nestle, F.O., 2014. Mechanisms regulating skin immunity and inflammation. *Nat Rev Immunol* 14 (5), 289-301.
- Patra, R.C., Swarup, D., Naresh, R., Kumar, P., Nandi, D., Shekhar, P., Roy, S., Ali, S.L., 2007. Tail hair as an indicator of environmental exposure of cows to lead and cadmium in different industrial areas. *Ecotoxicol Environ Saf* 66 (1), 127-131.
- Pennisi, M.G., 2015. Leishmaniosis of companion animals in Europe: an update. *Vet Parasitol* 208 (1-2), 35-47.
- Pennisi, M.G., Reale, S., Giudice, S.L., Masucci, M., Caracappa, S., Vitale, M., Vitale, F., 2005. Real-time PCR in dogs treated for leishmaniasis with allopurinol. *Vet Res Commun* 29 (2), 301-303.
- Perrin, C., Taillan, B., Hofma, P., Mondain, V., Lefichoux, Y., Michiels, J.F., 1995. Atypical cutaneous histological features of visceral leishmaniasis in acquired immunodeficiency syndrome. *Am J Dermatopathol* 17 (2), 145-150.
- Petersen, C.A., 2009. Leishmaniasis, an emerging disease found in companion animals in the United States. *Top Companion Anim Med* 24 (4), 182-188.
- Petersen, C.A., Barr, S.C., 2009. Canine leishmaniasis in North America: emerging or newly recognized?. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 39 (6), 1065-1074.
- Pimenta, P.F.P., Turco, S.J., McConville, M.J., Lawyer, P.G., Perkins, P.V., Sacks, D.L., 1992. Stage-specific adhesion of *Leishmania* promastigotes to the sandfly midgut. *Science* 256, 1812-1815.
- Pinelli, E., Killick-Kendrick, R., Wagenaar, J., Bernardina, W., Del Real, G., Ruitenbergh, J., 1994. Cellular and Humoral Immune Responses in Dogs Experimentally and Naturally Infected with *Leishmania infantum*. *Infec Immun* 62 (1), 229-235.
- Pinelli, E., Gonzalo, R.M., Boog, C.J.P., Rutten, V.P.M., Gebhard, D., Del Real, G., Ruitenbergh, E.J., 1995. *Leishmania infantum*-specific T cell lines derived from asymptomatic dogs that lyse infected macrophages in a major histocompatibility complex-restricted manner. *Eur J Immunol* 25, 1594-1600.
- Pinelli, E., Gebhard, D., Mommaas, A.M., Van Hoeij, M., Langermans, J.A.M., Ruitenbergh, E.J., Rutten, V.P.M.G., 2000. Infection of a canine macrophage cell line with *Leishmania infantum*: determination of nitric oxide production and anti-leishmanial activity. *Vet Parasitol* 92, 181-189.

BIBLIOGRAFÍA

- Pivarsci, A., Nagy, I., Kemeny, L., 2005. Innate Immunity in the Skin: How Keratinocytes Fight Against Pathogens. *Curr Immunol Rev* 1 (1), 29-42.
- Portús, M., Gállego, M., Riera, C., Aisa, M.J., Fisa, R., Castillejo, S., 2002. Wild and domestic mammals in the life cycle of *Leishmania infantum* in Southwest Europe. A literature review and studies performed in Catalonia (Spain). *Rev Ibér Parasitol* 62 (3-4), 72-76.
- Proksch, E., Brandner, J.M., Jensen, J.M., 2008. The skin: an indispensable barrier. *Exp Dermatol* 17 (12), 1063-1072.
- Quaresma, P.F., Murta, S.M., Ferreira, E.C., Da Rocha-Lima, A.C., Xavier, A.A., Gontijo, C.M., 2009. Molecular diagnosis of canine visceral leishmaniasis: identification of *Leishmania* species by PCR-RFLP and quantification of parasite DNA by real-time PCR. *Acta Trop* 111 (3), 289-294.
- Quinnell, R.J., Courtenay, O., 2009. Transmission, reservoir hosts and control of zoonotic visceral leishmaniasis. *Parasitology* 136 (14), 1915-1934.
- Quinnell, R.J., Kennedy, L.J., Barnes, A., Courtenay, O., Dye, C., Garcez, L.M., Shaw, M.A., Carter, S.D., Thomson, W., Ollier, W.E., 2003. Susceptibility to visceral leishmaniasis in the domestic dog is associated with MHC class II polymorphism. *Immunogenetics* 55 (1), 23-28.
- Ramírez, L., Iborra, S., Cortés, J., Bonay, P., Alonso, C., Barral-Netto, M., Soto, M., 2010. BALB/c mice vaccinated with *Leishmania major* ribosomal proteins extracts combined with CpG oligodeoxynucleotides become resistant to disease caused by a secondary parasite challenge. *J Biomed Biotechnol* 2010, 181690.
- Reale, S., Maxia, L., Vitale, F., Glorioso, N.S., Caracappa, S., Vesco, G., 1999. Detection of *Leishmania infantum* in Dogs by PCR with Lymph Node Aspirates and Blood. *J Clin Microbiol* 37 (9), 2931-2935.
- Reis, A.B., Teixeira-Carvalho, A., Giunchetti, R.C., Guerra, L.L., Carvalho, M.G., Mayrink, W., Genaro, O., Correa-Oliveira, R., Martins-Filho, O.A., 2006. Phenotypic features of circulating leucocytes as immunological markers for clinical status and bone marrow parasite density in dogs naturally infected by *Leishmania chagasi*. *Clin Exp Immunol* 146 (2), 303-311.
- Reis, L.E., Coura-Vital, W., Roatt, B.M., Bouillet, L.E., Ker, H.G., Fortes de Brito, Resende, D.M., Carneiro, M., Giunchetti, R.C., Marques, M.J., Carneiro, C.M., Reis, A.B., 2013. Molecular diagnosis of canine visceral leishmaniasis: a comparative study of three methods using skin and spleen from dogs with natural *Leishmania infantum* infection. *Vet Parasitol* 197 (3-4), 498-503.
- Reithinger, R., Dujardin, J.C., 2007. Molecular diagnosis of leishmaniasis: current status and future applications. *J Clin Microbiol* 45 (1), 21-25.

