



Facultad de Veterinaria
Universidad Zaragoza



Trabajo Fin de Grado en Veterinaria

Valoración de la ratio IgG2/IgG1 mediante un ELISA comercial como indicador pronóstico de la infección experimental por *Leishmania infantum* en perro.

Evaluation of the IgG2/IgG1 ratio by using a commercial ELISA test like a prognosis indicator of the *Leishmania infantum*-experimental infection in dog.

Autor/es

César Torres Aceña

Director/es

Juan Antonio Castillo Hernández
Mariano Morales Amella

Facultad de Veterinaria

2016

Índice

1. Resumen (Summary)	1
2. Introducción	2
2.1. Definición e importancia	2
2.2. Etiología	3
2.2.1. Ciclo biológico	4
2.2.3. Respuesta inmune	5
2.2.3.1. Respuesta inmune celular	5
2.2.3.2. Respuesta inmune humoral	7
2.3. Cuadro clínico	8
2.4. Diagnóstico	10
2.4.1. Métodos de diagnóstico directo	11
2.4.1.1. Examen microscópico	11
2.4.1.2. Histopatología	12
2.4.1.3. Inmunohistoquímica	12
2.4.1.4. Aislamiento en medio de cultivo o animales de laboratorio	12
2.4.1.6. Xenodiagnóstico	13
2.4.1.7. PCR	13
2.4.1.8. Real-time PCR	14
2.4.2. Métodos de diagnóstico indirecto	14
2.4.2.1. Métodos basados en la inmunidad humoral	14
2.4.2.2. Métodos basados en la inmunidad celular	17
2.5. Tratamiento	19
3. Justificación y objetivos	20
4. Material y métodos	21
4.1. Animales	21
4.1.1. Criterios de inclusión	21
4.1.2. Criterios de exclusión	21
4.2. Confirmación de la infección y distribución de grupos	21
4.2.1. Evaluación del estatus serológico post-infección	21
4.2.2. Valoración de la sintomatología clínica y para-clínica post-infección	21
4.3. Bienestar animal	22
4.4. Toma de muestras	22
4.5. Estudio serológico	22
4.6. Análisis de datos	24
5. Resultados	24
5.1. Discusión	27
6. Conclusiones (Conclusions)	29
7. Valoración personal	30
8. Bibliografía	31

1. Resumen

Este estudio, realizado en un grupo de perros de raza Beagle (n=30) se basó en la cuantificación de anticuerpos específicos anti-Leishmania (IgG1, IgG2 e IgG totales) mediante técnicas serológicas (ELISA, IFI y DAT). El objetivo fue estudiar la correlación entre los niveles de anticuerpos y la evolución de la infección en el animal, buscando una asociación entre las cantidades crecientes de inmunoglobulinas y la aparición y agravamiento de signos clínicos. Además, se pretendía discutir la supuesta correspondencia entre la producción de IgG1 y el desarrollo de una respuesta inmunitaria tipo Th2, que no es capaz de hacer frente al parásito y convierte al individuo en susceptible; así como la asociación entre el predominio de IgG2 post infección y el desarrollo de una respuesta tipo Th1, que confiere protección frente al parásito y logra evitar la progresión de la enfermedad.

Los resultados mostraron diferencias significativas en los niveles de IgG1 entre el grupo de animales con signos clínicos, que reflejaron valores elevados de dicha inmunoglobulina, y el grupo de individuos asintomáticos, cuyos valores fueron sensiblemente menores.

Además se calculó el Ratio IgG2/IgG1, que según ciertos autores permite establecer un pronóstico acerca de la progresión de la enfermedad. Si el valor es elevado, supone la existencia de un predominio de IgG2 sobre las IgG1, es decir, el pronóstico será favorable. Si por el contrario, los valores fueran menores, el pronóstico sería peor. En nuestro estudio pudo observarse cierta diferencia entre los dos grupos de animales, obteniéndose resultados más elevados del Ratio IgG2/IgG1 en el grupo de asintomáticos, lo cual apoyaría la hipótesis enunciada anteriormente. Sin embargo, la diferencia entre los dos grupos no llegó a ser significativa, por lo que no podemos afirmar a ciencia cierta que esta asociación sea válida para el pronóstico.

Summary

This experiment, carried out in a group of Beagle dogs (n=30), was based on the quantification of specific anti-Leishmania antibodies (IgG1, IgG2 and total IgG) by using serologic techniques (ELISA, IFI and DAT). The goal of this project was to study the correlation between the antibody levels and the evolution of the disease into the animal, in order to look for an association between the rising amount of antibodies and the appearance and the intensification of clinical signs.

In addition, it was intended to discuss the supposed association between the production of IgG1 and the development of a Th2-like response, which is not able to confront the parasite and makes the individual susceptible; as well as to confirm the association between the post-infection IgG2 predominance and the development of a Th1-like response, which confers protection against the parasite and achieves to avoid the progression of the disease.

The results demonstrated significant differences at IgG1 levels between the animals with clinical signs, which showed high values of that antibody, and the group of asymptomatic individuals, whose IgG values were lower.

Furthermore, the IgG2/IgG1 Ratio was calculated, because some authors think it could be used to establish a prognosis about the progression of the disease. If that Ratio is high, it supposes the predominance of IgG2, so the prognosis will be favourable. On the contrary, if the Ratio was lower, the prognosis would be worse. In our study, it could be observed some difference between both groups of animals, by getting higher values of the IgG2/IgG1 Ratio on the asymptomatic group, which would support the theory stated above. However, the difference between both groups was not significant, so we can not most certainly confirm this association is available for the prognosis.

2. Introducción

2.1. Definición e importancia

El término “leishmaniasis” engloba un grupo de enfermedades parasitarias causadas por organismos protozoarios de las diferentes especies del género *Leishmania*. Se trata de una enfermedad vectorial, transmitida por insectos hematófagos de los géneros *Lutzomyia* y *Phlebotomus* y afecta a América, especialmente en las zonas centro y Sur; Asia, África y Europa, con una gran prevalencia en el área mediterránea.

Forma parte del conjunto de enfermedades tropicales olvidadas o de la pobreza (NTDs), un grupo muy diverso de infecciones causadas por gran variedad de agentes patógenos (parásitos, virus y bacterias) principalmente extendidos entre las poblaciones más desfavorecidas del planeta. La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha establecido como prioritarias 17 NTDs endémicas en 149 países, que afectan a más de 1,4 billones de personas.

La leishmaniosis se encuentra en regiones tropicales y subtropicales, y es endémica en 98 países, estimándose una incidencia mundial anual de dos millones de casos nuevos (OMS, 2015). Se trata de una zoonosis, ya que algunas especies del género *Leishmania* son capaces de infectar tanto a animales como al hombre, y aunque éste es un hospedador accidental, la leishmaniosis humana tiene una distribución muy amplia en todos los continentes excepto en algunas islas del Pacífico, Australia y la Antártida (Dereure *et al.*, 1999).