- Rioux, J.A., Lanotte, G., Serres, E., Pratlong, F., Bastien, P., Perieres, J., 1990. Taxonomy of *Leishmania*. Use of isoenzymes. Suggestions for a new classification. *Ann Parasitol Hum Comp* 65 (3), 111-125.
- Rodgers, M.R., Popper, S.J., Wirth, D.F., 1990. Amplification of Kinetoplast DNA as a Tool in the Detection and Diagnosis of *Leishmania*. *Exp Parasitol* 71, 267-275.
- Rodríguez-Cortés, A., Ojeda, A., López-Fuertes, L., Timón, M., Altet, L., Solano-Gallego, L., Sánchez-Robert, E., Francino, O., Alberola, J., 2007. A long term experimental study of canine visceral leishmaniasis. *Int J Parasitol* 37 (6), 683-693.
- Rolão, N., Cortes, S., Rodrigues, O.R., Campino, L., 2004. Quantification of *Leishmania infantum* parasites in tissue biopsies by Real-Time polymerase chain reaction and polymerase chain reaction-enzyme-linked immunosorbent assay. *J Parasitol* 90 (5), 1150-1154.
- Romero-Peñuela, M.H., Sánchez-Valencia, J.A., 2007. El diagnóstico de la leishmaniasis visceral canina (*Leishmania infantum*). *Vet Zootec* 1 (1), 51-59.
- Rüfenacht, S., Sager, H., Müller, N., Schaerer, V., Heier, A., Welle, M.M., Roosje, P.J., 2005. Two cases of feline leishmaniasis in Switzerland. *Vet Rec* 156, 542-545.
- Ruiz-Fons, F., Ferroglio, E., Gortázar, C., 2013. *Leishmania infantum* in free-ranging hares, Spain, 2004-2010. *Euro Surveill* 18 (30), 20541.
- Sacks, D., Noben-Trauth, N., 2002. The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. *Nat Rev Immunol* 2 (11), 845-858.
- Sánchez-Robert, E., Altet, L., Utzet-Sadurni, M., Giger, U., Sánchez, A., Francino, O., 2008. Slc11a1 (formerly Nramp1) and susceptibility to canine visceral leishmaniasis. *Vet Res* 39 (3), 36.
- Santarém, N., Silvestre, R., Cardoso, L., Schallig, H., Reed, S.G., Cordeiro-da-Silva, A., 2010. Application of an improved enzyme-linked immunosorbent assay method for serological diagnosis of canine leishmaniasis. *J Clin Microbiol* 48 (5), 1866-1874.
- Saridomichelakis, M.N., 2009. Advances in the pathogenesis of canine leishmaniasis: epidemiologic and diagnostic implications. *Vet Dermatol* 20 (5-6), 471-489.
- Saridomichelakis, M.N., Koutinas, A.F., 2014. Cutaneous involvement in canine leishmaniasis due to *Leishmania infantum* (syn. *L. chagasi*). *Vet Dermatol* 25 (2), 61-e22.
- Sastre, N., Francino, O., Ramírez, O., Ensenat, C., Sánchez, A., Altet, L., 2008. Detection of *Leishmania infantum* in captive wolves from Southwestern Europe. *Vet Parasitol* 158 (1-2), 117-120.
- Schönian, G., Mauricio, I., Cupolillo, E., 2010. Is it time to revise the nomenclature of *Leishmania*?. *Trends Parasitol* 26 (10), 466-469.

BIBLIOGRAFÍA

- Scott, D.W., Miller, W.H., Griffin, C.E., 2001a. Structure and function of the skin. En: Muller and Kirk's Small Animal Dermatology. Editado por R. Kersey. Saunders.
- Scott, D.W., Miller, W.H., Griffin, C.E., 2001b. Skin immune system and allergic skin diseases. En: Muller and Kirk's Small Animal Dermatology. Editado por R. Kersey. Saunders.
- Scott, D.W., Miller, W.H., Griffin, C.E., 2001c. Keratinization defects. En: Muller and Kirk's Small Animal Dermatology. Editado por R. Kersey. Saunders.
- Shaw, S.E., Langton, D.A., Hillman, T.J., 2009. Canine leishmaniosis in the United Kingdom: a zoonotic disease waiting for a vector? *Vet Parasitol* 163 (4), 281-285.
- Silva, F.M.F., Santos, E.M.S., Torres, S.M., Yamasak, E.M., Ramos, R.A.N., Alves, L.C., 2016. Parasite load in intact and ulcerative skin of dogs with leishmaniasis. *Braz J Vet Parasitol* 25 (1), 127-130.
- Singh, S., Dey, A., Sivakumar, R., 2005. Applications of molecular methods for *Leishmania* control. *Expert Rev Mol Diagn* 5 (2), 251-265.
- Slappendel, R.J., 1988. Canine leishmaniasis. A review based on 95 cases in The Netherlands. *Vet Q* 10 (1), 1-16.
- Sobrino, R., Ferroglio, E., Oleaga, A., Romano, A., Millán, J., Revilla, M., Arnal, M.C., Triscioglio, A., Gortázar, C., 2008. Characterization of widespread canine leishmaniasis among wild carnivores from Spain. *Vet Parasitol* 155 (3-4), 198-203.
- Solano-Gallego, L., Villanueva-Saz, S., 2013. Diagnóstico. En: Leishmaniosis, una revisión actualizada. Servet. Grupo Asís Biomedica.
- Solano-Gallego, L., Llul, J., Ramos, G., Riera, C., Arboix, M., Alberola, J., Ferrer, L., 2000. The Ibizian hound presents a predominantly cellular immune response against natural *Leishmania* infection. *Vet Parasitol* 90, 37-45.
- Solano-Gallego, L., Morell, P., Arboix, M., Alberola, J., Ferrer, L., 2001. 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* 39 (2), 560-563.
- Solano-Gallego, L., Fernández-Bellón, H., Serra, P., Gállego, M., Ramis, A., Fondevila, D., Ferrer, L., 2003. Cutaneous leishmaniosis in three horses in Spain. *Equine Vet J* 35 (3), 320-323.
- Solano-Gallego, L., Rodríguez-Cortés, A., Trotta, M., Zampieron, C., Razia, L., Furlanello, T., Caldin, M., Roura, X., Alberola, J., 2007. Detection of *Leishmania infantum* DNA by fret-based real-time PCR in urine from dogs with natural clinical leishmaniosis. *Vet Parasitol* 147 (3-4), 315-319.
- Solano-Gallego, L., Koutinas, A., Miró, G., Cardoso, L., Pennisi, M.G., Ferrer, L., Bourdeau, P., Oliva, G., Baneth, G., 2009. Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniosis. *Vet Parasitol* 165 (1-2), 1-18.

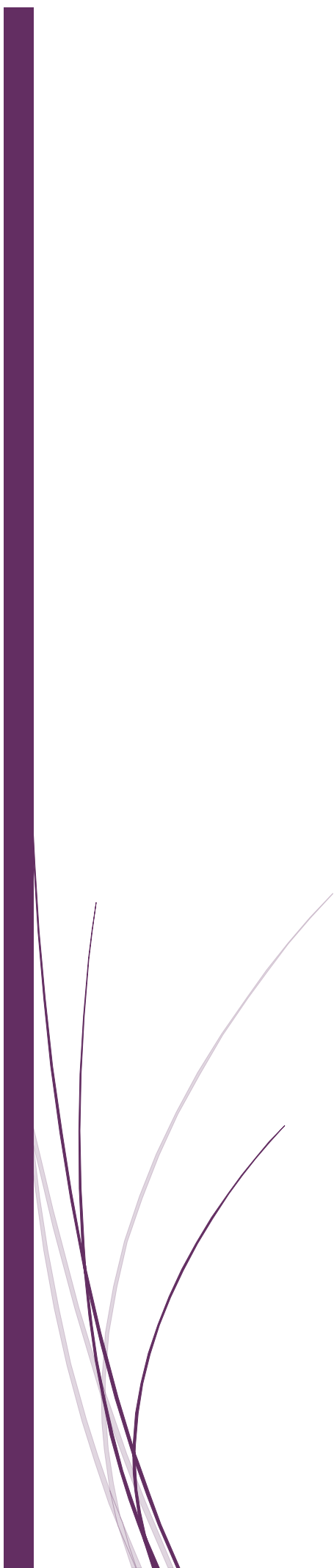
- Solano-Gallego, L., Miro, G., Koutinas, A., Cardoso, L., Pennisi, M.G., Ferrer, L., Bourdeau, P., Oliva, G., Baneth, G., The LeishVet Group, 2011. LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniosis. *Parasit Vectors* 4, 86.
- Soto, M., Requena, J.M., Quijada, L., Alonso, C., 1998. Multicomponent Chimeric Antigen for Serodiagnosis of Canine Visceral Leishmaniasis. *J Clin Microbiol* 36 (1), 58-63.
- Souza, T.D., Turchetti, A.P., Fujiwara, R.T., Paixao, T.A., Santos, R.L., 2014. Visceral leishmaniasis in zoo and wildlife. *Vet Parasitol* 200 (3-4), 233-241.
- Steven-Sparks, C.K., 2012. Anatomical studies of canine vascular and ligamentous ear structures with relevance to auto-onset deafness. Agricultural and Mechanical College. Louisiana State University. Tesis Doctoral.
- Stolker, A.A.M., Zuidema, T., Nielen, M.W.F., 2007. Residue analysis of veterinary drugs and growth-promoting agents. *Trends Analyt Chem* 26 (10), 967-979.
- Stout, P.R., Claffey, D.J., Ruth, J.A., 2000. Incorporation and retention of radiolabeled S- (+) and R- (-)- metamphetamine and S- (+) and R- (-)-N- (n-Butyl)-amphetamine in mouse hair after systemic administration. *Drug Metab Dispos* 28 (3), 286-291.
- Strauss-Ayali, D., Jaffe, C.L., Burshtain, O., Gonen, L., Baneth, G., 2004. Polymerase Chain Reaction Using Noninvasively Obtained Samples, for the Detection of *Leishmania infantum* DNA in Dogs. *J Infect Dis* 189, 1729-1733.
- Suárez-Rodríguez, B., Fernández, B.I., Sanz, S.S., Moros, M.J.S., Moreno, R.M., Mochales, J.A., Heras, C.A., 2012. Situación epidemiológica y de los factores de riesgo de transmisión de *Leishmania infantum* en España. *Rev Esp Salud Pública* 86, 555-564.
- Sundar, S., Rai, M., 2002. Laboratory Diagnosis of Visceral Leishmaniasis. *Clin Vaccine Immunol* 9 (5), 951-958.
- Takiguchi, Y., Ishihara, R., Kato, R., Kamihara, S., Yokota, M., Uematsu, T., 2001. Measurement of flecainide in hair as an index of drug exposure. *J Pharm Sci* 90 (11), 1891-1896.
- Tavares, C.A., Fernandes, A.P., Melo, M.N., 2003. Molecular diagnosis of leishmaniasis. *Expert Rev Mol Diagn* 3 (5), 657-667.
- Teske, E., Van Knapen, F., Beijer, E.G.M., Slappendel, R.J., 2002. Risk of Infection with *Leishmania spp.* in the Canine Population in the Netherlands. *Acta Vet Scand* 43, 195-201.
- Titus, R.G., Bishop, J.V., Mejia, J.S., 2006. The immunomodulatory factors of arthropod saliva and the potential for these factors to serve as vaccine targets to prevent pathogen transmission. *Parasite Immunol* 28, 131-141.