La leishmaniosis, zoonosis endémica en España, fue descrita por primera vez en 1912 por el Profesor Pittaluga en la comarca de Tortosa, Tarragona (Botet Fregola, Portús Vinyeta, 1993). La especie de protozoo responsable de la enfermedad en España es *Leishmania infantum*, que se transmite por la picadura de la

hembra del flebotomo (una vez se alimenta de sangre de un animal infectado) de las especies *P. perniciosus* (el más abundante) y *P. ariasi*, presentes en todo el territorio nacional.

El perro constituye el principal reservorio de la enfermedad en nuestro país. No obstante, la lebre ha sido involucrada recientemente como posible reservorio silvestre de un brote en la especie humana en la provincia de Madrid (Molina *et al.*, 2012; Jiménez *et al.*, 2014). Existen otros cánidos silvestres cuyo papel en la transmisión aún está por determinarse, y ya se han encontrado evidencias de la infección en zorros (Millán *et al.*, 2016) y en lobos (Zárate *et al.*, 2000). Esto indicaría la existencia de un posible ciclo de vida salvaje en ausencia de perros.

2.2.Etiología

Leishmania es una especie de protozoo flagelado perteneciente al orden Kinetoplastida y a la familia Trypanosomatidae. Como todos los protozoos pertenecientes a este orden, posee dos tipos de DNA; uno nuclear (DNA genómico) y otro dentro de la membrana mitocondrial y de carácter inusual en la naturaleza, denominado DNA quinetoplástico (DNAk) (Borst *et al.*, 1979) (Figura 1).

Se trata de un parásito digenético (heteroxeno) con formas flageladas (promastigote y paramastigote) cuando se encuentran en el tracto digestivo del insecto (hospedador intermediario), y formas aflageladas (amastigotes redondeados) que viven y se multiplican de forma obligada en las células fagocitarias de los vertebrados (hospedadores definitivos).

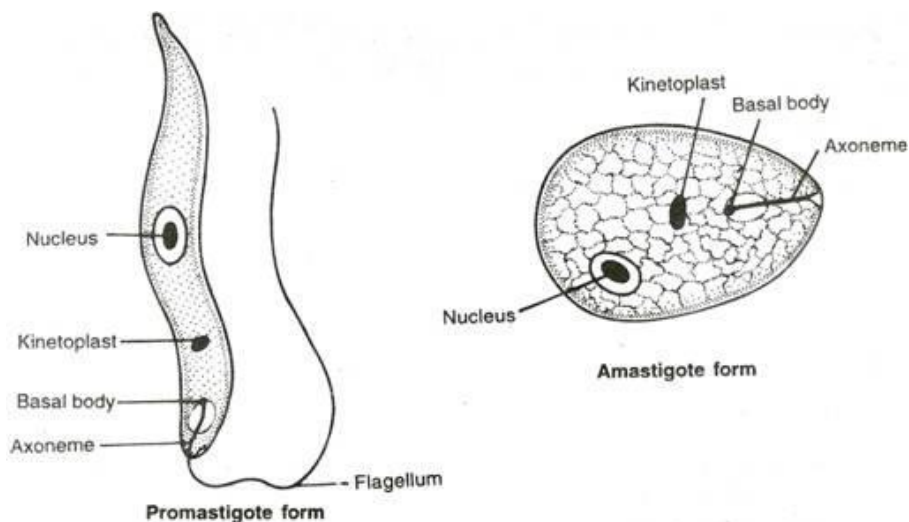


Figura 1. Morfología de los dos estadios de Leishmania (Cañavate *et al.*, 2004)

2.2.1.Ciclo biológico

Leishmania es un parásito digenético que realiza parte de su ciclo biológico en el tubo digestivo del hospedador invertebrado, y parte en el interior de las células del sistema retículoendotelial del hospedador vertebrado, sobre todo en los macrófagos.

Existen diversas especies de dípteros flebotominos hematófagos (Díptera: Psychodidae: Phlebotominae) de los géneros *Phlebotomus* y *Lutzomyia* que pueden actuar como hospedadores invertebrados, mientras que entre los hospedadores vertebrados se incluyen numerosos mamíferos, entre ellos, el hombre.

El esquema general del ciclo biológico de *Leishmania* spp. sitúa en el primer plano a las hembras del insecto vector, hematófagas, que son consideradas como las únicas responsables de la transmisión del parásito (Lariviere *et al.*, 1987). La secuencia de la infección es la siguiente: La hembra del flebotomo infectada, al alimentarse de un animal, le inocular formas infectivas del parásito (promastigotes metacíclicos), que son fagocitados por los macrófagos del hospedador vertebrado, y englobados en vacuolas parasitóforas cuya función es eliminar las formas parasitarias mediante una cascada de metabolitos derivados del oxígeno, que son vertidos en el espacio intravacuolar. Sin embargo, *Leishmania* evade estas reacciones inmunológicas inespecíficas del macrófago, viviendo y multiplicándose en su interior (en forma de amastigote) por fisión binaria.

Cuando el macrófago infectado no puede contener más formas parasitarias estalla, liberando los amastigotes, que pueden infectar nuevos macrófagos, y a través de la picadura también pueden infectar a un nuevo vector, situándose en el tubo digestivo del flebotomo (Killick-Kendrick, 1987).

El ciclo completo, desde que la hembra de flebotomo ingiere sangre y células dérmicas parasitadas con amastigotes de *Leishmania* hasta que se desarrolla el promastigote metacíclico, capaz de infectar a otro hospedador, dura unos diez días, con cierta variabilidad en función de las condiciones ambientales (temperatura, humedad, etc.) (Moody, 1993).

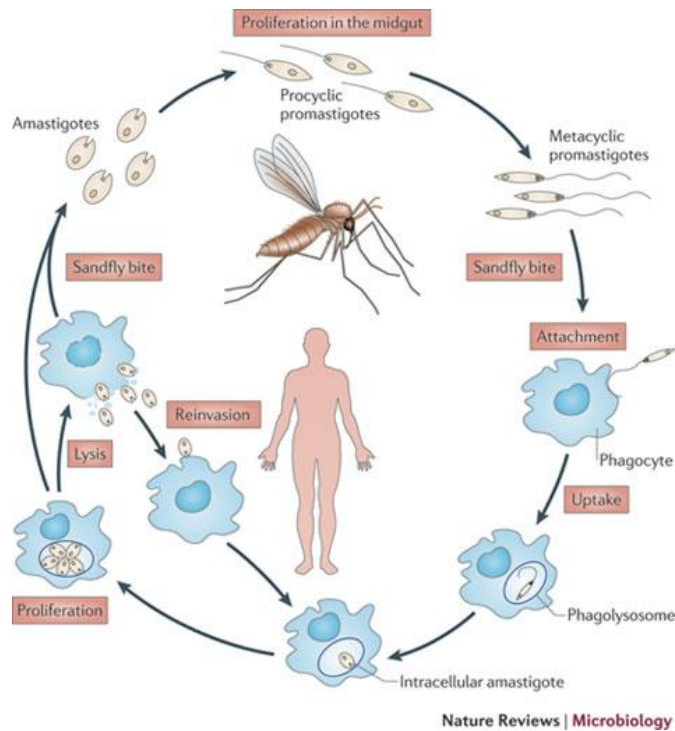


Figura 2. Ciclo biológico de *Leishmania* spp. (Kaye & Scott, 2011).