BIBLIOGRAFÍA

- Travi, B.L., Tabares, C.J., Cadena, H., Ferro, C., Osorio, Y., 2001. Canine visceral leishmaniasis in Colombia: relationship between clinical and parasitologic status and infectivity for sandflies. *Am J Trop Med Hyg* 64 (3-4), 119-124.
- Tsokana, C.N., Athanasiou, L.V., Valiakos, G., Spyrou, V., Manolakou, K., Billinis, C., 2014. Molecular Diagnosis of Leishmaniasis, Species Identification and Phylogenetic Analysis. En: *Leishmaniasis-Trends in Epidemiology, Diagnosis and Treatment*. Editado por D.M. Claborn. InTech.
- Tuon, F.F., Amato, V.S., Bacha, H.A., Almusawi, T., Duarte, M.I., Amato Neto, V., 2008. Toll-like receptors and leishmaniasis. *Infect Immun* 76 (3), 866-872.
- Tuon, F.F., Fernandes, E.R., Duarte, M.I.S., Amato, V.S., 2012. Expression of TLR2 and TLR4 in lesions of patients with tegumentary american leishmaniasis. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 54, 159-164.
- Uematsu, T., 1993. Utilization of hair analysis for therapeutic drug monitoring with a special reference to ofloxacin and to nicotine. *Forensic Sci Int* 63, 261-268.
- Vázquez, I.C., 2013. Posibles reservorios salvajes de *Leishmania infantum* en la Cuenca del Mediterráneo. Departamento de Parasitología, Facultad de Farmacia. Universidad de Barcelona. Trabajo Final de Grado,
- Veras, P.S.T., Fraga, D.B.M., Solcà, M.d.S., Guedes, C.E.S., 2014. New Advances in the Diagnosis of Canine Visceral Leishmaniasis. En: *Leishmaniasis-Trends in Epidemiology, Diagnosis and Treatment*. Editado por D.M. Claborn. InTech.
- Vercammen, F., Fernández-Pérez, F.J., Del Amo, C., Alunda, J.M., 2002. Follow-up of *Leishmania infantum* naturally infected dogs treated with allopurinol: immunofluorescence antibody test, ELISA and Western blot. *Acta Trop* 84, 175-181.
- Verçosa, B.L.A., Lemos, C.M., Mendonça, I.L., Silva, S.M.M.S., De Carvalho, S.M., Goto, H., Costa, F.A.L., 2008. Transmission potential, skin inflammatory response, and parasitism of symptomatic and asymptomatic dogs with visceral leishmaniasis. *BMC Vet Res* 4, 45.
- Vigilant, L., 1999. An Evaluation of Techniques for the Extraction and Amplification of DNA from Naturally Shed Hairs. *Biol Chem* 380, 1329-1331.
- Villanueva-Saz, S., Ordeix i Esteve, L., Solano-Gallego, L., 2013. Patogénesis y respuesta inmunitaria. En: *Leishmaniosis, una revisión actualizada*. Servet. Grupo Asís Biomédica.
- Vitale, F., Reale, S., Vitale, M., Petrotta, E., Torina, A., Caracappa, S., 2004. TaqMan-based detection of *Leishmania infantum* DNA using canine samples. *Ann NY Acad Sci* 1026, 139-143.

- Wenzel, C., Adelung, D., Kruse, H., Wassermann, O., 1993. Trace Metal Accumulation in Hair and Skin of the Harbour Seal, *Phoca vitulina*. Mar Pollut Bull 26 (3), 152-155.
- Woo, T.Y., Rasmussen, J.E., 1985. Disorders of transepidermal elimination. Part 1. Int J Dermatol 24, 267-279.
- Xavier, S.C., De Andrade, H.M., Monte, S.J., Chiarelli, I.M., Lima, W.G., Michalick, M.S., Tafuri, W.L., Tafuri, W.L., 2006. Comparison of paraffin-embedded skin biopsies from different anatomical regions as sampling methods for detection of *Leishmania* infection in dogs using histological, immunohistochemical and PCR methods. BMC Vet Res 2, 17.

7. ANEXO



7. ANEXO

Descripción del método PCR a tiempo real utilizado en la Tesis

En la PCR a Tiempo Real, la amplificación y la detección del ADN diana se producen de manera simultánea en los pocillos de la placa. Además, este ADN puede medirse en cada momento mediante detección por fluorescencia, que será proporcional a la cantidad de ADN diana formado.

A continuación se describe el desarrollo de la técnica PCR a tiempo real utilizada en cada una de las publicaciones incluidas en la Tesis.

1. Detection of *Leishmania infantum* kinetoplast minicircle DNA by Real Time PCR in hair of dogs with leishmaniosis

En este trabajo se realizaron experimentos de cuantificación relativa a un gen endógeno y de cuantificación absoluta mediante recta patrón.

Cuantificación relativa

Este método se realizó en primer lugar mediante un experimento de Ct comparativo.ⁱ En este tipo de ensayo se comparó entre las distintas muestras problema la expresión del ADN diana (ADN del kinetoplasto o ADNk de *Leishmania*) frente a la de un gen constitutivo o endógeno, referencia interna del ADN genómico canino (gen Eucariotik 18S rRNA).

Para llevar a cabo el experimento fue necesario preparar dos mezclas madre, LeishTaq y 18S, que constaban de diferentes componentes añadidos en una proporción determinada.

La mezcla LeishTaq contenía los "*primers*" (cebadores) necesarios para conseguir amplificar ADNk de parásitos del género *Leishmania* en las muestras problema, así como una sonda (*probe*) TaqMan diseñada para emitir fluorescencia al unirse a una región

ANEXO

conservada del kinetoplasto de dichos parásitos. Tanto los cebadores como la sonda fueron diseñados por Francino et al., 2006.ⁱⁱ

Los cebadores, utilizados a una concentración de 20 μM , fueron los siguientes:

•Cebador *forward* (Leish-1): 5'-AACTTTTCTGGTCCTCCGGGTAG-3'

•Cebador *reverse* (Leish-2): 5'-ACCCCCAGTTTCCCGCC-3'

La sonda TaqMan, de secuencia 6-FAM-5'-AAAAATGGGTGCAGAAAT-3'-MGB, se utilizó a una concentración de 10 μM .

La mezcla 18S contenía los cebadores para amplificar un gen constitutivo (Eucariotik 18S rRNA), presente en todas las células de un organismo. Si este gen no amplificaba, indicaba que no existía material genético propio del individuo y que por tanto la extracción no se había realizado correctamente.

En las siguientes tablas se indica la composición de ambas mezclas. De cada una de ellas se preparó cantidad suficiente para 50 pocillos.

Mezcla LeishTaq		
Nº de pocillos	μl por pocillo	μl totales
50	X 12,5 Master Mix	625
	X 0,625 Sonda	31,25
	X 1,125 Leish-1	56,25
	X 1,125 Leish-2	56,25
	X 4,625 H ₂ O MilliQ	231,25

Mezcla 18S		
Nº de pocillos	μl por pocillo	μl totales
50	X12,5 Master Mix	625
	X 1,25 18S	62,50
	X 6,25 H ₂ O	312,5

A continuación, para la preparación de la placa de PCR (96 pocillos), se añadieron 20 μl /pocillo de la mezcla LeishTaq en la mitad superior. Se repitió el proceso con la mitad inferior de la placa y la mezcla 18S, según el esquema siguiente:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Muestra 1		Muestra 2									
B												
C												
D									Control +	Control-		
E	Muestra 1		Muestra 2									
F												
G												
H									Control +	Control-		

Como puede observarse en el esquema, las muestras se analizaron por duplicado en cada una de las mitades de la placa. Una vez preparado el experimento, cada pocillo contenía 25 μl (una solución de 20 μl de mezcla + 5 μl de ADN problema).

En cada uno de los ensayos se incluyó un control positivo (ADN extraído de 55.000 promastigotes de *Leishmania infantum*, cepa MCAN/ES/1996/BCN150 zimodema MON-1) y un control negativo (ADN extraído de la sangre de un perro sano).

Una vez preparada la placa, se introdujo en el equipo StepOne Plus Real Time PCR System de Applied Biosystems. Las condiciones de amplificación utilizadas se describen a continuación:

- Paso inicial de incubación: 50°C durante 2 minutos.
- Paso inicial de desnaturalización: 95°C durante 10 minutos.
- 40 ciclos de desnaturalización (95°C durante 15 segundos) e hibridación-extensión (60°C durante 1 minuto).

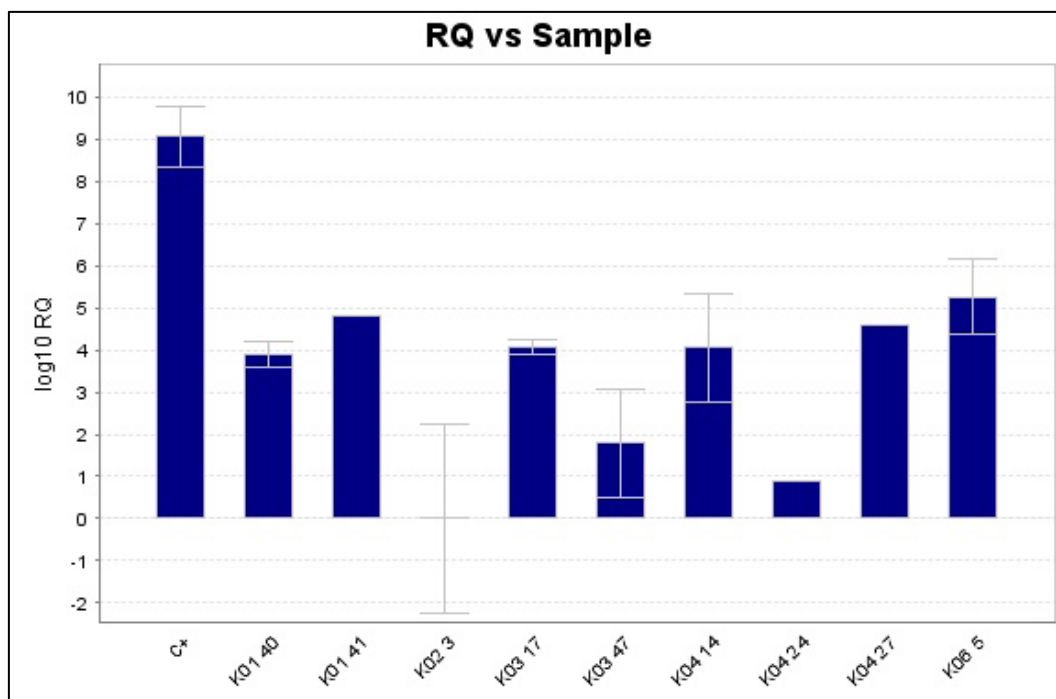
Al finalizar el experimento el equipo proporcionaba valores de Ciclo *threshold* o Ctⁱⁱⁱ y de cuantificación relativa o RQ, expresados en logaritmos.