2.2.3. Respuesta inmune

Existen diferencias en la respuesta inmune desarrollada según la especie del parásito y el animal objeto de la infección. Como puntos comunes, la respuesta inmune frente a *Leishmania* siempre cuenta con la participación de mecanismos humorales y celulares (Maüel y Behin, 1981; Liew y O'Donnell, 1993).

2.2.3.1. Respuesta inmune celular

Las células T son las encargadas de hacer frente a las infecciones por *Leishmania*, mediante la producción de citoquinas que activan macrófagos, cuyo papel es luchar contra el parásito (Liew *et al.*, 1982; Murray, 1988). En el perro, los estudios realizados demuestran que la evolución de la infección depende de las células TCD4 y sus dos subpoblaciones, Th1 y Th2 (Bogdan *et al.*, 1990; Reiner y Locksley, 1995).

Varios trabajos confirman la existencia de una inmunidad celular específica protectora frente a *Leishmania* en perro (Pinelli *et al.*, 1994; Moreno *et al.*, 1999; Ramiro *et al.*, 2003; Ramos *et al.*, 2008; Ramos *et al.*, 2009). Esta resistencia a la infección se asocia a titulaciones bajas de anticuerpos anti-*Leishmania* en suero y a la producción de IL-2 y TNF- α (Pinelli *et al.*, 1994), que corresponden a una respuesta tipo Th1. Sin embargo, la fuerte inmunosupresión inducida por el parásito en perros con la infección activa, no permite la determinación de un perfil específico de citoquinas en las células estimuladas por el antígeno de *Leishmania* (Santos-Gomes *et al.*, 2002).

Santos-Gomes *et al.* desarrollaron un estudio en 2002 sobre la expresión de citoquinas en perros infectados experimentalmente con *L. infantum*. Como resultado, hallaron tres categorías distintas según la evolución de la infección:

-Fase prepatente: los animales se muestran asintomáticos y los niveles de citoquinas permanecen bajos.

-Fase patente temprana: animales asintomáticos, pero aumenta la expresión de IFN- δ e IL-2.

-Fase patente: los animales muestran signos clínicos y la expresión de citoquinas es menor que en la fase anterior.

Durante estas tres fases, los animales son capaces de transmitir el parásito, mientras éste pueda detectarse en la piel del paciente.

También se detectó IL-10 en la fase prepatente, la cual parece jugar un papel regulador de las respuestas Th1 y Th2, manteniendo el equilibrio entre ellas (Kemp *et al.*, 1999).

Al analizar Células Mononucleares Periféricas Sanguíneas (PBMC) aisladas de perros infectados asintomáticos, se observó el predominio de una respuesta tipo Th1 mediada por IL-2, IFN- δ e IL-18, junto a la no expresión de IL-4. Se atribuye a dicha respuesta la presentación asintomática de los animales, dada la capacidad de estas citoquinas de activar el macrófago para controlar al parásito y evitar su expansión.

Los niveles de IFN- δ pueden ser similares en perros infectados asintomáticos o polisintomáticos, por lo que no son los únicos responsables de la resistencia a la enfermedad (Quinnell *et al.*, 2001).

Chamizo *et al.* (2003) llevaron a cabo un estudio en el cual utilizaron la estimulación con Concaivalina A (ConA, proteína inductora de mitosis de linfocitos) en perros infectados asintomáticos. El perfil de citoquinas desarrollado por los pacientes corresponde a un fenotipo Th0, que se caracteriza por la expresión simultánea de IL-2, IFN- δ , IL-4, e IL-10 (Bogdan *et al.*, 1993), presentando niveles similares de citoquinas tipo Th1 y Th2. También se observó la expresión de IL-18, que no había sido identificada en perros sanos.

La IL-18 actúa sobre la respuesta tipo Th1, induciendo el desarrollo de células Th1, la expresión de IFN- δ (Akira, 2000) y activando la citotoxicidad de las células Natural Killer (NK) y de los linfocitos T (Lebel-Binay *et al.*, 2000). Considerando las funciones de IL-18, parece más que probable la relación de la producción de esta citoquina con la resistencia al parásito en perros asintomáticos con inmunidad celular frente a Leishmania. Otros autores observaron la correlación negativa en perros infectados entre la producción de IL-18 y el estadio clínico de los animales (Quinnell *et al.*, 2001).

El predominio de las citoquinas tipo Th1 origina una respuesta inmune celular protectora frente a Leishmania. Como se ha explicado anteriormente, este predominio también aparece en perros infectados experimentalmente al final del periodo de prepatencia de la infección (Santos-Gomes *et al.*, 2000), que es el

responsable de retrasar la aparición de la enfermedad en el perro, pero es insuficiente para controlar la infección.

En conclusión, en perros infectados se observa la producción de citoquinas tipo Th1 y Th2, pero predominan las Th1, responsables de producir inmunidad protectora frente al parásito.

Las células T CD8⁺ también participan en la inmunidad protectora frente a leishmaniosis en varias especies, entre ellas el perro (Pinelli *et al.*, 1994a; Pinelli *et al.*, 1995). Estas células se encargan de la secreción de IFN- δ , responsable de la activación de los macrófagos y la supresión de las células tipo Th2 (Chan, 1993; Müller *et al.*, 1993).

En el perro, las células T CD8⁺ de animales infectados asintomáticos (no ocurre así en animales sintomáticos), producen IFN- δ y son capaces de lisar los macrófagos infectados mediante el Complejo Mayor de Histocompatibilidad (Pinelli *et al.*, 1994a, Pinelli *et al.*, 1995). También se han detectado elevados niveles de células T CD8⁺ en animales con leishmaniosis canina activa (Moreno *et al.*, 1999; Solano-Gallego, 2001).

2.2.3.2. Respuesta inmune humoral

Esta respuesta se cuantifica según la producción de anticuerpos específicos anti-Leishmania, principalmente inmunoglobulinas (Ig).

Según varios modelos experimentales, los animales sensibles presentan una respuesta inmune celular tipo Th2, además de elevados niveles de IgG1 e IgE, mientras que individuos resistentes desarrollan una respuesta celular tipo Th1 y elevados niveles de IgG2a en suero (Heinzel *et al.*, 1989; Sakai *et al.*, 2000).