Las muestras se consideraron positivas si se detectaba amplificación en ambos duplicados, y además la media de los Ct de ambos duplicados debía ser menor a 35.^{iv}

ANEXO

Además, tenía que cumplirse que el $\log_{10}RQ$ de cada muestra fuese superior al 5% del $\log_{10}RQ$ del control positivo.

En la siguiente imagen pueden observarse los valores del $\log_{10}RQ$, tanto de las muestras problema como de los controles, obtenidos en uno de los ensayos.



Cuantificación absoluta

Una vez realizado con éxito el experimento de cuantificación relativa, se decidió llevar a cabo una cuantificación absoluta del ADNk presente en las muestras problema mediante una recta patrón.^v Por lo tanto en el laboratorio se fabricó una recta con cantidades conocidas de ADN de *L. infantum*, obtenido a partir de un cultivo de parásitos.

Para realizar la recta lo primero que se hizo fue preparar 3 soluciones (Leish-A, B y C) con cantidades conocidas de parásitos previamente obtenidos en cultivo, tal y como se describe a continuación:

- Solución Leish-A: 100 parásitos/ μ l: obtenida al mezclar 100 μ l de una solución de 13.750 parásitos/ μ l + 13,650 ml de H₂O MilliQ.

•Solución Leish-B: 25 parásitos/ μl : obtenida al mezclar 25 μl de una solución de 13.750 parásitos/ μl + 13,725 ml de H₂O MilliQ.

•Solución Leish-C: 5 parásitos/ μl : obtenida al mezclar 100 μl de la solución Leish-B + 400 μl de H₂O MilliQ.

El segundo paso fue preparar 6 puntos o diluciones (DIL) de cantidades conocidas de parásitos (desde 15.360 a 15) utilizando las soluciones realizadas anteriormente, siguiendo las proporciones que se describen en la siguiente tabla:

Dilución	Cantidad de parásitos	Mezcla
1	15.360	153,6 μl Leish-A + 46,4 μl H ₂ O
2	3.840	153,6 μl Leish-B + 46,4 μl H ₂ O
3	960	38,4 μl Leish-B + 161,6 μl H ₂ O
4	240	48 μl Leish-C + 152 μl H ₂ O
5	60	12 μl Leish-C + 188 μl H ₂ O
6	15	3 μl Leish-C + 197 μl H ₂ O

Una vez obtenidas las diluciones se extrajo el ADN de cada una de ellas. A continuación se preparó la mezcla, en este caso dos viales de LeishTaq, siguiendo las mismas proporciones que en el experimento anterior. En toda la placa se añadieron 20 μl de esta mezcla por pocillo. Una vez preparado el experimento, cada pocillo contenía 25 μl (una solución de 20 μl de mezcla LeishTaq + 5 μl de ADN problema, incluyendo las diluciones). En esta ocasión todas las muestras se analizaron por triplicado, siendo las condiciones de amplificación utilizadas las mismas que para el experimento anterior.

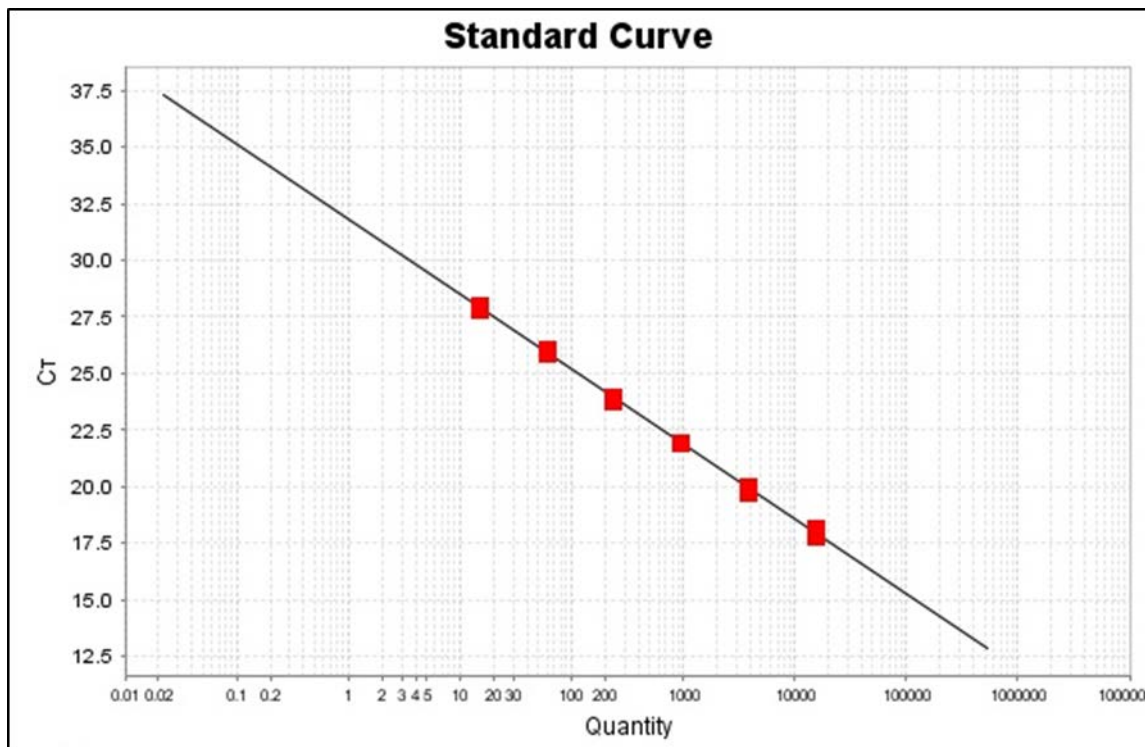
A la hora de definir la recta patrón en el equipo StepOne, a cada solución patrón se le asoció el valor correspondiente a la cantidad inicial de parásitos. Esto permitió al equipo estimar automáticamente la cantidad de parásitos a la que correspondía el ADN de *Leishmania* presente en las muestras problema. Las muestras se ordenaron en la placa según el siguiente esquema:

ANEXO

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	DIL 1			DIL 2			DIL 3			DIL 4			Mezcla LeishTaq 20 µl/pocillo
B	DIL 5			DIL 6			Muestra 1			Muestra 2			
C													
D													
E													
F													
G													
H							Control +			Control -			

Las muestras problema se consideraron positivas si se detectaba amplificación en todos los replicados. Además, la media de los Ct de los triplicados debía ser menor a 35.

En la siguiente imagen puede observarse una de las rectas patrón obtenidas en este trabajo.



2. First detection of *Leishmania infantum* kinetoplast DNA in hair of wild mammals: application of qPCR method to determine potential parasite reservoirs y Detection and chronology of parasitic kinetoplast DNA presence in hair of experimental *Leishmania major* infected BALB/c mice by Real Time PCR

En estos dos trabajos se utilizó el mismo método de cuantificación absoluta mediante recta patrón estandarizado para la publicación anterior.

3. First detection of *Leishmania* kDNA in canine cerumen samples by qPCR.

En este último trabajo decidimos optimizar la mezcla LeishTaq, y comprobamos que reduciendo la cantidad de reactivos obteníamos los mismos resultados.

También se decidió mejorar la recta patrón tras consultar bibliografía especializada sobre el tema,^{vi} no sólo realizando nuevas diluciones, sino también teniendo en cuenta parámetros relacionados con la evaluación de la fiabilidad de la propia recta, calculados automáticamente en cada ensayo. Por ello la recta obtenida en cada ensayo se sometió a un control de calidad, debiendo cumplir una serie de criterios que se describirán en este apartado.

Preparación de la recta patrón

Se decidió ampliar el rango de las concentraciones utilizadas en la recta patrón para poder abarcar los posibles valores esperados de carga parasitaria (desde cargas elevadas a muy bajas), y conseguir así afinar lo máximo posible la cuantificación y, por tanto, el método.

La nueva recta se obtuvo a partir de 6 diluciones patrón (DIL1-DIL6) con un número de parásitos de 50.000, 5.000, 500, 50, 5 y 0,5 respectivamente (diluciones 1:10).

Esta recta se preparó a partir de 1 vial de concentrado de parásitos de 75 µl que contenía un millón de promastigotes de *L. infantum*, al que se le añadieron 425 µl de agua MilliQ, obteniendo un volumen final de 500 µl. Este volumen se dividió en 4 alícuotas de 125 µl

ANEXO

y cada una de ellas se sometió al proceso de extracción de ADN. Tres de estas 4 alícuotas fueron congeladas. A la cuarta se le añadió 400 μl de tampón Tris-EDTA (T-E), obteniendo la DIL1 (ADN correspondiente a 50.000 parásitos). A partir de esta solución se realizaron diluciones 1:10 para la obtención del resto de puntos según se indica en la siguiente tabla.

Nombre	Dilución	Volumen final
DIL1 (50.000 parásitos)	500 μl	450 μl
DIL2 (5.000 parásitos)	50 μl DIL1 + 450 μl T-E	370 μl^*
DIL3 (500 parásitos)	50 μl DIL2 + 450 μl T-E	450 μl
DIL4 (50 parásitos)	50 μl DIL3 + 450 μl T-E	450 μl
DIL5 (5 parásitos)	50 μl DIL4 + 450 μl T-E	450 μl
DIL6 (0,5 parásitos)	50 μl DIL5 + 450 μl T-E	500 μl

Además también se preparó un control positivo de 1000 parásitos a partir del punto 2 de la recta patrón (DIL2). Para ello se tomaron 80 μl^* de esta solución, a los que se le añadieron 320 μl de tampón T-E. En los ensayos también se incluyó un control negativo consistente en tampón T-E, para detectar posibles contaminaciones en los reactivos.

El volumen final para cada punto se dividió en alícuotas de 15 μl , que fueron almacenadas en congelación a -80°C . Estos volúmenes, de un solo uso, evitaron la realización de sucesivos procesos de congelación-descongelación del reactivo.

Preparación de la mezcla LeishTaq

La mezcla LeishTaq estaba formada por los mismos componentes descritos en el apartado 1 del Anexo, aunque esta vez se optimizó la cantidad de los reactivos según lo reflejado en la siguiente tabla:

Reactivo	Composición mezcla LeishTaq	
	μl por pocillo	μl para 50 pocillos
Master Mix	10	500
Sonda TaqMan	0,4	20
Leish-1	0,3	15
Leish-2	0,3	15
H ₂ O MilliQ	5	250

En este caso, en cada pocillo se añadieron 16 μl de la mezcla LeishTaq + 4 μl de ADN, (volumen final de 20 μl). Tanto la distribución de las muestras en la placa (analizadas por triplicado) como las condiciones de amplificación, fueron similares a las descritas para los experimentos de curva patrón del apartado 1 del Anexo.