Deplazes *et al.* (1995) desarrollaron un experimento, en el cual se analizaron mediante ELISA sueros de perros infectados mediante infección natural con *L. infantum*, para determinar la especificidad de cada subclase de IgG con cada tipo de respuesta inmune humoral. Los animales infectados producían IgG1 e IgG2, aunque esta última se asociaba a infecciones asintomáticas. Por su parte, la producción de IgG1 se asoció a enfermedad con sintomatología clínica (que puede o no responder al tratamiento). Esto indica la existencia de una respuesta inmune dicotómica a la infección con *L. infantum*.

Solano-Gallego *et al.* (2001) concluyeron que los niveles de IgG totales y de IgG2 estaban correlacionados en perros asintomáticos, sintomáticos y tratados (tanto en infección natural como experimental) y que son significativamente más elevados en perros sintomáticos que en asintomáticos. Sin embargo, la relación IgG1-IgG totales es muy variable. En perros infectados asintomáticos, se detectan elevados niveles de IgG totales, pero bajos títulos de IgG1, que se mantienen durante la infección, incluso cuando aumentan las IgG totales y las IgG2.

En perros infectados (natural o experimentalmente) y con sintomatología, los niveles de IgG totales e IgG2 son elevados (Deplazes *et al.*, 1995; Cavaliero, 1999; Solano-Gallego, 2001), mientras que los niveles de IgG1 son muy variables.

En perros sensibles, tras finalizar el tratamiento, los niveles de IgG e IgG2 decrecen lentamente y las IgG1 disminuyen de forma más rápida (Deplazes *et al.*, 1995), mientras que en perros más resistentes, la caída de las IgG1 es menos marcada o temporal.

Los estudios de Almeida *et al.* (2005) concluyeron que la producción de IgE podría relacionarse con casos de leishmaniosis visceral canina, aunque no es posible utilizarla como marcador específico. La ausencia de IgE en perros asintomáticos que presentan IgG podría asociarse al predominio de una respuesta inmunitaria tipo Th1 (Almeida *et al.*, 2005). Por otro lado, la aparición de IgE en animales aparentemente sanos de áreas endémicas significaría una evolución clínica de los mismos hacia leishmaniosis visceral canina (es decir, no son sanos, si no infectados asintomáticos).

2.3. Cuadro clínico

La respuesta inmune del animal infectado condicionará la forma de presentación de la enfermedad (Campino *et al.*, 2000), pudiendo incluso ser asintomática (Ferrer, 1999).

El período de incubación de *L. infantum* en perro oscila entre 3 meses y 7 años. Algunos animales manifiestan sintomatología severa al poco tiempo de ser infectados, mientras que otros permanecen como portadores asintomáticos mucho tiempo, incluso de por vida. Estos pacientes asintomáticos pueden enfermar en cualquier momento, sobre todo si sufren inmunosupresión. Pueden darse formas hiperreactivas de leishmaniosis, en las cuales no se aprecia el parásito, pero existen manifestaciones clínicas; o puede ocurrir lo contrario, formas anérgicas con diseminación generalizada, con elevado número de parásitos pero poca o ninguna manifestación clínica (Griffiths, 1987).

Según Lluís Ferrer y Xavier Roura (2016), dos son los mecanismos que provocan las lesiones características de la enfermedad:

- Por un lado, una inflamación granulomatosa no supurativa en los lugares donde se multiplica el parásito.
- Por otro, el depósito de inmunocomplejos en distintas localizaciones anatómicas.

El primer mecanismo provoca manifestaciones clínicas en piel, hígado, intestino, ojos, riñón, hueso y mucosas. Por su parte, el segundo mecanismo hace aparecer lesiones mayoritariamente renales, oculares y vasculares.

Los signos clínicos más frecuentes son los cutáneos (Figura 3), que se presentan, aproximadamente en el 80% de los perros enfermos. La linfadenopatía, presente en un 70-80% de los pacientes, y los síntomas generales (fiebre, apatía, adelgazamiento y atrofia muscular) presentes en un 40-60%, son también muy frecuentes. Luego se abre un amplio abanico que incluye signos clínicos renales (es típica la instauración de enfermedad renal crónica debido al depósito de inmunocomplejos en la membrana del glomérulo renal) y/u oculares, esplenomegalia, hepatomegalia, dolor, cojeras, diarrea, epistaxis, onicogriphosis, onicorrexis, fiebre, ictericia, síncope o tos; que aparecen de forma variable, con porcentajes de aparición que oscilan entre el 1% y el 20 % según los diferentes autores.

Tabla 1. Signos clínicos de la leishmaniosis canina	
Generales	Estado nutritivo deficiente hasta la caquexia, atrofia muscular, letargia, mucosas pálidas, epistaxis, linfadenomegalia, hepatoesplenomegalia, cojera o inflamación articular, fiebre.
Cutáneos o mucocutáneos	Dermatosis exfoliativa (localizada o general), dermatitis ulcerativa (uniones mucocutáneas, cojinetes o callos de apoyo), dermatitis papular, dermatitis nodular, lesión en la trufa (similar a pénfigo-lupus), onicopatías, hiperqueratosis nasodigital.
Oculares	Lesiones palpebrales, lesiones conjuntivales difusas o nodulares, lesiones corneales (queratitis nodular, queratoconjuntivitis o queratitis seca), lesiones de la esclera (epiescleritis o escleritis difusa o nodular), uveítis anterior difusa o granulomatosa, uveítis posterior (corioretinitis, hemorragia o desprendimiento de retina), glaucoma, panoftalmia, lesiones de la órbita (granulomas o miositis).
Otros	Gastrointestinales o neurológicos.

Apoyo en los resultados obtenidos en el laboratorio

Las pruebas de laboratorio de base son el hemograma completo, la bioquímica sérica, el proteinograma y el examen de la orina. En la leishmaniosis canina, estas pruebas pueden permitir detectar una o más alteraciones asociadas a la enfermedad. Si se encuentran hallazgos relevantes en estas pruebas de base, puede ser interesante realizar otras pruebas más específicas.

Tabla 2. Alteraciones de laboratorio asociadas a la leishmaniosis canina	
Hemograma	Anemia poco o no regenerativa/ anemia regenerativa (posiblemente inmunomediada), leucocitosis neutrofílica y monocítica con linfopenia y eosinopenia (leucograma de estrés), leucopenia, trombocitopenia.
Coagulación	Hiperfibrinogenemia, alargamiento del PT y aPTT.
Bioquímica	Hiperproteïnemia, hipoalbuminemia, hiperglobulinemia, alteración ratio albúmina/globulina, azotemia, aumento de los enzimas hepáticos.
Proteinograma	Hipoalbuminemia, aumento de las globulinas alfa 2 y gammapatía poli/monoclonal.
Orina	Orina isostenúrica (1008-1012) o poco concentrada (<1030), proteinuria (en tira de orina o en ratio proteína/creatinina de orina).