Análisis de los resultados

Una vez finalizados los experimentos, el equipo Step One proporcionó automáticamente los siguientes parámetros:

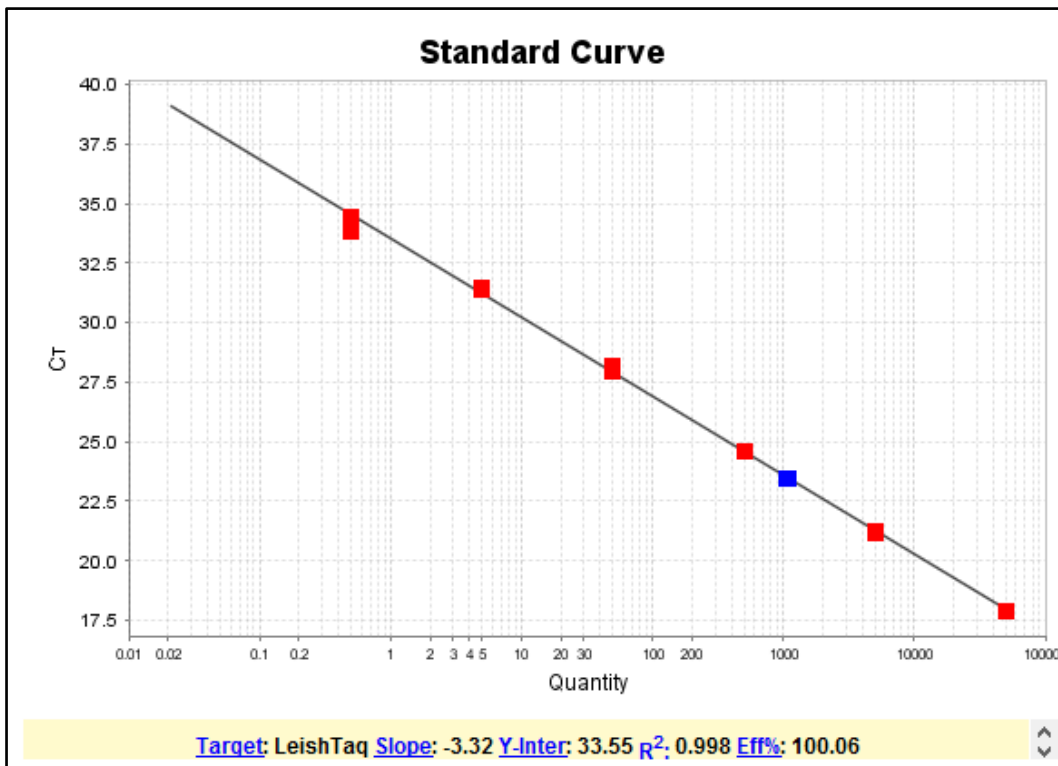
- Ciclo umbral (Ct): Valores individuales y media de los 3 replicados de cada muestra con su desviación estándar.
- Cantidad estimada de parásitos (Q): Valores individuales y media de los 3 replicados de cada muestra con su desviación estándar.
- Coeficiente de determinación R².
- Recta de regresión: $Ct = \text{pendiente} (\text{Log}Q) + Y\text{-intercept}$, siendo Y-intercept el valor de Ct esperado para una cantidad = 1.
- Eficiencia de la reacción, $[(10^{(-1/\text{pendiente})}) - 1] * 100$: se calcula usando la pendiente de la recta patrón. Una pendiente de -3,32 implica una eficiencia de la reacción del 100%.

ANEXO

Para que un experimento de recta patrón fuese considerado válido, debían cumplirse los siguientes requisitos:

- La media de los Ct de las diluciones o puntos de la recta patrón (DIL1-DIL6) debían ser < 35.
- El coeficiente R2 obtenido en la regresión debía ser $\geq 0,98$. Este coeficiente refleja la linealidad de la recta, siendo 0,999 el valor máximo que generalmente puede alcanzar.
- La pendiente de la recta debía situarse entre -3,58 y -3,10.
- La eficiencia de la reacción debía situarse entre 90-110%.

En la siguiente imagen puede observarse una de las rectas patrón que se obtuvo en este trabajo (representada como puntos rojos), que cumple perfectamente con los criterios establecidos.



Además, la cantidad estimada de parásitos obtenida para el control positivo (punto azul en la imagen anterior) debía ser 1000 ± 250 , y no debía observarse amplificación en los pocillos del control negativo.

Clasificación de las muestras

En función de los resultados obtenidos:

- Una muestra se consideró positiva si se detectaba amplificación en los tres pocillos, con un valor medio del Ct menor o igual al valor del Y-intercept de cada ensayo (siendo Y-intercept el valor de Ct esperado para una cantidad = 1).
- Una muestra se consideró negativa cuando no se detectaba amplificación en ninguno de los tres pocillos, con un valor medio del Ct mayor al valor del Y-intercept de cada ensayo (siendo Y-intercept el valor de Ct esperado para una cantidad = 1).

Este es el método que actualmente se utiliza en el Laboratorio LeishmanCeres, y ha demostrado ser fiable, preciso, sensible y específico para el diagnóstico de los diferentes tipos de leishmaniosis utilizando todo tipo de muestras.

Además, el método es apropiado para el análisis de muestras obtenidas de manera no invasiva, tema central de la presente Tesis Doctoral.

Notas:

i Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods* 25, 402–408.

ii Francino, O., Altet, L., Sánchez-Robert, E., Rodríguez, A., Solano-Gallego, L., Alberola, J., Ferrer, L., Sánchez, A., Roura, X., 2006. Advantages of real-time PCR assay for diagnosis and monitoring of canine leishmaniosis. *Vet. Parasitol.* 137, 214–221.

iii Ct: ciclo de amplificación en el cual el equipo comienza a detectar la fluorescencia

iv Applied Biosystems Application Note, 2006. Amplification efficiency of TaqMan gene expression assays.
http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcbmarketing/documents/generaldocuments/cms_040377.pdf

v Rutledge, R.G., Côte, C., 2003. Mathematics of quantitative kinetic PCR and the application of standard curves. *Nucleic Acids Res.* 31 (16), e93.

vi Life Technologies, 2012. Real time PCR handbook.
http://find.lifetechnologies.com/Global/FileLib/qPCR/RealTimePCR_Handbook_Update_FLR.pdf.