Sin embargo, en la mayoría de los casos, aunque son de ayuda, los análisis clínicos muestran alteraciones que no son patognomónicas de la leishmaniosis canina. La hipergammaglobulinemia, presente en un 80% de los casos, la anemia en un 60% y la hipoalbuminemia en un 40% son las alteraciones analíticas más frecuentes. La anemia es de tipo no regenerativo y es debida a que la leishmaniosis es una enfermedad crónica.

En el hemograma también destaca la trombocitopenia (60%) y, dependiendo de los casos, leucocitosis o leucopenia. La hipergammaglobulinemia es normalmente policlonal, aunque se han detectado casos en los cuales puede ser monoclonal. La hipoalbuminemia es compensatoria a la hipergammaglobulinemia y también consecuencia de la glomerulonefritis. Otras alteraciones son incrementos de la ALT, gamma GT, urea o creatinina y la presencia de proteinuria o de hematuria.

2.4. Diagnóstico

El diagnóstico puede volverse complicado, ya que no todos los perros infectados con promastigotes metacíclicos desarrollan sintomatología. Este hecho no puede ser pasado por alto, ya que los perros asintomáticos son infectantes para las hembras de flebotomo (aunque parecen constituir un menor riesgo que los perros sintomáticos). Por tanto, la detección temprana de animales infectados (antes del desarrollo de signos clínicos e incluso antes de la seroconversión) puede ser crítica para frenar la expansión de la infección. Así mismo, es una parte esencial del control de la leishmaniosis humana.

Existen diversos métodos diagnósticos (Tabla 3), englobados en dos grupos: diagnóstico parasitológico (directo) o indirecto. Dependiendo de las exigencias del diagnóstico laboratorial, puede recurrirse a unos u

otros métodos, ya que cada uno tiene ventajas y desventajas sobre los demás (Schallig *et al.*, 2004; Baneth y Aroch, 2008; Gomes *et al.*, 2008).

Tabla 3. Métodos diagnósticos de leishmaniosis canina			
Diagnóstico directo		Diagnóstico indirecto	
Clásicos	Biología molecular	Respuesta inmune humoral	Respuesta inmune celular
Examen microscópico	PCR	IFI	Test de Montenegro (intradermorreacción)
Histopatología	Real Time PCR (qPCR)	AD (Aglutinación directa)	Linfoproliferación
Inmunohistoquímica	PCR de la transcriptasa inversa (RT-PCR)	ELISA (simple o con antígenos recombinantes)	Inhibición del efecto citopático del δ -interferón
Aislamiento en cultivo		Inmunodifusión	Poblaciones de linfocitos Th (citometría de flujo)
Aislamiento en animales de laboratorio		Inmunocromatografía rápida	Interleucinas
Xenodiagnóstico		Western Blotting	

2.4.1. Métodos de diagnóstico directo

2.4.1.1. Examen microscópico

Esta técnica se basa en la observación de frotis teñidos de muestras de órganos o tejidos infectados con el objetivo de visualizar amastigotes de *Leishmania*, principalmente a partir de muestras de médula ósea, linfonodo y piel.

Cabe mencionar como desventaja que se trata de un procedimiento de muestreo invasivo, poco recomendable en animales asintomáticos, debido a la baja carga parasitaria que éstos suelen mostrar (Alvar *et al.*, 2004).

Liarte *et al.* (2001) describieron un método rápido de fluorescencia: QBC (Quantitative Buffy Coat). El Buffy Coat es la banda de glóbulos blancos y plaquetas que queda al centrifugar sangre sin coagular. Los glóbulos rojos quedan abajo, el plasma arriba y la línea que los separa es el Buffy Coat.

El QBC presenta una alta sensibilidad para la detección de amastigotes en sangre periférica en perros infectados con *Leishmania canina*. Sin embargo, aún no está clara la especificidad de este método.

2.4.1.2. Histopatología

La leishmaniosis puede detectarse por medio del análisis histológico de muestras de órganos infectados teñidos con H-E. (Hematoxilina- Eosina). El abanico de muestras posibles es más amplio que en el método anterior.

Moreira *et al.* (2007) descubrieron que el linfonodo poplíteo es la muestra más efectiva para la detección del parásito mediante histopatología (en torno al 40% de positivos, aumentando en animales sintomáticos y menor en asintomáticos).

2.4.1.3. Inmunohistoquímica

Técnicas inmunohistoquímicas, como la Inmunoperoxidasa o la IFD (inmunofluorescencia directa) de tejido son herramientas complementarias para confirmar el diagnóstico llevado a cabo con tinción de H-E, particularmente en órganos que no tienen alta carga parasitaria. Resulta un útil suplemento para confirmar el diagnóstico de leishmaniosis canina cuando los parásitos no son claramente identificables en microscopio y cuando el patrón histológico indica claramente la presencia de infección. Estas técnicas, al igual que la observación a microscopio, requieren cierta destreza y entrenamiento por parte de quien las realiza, ya que la identificación es subjetiva según la habilidad del observador. Pueden darse falsos negativos usando estos métodos, ya que su sensibilidad depende de la carga parasitaria, o falsos positivos al confundir otros artefactos visualizados al microscopio con amastigotes.

2.4.1.4. Aislamiento en medio de cultivo o animales de laboratorio

El cultivo *in vitro* de diferentes tejidos puede mejorar la sensibilidad de la detección parasitaria.

Los medios de cultivo usados pueden ser monofásicos (sintéticos), como “Schneider’s insect medium”, “M199”, “RPMI”, “Grace’s médium”; o difásicos, como “Novy–McNeal–Nicolle medium” o “Brain Heart Infusion”. Los medios de cultivo son inoculados con una o dos gotas de aspirado u homogeneizado de un fragmento de órgano e incubados a temperatura entre 22 y 26°C.

Los cultivos son examinados semanalmente buscando la presencia de promastigotes. Los parásitos pueden ser vistos en la primera semana, aunque puede ser necesaria la realización de subcultivos semanales en medios frescos para poder visualizarlos. En general, un cultivo se considera negativo tras cuatro subcultivos de resultado negativo.

Algunos autores (Barrouin-Melo *et al.*, 2005; Rosypal *et al.*, 2005) consideran que el bazo es el órgano de elección para el diagnóstico mediante cultivo. Sin embargo, el hecho de que su muestreo sea un proceso invasivo y con alto riesgo, es una razón suficiente para evitarlo, eligiendo el aspirado de linfonodo poplíteo.

En perros sin nódulo poplíteo detectable, la médula ósea es una opción adecuada para el diagnóstico. En orden de efectividad: bazo, linfonodo y médula ósea.

El cultivo es todavía utilizado para obtener un número suficiente de parásitos para la posterior identificación isoenzimática, como antígeno para diagnóstico inmunológico, para modelos de infección experimental, así como evaluación de moléculas in vitro o incluso identificación molecular.

En referencia al aislamiento en animales de laboratorio, se realiza la inoculación intraperitoneal de homogeneizado de médula, linfonodo o bazo de animal infectado en hámster dorado. Este método no es empleado habitualmente, dado que son necesarios varios meses para obtener resultado. El animal es examinado semanalmente buscando signos de infección, como hepatomegalia y esplenomegalia. Los amastigotes pueden ser recogidos de hígado, bazo y nodos linfáticos.

2.4.1.6. Xenodiagnóstico

Detección y aislamiento del patógeno desde su vector artrópodo natural. Los vectores más competentes son *P. perniciosus* y *P. ariasi*, y en Sudamérica la mayoría de estudios se llevan a cabo con el vector natural, *Lutzomyia longipalpis*.

Esta técnica es raramente usada en el diagnóstico de Leishmaniosis canina, ya que solo puede llevarse a cabo en laboratorios especializados capaces de mantener una colonia de flebotomos.

2.4.1.7. PCR

El diagnóstico por PCR es el método más fiable para determinar presencia e identificación del parásito, tanto en infección activa como para monitorizar la cura parasitológica tras tratamiento. Pueden utilizarse como muestras sangre entera, buffy coat, médula ósea, linfonodo, piel o hisopos conjuntivales; e incluso muestras no usadas rutinariamente, como corazón, pulmón, orina, etc.

Maia *et al.* (2007) concluyen que la PCR de nódulo linfático es útil como línea primaria de diagnóstico o seguimiento terapéutico, y consideran la PCR de médula ósea como segunda opción. Recientemente, algunos autores defienden el uso de hisopos conjuntivales para el seguimiento terapéutico.

Un solo resultado negativo en un perro con sospecha clínica no es suficiente para descartar la infección. Los estudios realizados demuestran resultados variables y a veces conflictivos, por la distribución heterogénea del parásito en diferentes órganos, o por la carga parasitaria del órgano asociada al tropismo del parásito y a la respuesta inmune local.

La sangre entera no es el órgano más indicado para hacer la PCR, dado que la duración, constancia e intensidad de la parasitemia es aún desconocida, llevando a falsos negativos. La aparición de falsos positivos puede darse debido a contaminación natural de la muestra o a infección transitoria.

Este es un método delicado, ya que su eficacia depende de varios factores (cebadores, método de extracción de DNA, número de copias, material biológico utilizado y protocolo de la PCR).

2.4.1.8. Real-time PCR

La PCR cuantitativa a tiempo real permite la determinación de la carga parasitaria en diferentes tipos de muestras, mediante el uso de sondas fluorescentes.

La PCR a tiempo real ofrece las siguientes ventajas respecto a la PCR convencional: reducción del tiempo del ensayo y del riesgo de contaminación, además de una mejora notable en la sensibilidad de la prueba (Mortarino *et al.*, 2004; Gomes *et al.*, 2008). Se trata de un método muy útil para el diagnóstico de la leishmaniosis canina, ya que facilita la monitorización de la carga parasitaria durante y después del tratamiento, permitiendo la predicción de recurrencias basada en la carga parasitaria residual tras el tratamiento (Pennisi *et al.*, 2005; Francino *et al.*, 2006; Manna *et al.*, 2007; Solano-Gallego *et al.*, 2007).

2.4.2. Métodos de diagnóstico indirecto

2.4.2.1. Métodos basados en la inmunidad humoral

El diagnóstico serológico es usado con mucha frecuencia, pero subestima la tasa de infección en perros que viven en zonas endémicas (Alvar *et al.*, 2004). La producción de anticuerpos es baja en las fases inicial o final, sin embargo, los animales infectados desarrollan titulaciones ascendentes con el tiempo (Oliva *et al.*, 2006).

Los perros sintomáticos, aparte de alteraciones hematológicas y en el proteinograma, desarrollan una potente respuesta humoral (Campino *et al.*, 2000). Sin embargo, la presencia de anticuerpos anti-Leishmania no es un signo conclusivo de enfermedad. Es aconsejable realizar más de un test serológico para mejorar el diagnóstico de leishmaniosis canina (Campino, 2002), y continuar monitorizando mediante test sucesivos durante los próximos 3 meses (Baneth y Aroch, 2008).

Los test serológicos utilizados hasta la fecha requieren como antígenos, el cuerpo completo del parásito (antígeno "forme", utilizado en AD e IFI) o extractos solubles de éste (antígeno soluble), que pueden ser "crudos" o de proteínas/péptidos recombinantes (ELISA, inmunocromatografía rápida, Western Blotting, Inmunodifusión) (Castillo, 2012). Generalmente, los métodos que usan el cuerpo completo del parásito aportan resultados mejores y más reproducibles (Alvar *et al.*, 2004; Gomes *et al.*, 2008). Los test serológicos

tienen varios problemas intrínsecos, como son la persistencia de anticuerpos específicos tras la recuperación del animal o las reacciones cruzadas con anticuerpos frente a otros patógenos como *Trypanosoma cruzi* y *Ehrlichia canis* (Ferreira *et al.*, 2007). Son necesarios altos niveles de sensibilidad y especificidad para evitar falsos negativos que subestiman la tasa de infección en animales de áreas endémicas, así como para evitar falsos positivos.

Los métodos que utilizan el antígeno forme se basan en la detección de anticuerpos frente a los antígenos de superficie (de membrana fundamentalmente). En el caso de los métodos que trabajan con antígeno soluble, se lleva a cabo la detección de antígenos metabólicos, somáticos y también de membrana. Teóricamente (aunque no siempre se confirma), la utilización de proteínas recombinantes específicas del parásito a modo de antígeno, aumenta la especificidad de la prueba diagnóstica (Castillo, 2012).

La visualización de la reacción Ag-Ac puede llevarse a cabo por métodos primarios (Aglutinación Directa e Inmunodifusión); o secundarios, por medio de anti-anticuerpos mono o policlonales marcados frente a los anticuerpos que queremos detectar (IFI, ELISA, Inmunocromatografía rápida, Western Blotting y Citometría de flujo). En este tipo de técnicas, es necesario considerar el tipo de anticuerpo o anticuerpos que se pretende detectar: IgG totales o sus diferentes subtipos (IgG1 e IgG2 principalmente), IgM o IgE.

Actualmente, las técnicas serológicas de elección son la IFI y AD, que utilizan antígenos formes, y algunos tipos de ELISA en función del tipo de antígeno que utilicen. El resto de las técnicas citadas en el cuadro anterior tienen escasa utilidad práctica y se suelen reservar para trabajos de investigación y como complemento de las señaladas.

-La Inmunofluorescencia Indirecta es considerada la prueba de oro (Gold Test) del diagnóstico serológico. Este test, que utiliza el cuerpo completo del parásito como antígeno, es útil en estudios epidemiológicos, en la práctica clínica, y en seguimiento de tratamientos (Gradoni, 2002; Mancianti *et al.*, 2002; Alvar *et al.*, 2004). Se trata de una técnica muy específica y sensible para la detección de leishmaniosis clínica, pero parece tener una menor sensibilidad para detectar perros sanos infectados (Mettler *et al.*, 2005a; Ferreira Ede *et al.*, 2007). Es posible encontrar diferentes puntos de corte (cut-off) según el laboratorio en el que se realiza la técnica.

Sin embargo, su ejecución requiere mucha habilidad y experiencia, y materiales de laboratorio caros. Otra de sus limitaciones es que requiere hacer diluciones seriadas del suero, lo cual es muy laborioso y no es viable para evaluar muchas muestras a la vez. Hay pocos test de IFI comerciales, y los antígenos hechos en el laboratorio suelen ser más efectivos. (Gradoni, 2002).

-El DAT (aglutinación directa) es una técnica cuyo principio es el fenómeno de aglutinación, en el que los anticuerpos del suero del paciente reaccionan de manera específica con el antígeno. Se considera un

resultado positivo cuando es visible el fenómeno de aglutinación, que se observa a simple vista en forma de esfera o botón agrandado en el fondo del pocillo (Schalling *et al.*, 2002).

El test de Aglutinación Directa (AD, DAT) utiliza promastigotes enteros teñidos en suspensión o liofilizados. Es una técnica ideal tanto en laboratorio como en condiciones de campo, por su sencillez y bajo coste (Meredith *et al.*, 1995). Puede utilizarse como muestra plasma o suero. La sensibilidad de la prueba en perros que habitan zonas endémicas oscila entre el 70,6% (Mohebbali *et al.*, 2004) y un 100% (Schalling *et al.*, 2002).

Este test puede volverse demasiado laborioso cuando debe realizarse con un gran número de muestras (Harith *et al.*, 1989), dado que el período de incubación es relativamente largo (18 horas) y es necesario hacer diluciones seriadas de las muestras de suero o plasma. Sin embargo, se han desarrollado variantes de este test, cuyo tiempo de incubación es menor (3 horas en el caso del método de aglutinación rápida o FAST), al igual que su laboriosidad, mientras la sensibilidad se mantiene en niveles similares (Schalling *et al.*, 2002, 2004). Estas variantes son el mencionado FAST o el Easy DAT, desarrollado por Gómez Ochoa *et al.* en 2003.

-El ensayo inmunoenzimático (ELISA) es una técnica sencilla y que permite utilizar varios tipos de antígeno, adecuada tanto en laboratorio como en campo y capaz de procesar gran cantidad de muestras en poco tiempo.

La sensibilidad y especificidad del ELISA dependen de los antígenos utilizados, que pueden ser extractos enteros o solubles de promastigotes, proteínas recombinantes o purificadas (Miró *et al.*, 2008). Los extractos de parásito entero son muy sensibles para detectar tanto infecciones clínicas como subclínicas, pero tienen una menor especificidad (Mettler *et al.*, 2005a; Ferreira *et al.*, 2007). Por otro lado, un ELISA a base de proteínas recombinantes es muy específico, pero ofrece una menor sensibilidad para la detección de perros enfermos o sanos infectados, en función del antígeno utilizado (Mettler *et al.*, 2005a; Porrozzini *et al.*, 2007).

Baleeiro *et al.* (2006) demostraron que la elección del antígeno condiciona el resultado del test ELISA. Preparaciones de antígeno procedentes de *L. braziliensis* o *L. amazonensis* en vez de *L. chagasi* hacen disminuir la detección de anticuerpos en suero.

Existen test ELISA comerciales rápidos con alta especificidad, sensibilidad y fiabilidad, como el Snap 1 LCATK, que puede llevarse a cabo utilizando como muestra sangre entera (Ferroglio *et al.*, 2007; Rajasekariah *et al.*, 2008). La tecnología del DNA recombinante ha permitido la clonación molecular de varios genes codificadores de proteínas antigénicas de *Leishmania*, que se pueden emplear para realizar métodos serodiagnósticos más específicos. Actualmente, están comercializados los antígenos rK39 y rLiP2a-rLiP2b-rLiP-rH2A.

Los puntos críticos a la hora de seleccionar una de las pruebas que hemos señalado como “de elección” por su alta sensibilidad (hasta 92-100%) y especificidad (95-100%), son los siguientes (Castillo, 2012):

-Tipo y elaboración del antígeno: existe una alta variabilidad en función de los laboratorios, no hay un antígeno estándar establecido.

-Anticuerpos marcadores utilizados (anti – Igs): nuevamente se presenta el mismo problema, ya que existe una alta variabilidad entre los diferentes fabricantes e incluso de los lotes dentro del mismo fabricante.

-Punto de corte utilizado para definir la positividad/negatividad de la prueba. Tampoco existe un acuerdo unánime sobre este punto entre los diferentes laboratorios.

-Por último y sobre todo en IFI y AD, la experiencia y meticulosidad del personal que las realiza es un aspecto clave para la obtención de resultados fiables.

2.4.2.2. Métodos basados en la inmunidad celular

Estos métodos no suelen emplearse en el diagnóstico, al estar menos desarrollados y estandarizados que las técnicas serológicas. Se utilizan más como indicador pronóstico de la enfermedad que como verdaderamente diagnósticas.

Existen algunas técnicas desarrolladas, las cuales se citan a continuación:

-Test de Montenegro

Conocido también como Leishmanin Skin Test (LST), indica la respuesta de hipersensibilidad retardada frente al antígeno de Leishmania. Se lleva a cabo mediante la inoculación intradérmica de promastigotes inactivados (3×10^8 /ml) diluidos en fenol o solución salina. Si pasadas 48-72 horas se aprecia una induración de unos 5 mm en el punto de inoculación, se considera positivo (Montenegro, 1926; Pinelli *et al.*, 1994; Cardoso *et al.*, 1998; Solano-Gallego *et al.*, 2001; Fernández-Bellón *et al.*, 2005).

Normalmente, el LST resulta negativo durante la infección activa, y positivo en infección subclínica, en fase temprana o después de un tratamiento efectivo (Rodríguez-Cortés *et al.*, 2007).

-Ensayo de Linfoproliferación (LPA)

Método que mide la capacidad de los linfocitos de un cultivo de tejido de sufrir una proliferación clonal cuando son estimulados *in vitro* por una molécula externa, un antígeno (Antígeno Soluble de Leishmania (LSA)) o un mitógeno.

Normalmente, la proliferación celular se expresa mediante un índice de estimulación (SI, *stimulated cells*). Existe bastante controversia sobre el punto de corte o valor umbral, a partir del cual se considera al individuo positivo.

Los perros resistentes y los asintomáticos presentan una fuerte respuesta linfoproliferativa a los antígenos de *Leishmania*, mientras que los perros susceptibles no muestran respuesta *in vitro* al LSA (Pinelli *et al.*, 1994; Quinnell *et al.*, 2001). Se cree que la respuesta linfoproliferativa depende de la genética y de la capacidad de respuesta inmune del propio hospedador, además del estado sanitario de éste.

-Ensayo de Inhibición (IFNB) y Efecto Citopático de IFN- δ

Esta prueba consiste en la detección de IFN- δ producido por los linfocitos circulantes en sobrenadantes de cultivo. Requiere el uso del virus de la estomatitis vesicular para infectar las células y estimular la producción de IFN- δ , que según Fernández-Bellón *et al.* (2005) es la citoquina más relevante de la respuesta inmune celular frente a *Leishmania*.

Ésta podría ser una prueba muy útil para la evaluación de la respuesta inmune celular, sin embargo, la complejidad de ejecución, además de la necesidad de utilizar un virus incluido en la lista A de la OMSA constituyen importantes inconvenientes.

Según las fuentes consultadas y el aprendizaje realizado en el área de parasitología de la Universidad de Zaragoza, un protocolo diagnóstico adecuado podría estructurarse de la siguiente manera:

En primer lugar, convendría realizar la valoración del estatus clínico del animal.

En segundo lugar, llevar a cabo una biopsia de médula ósea en costilla, y si no es posible, en nódulo linfático poplíteo o sangre y determinación de la presencia de DNA del parásito mediante PCR cuantitativa (qPCR) en un laboratorio acreditado y con experiencia).

Al mismo tiempo, y con los mismos condicionantes, es recomendable aplicar técnicas serológicas para la determinación y cuantificación de la presencia de anticuerpos específicos frente a *Leishmania*. La IFI y/o la AD son lo suficientemente fiables en términos de sensibilidad y especificidad. Otra opción puede ser un ELISA que esté estandarizado y monitorizado y haya demostrado suficientemente su repetibilidad.

2.5. Tratamiento

Varios medicamentos son los empleados en el tratamiento de la leishmaniosis canina, solos o en combinación unos con otros, dependiendo de la gravedad de la enfermedad. Los más importantes son: Antimoniato de meglumine (Glucantime), Alopurinol, Miltefosina, Aminosidina, Anfotericina B, Espiramicina y Marbofloxacin. (Solano-Gallego *et al.*, 2009). A todas estas sustancias se suma la Domperidona, estimulante de la respuesta inmune celular.

Los fármacos más utilizados en Europa son el Antimoniato de Meglumine (Glucantime) y la Miltefosina en combinación con Alopurinol. Estos compuestos consiguen mejorar la clínica del paciente temporalmente o incluso llegan a curar clínicamente al animal, pero no son capaces de eliminar la infección con absoluta fiabilidad. En general, la mayoría de los animales tratados experimentan una curación clínica, pero mantienen cargas parasitarias, que pueden causar una recurrencia de la enfermedad con signos clínicos. La respuesta al tratamiento varía dependiendo del estado inicial del paciente y de la reacción de cada perro a la terapia, es decir, es distinta en cada animal tratado.

En la práctica, es interesante encuadrar al animal en uno de los siguientes estadios según su grado de enfermedad. Esto nos ayudará a decidir el tratamiento adecuado:

-Estadio 1: leve. Títulos de anticuerpos bajos, con mínimas alteraciones clínico-patológicas, sin alteración renal. Tratamiento: Ninguno o alopurinol (10mg/Kg/12h). Pronóstico bueno.

-Estadio 2: moderado. Títulos de anticuerpos moderados o altos, sintomatología evidente, sin alteración renal. Tratamiento: Alopurinol (10 mg/kg/12h) y antimoniato de meglumine (50mg/Kg/12h, o 100mg/Kg/24h). Alternativa: Miltefosina. Pronóstico bueno-reservado.

-Estadio 3: grave. Títulos de anticuerpos elevados, depósitos de inmunocomplejos, signos clínicos muy evidentes, daño renal, el estado general aún es aceptable. Tratamiento: Alopurinol, Antimoniato de Meglumine. Alternativa: Miltefosina. Tratamiento de la enfermedad renal según su estadiaje en la escala IRIS. Pronóstico grave.

Estadio 4: muy grave. Estado general muy deteriorado, fallo renal. Tratamiento: tratar la enfermedad renal según su estadiaje en la escala IRIS. Controversia sobre el uso de Alopurinol (por el posible daño renal), tratar con Antimoniato de Meglumine. Pronóstico muy grave.

A nivel práctico, la medición de la proteinuria y la PCR cuantitativa pueden resultar útiles como indicadores de pronóstico.

El proteinograma nos dará información sobre la respuesta al tratamiento. Los niveles de gammaglobulinas se normalizan si el tratamiento es efectivo.

3. Justificación y objetivos

El diagnóstico específico de la leishmaniosis visceral canina (LVC) es un asunto en continuo desarrollo y que actualmente no está del todo resuelto. En la actualidad, existen dos tipos de diagnóstico específico: por un lado se encuentran los métodos de detección y cuantificación de ADN/ARN en órganos diana (PCR), y por el otro, la detección de anticuerpos específicos frente a *L. infantum*.

Se ha demostrado la necesidad de combinar las dos pruebas para realizar un diagnóstico correcto.

Diversos estudios sugieren la existencia de una alta correlación entre la carga parasitaria del animal y su nivel de anticuerpos séricos con respecto a la aparición de la enfermedad. Así, una carga parasitaria elevada, acompañada de títulos altos de anticuerpos, se correspondería con una leishmaniosis grave.

El título de anticuerpos puede ser detectado y cuantificado mediante tres tipos de pruebas serológicas, fundamentalmente. Éstas son la Inmunofluorescencia Indirecta (IFI) (Prueba de Oro), la Aglutinación Directa (AD) y el Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas (ELISA).

Se cree que existe relación entre los isotipos de IgG (IgG1 e IgG2) que aparecen y el tipo de respuesta inmune que desarrolla el animal infectado. De esta forma, se estima que un aumento de las IgG2 está relacionado con una respuesta inmunitaria tipo Th1 (que confiere resistencia a la infección) y un aumento de las IgG1 se relaciona con una respuesta inmunitaria tipo Th2 (no protección frente a la infección).

En base a estos antecedentes, nuestro estudio plantea una experiencia en perros (n=30) experimentalmente infectados con *L. infantum*, cuyo objetivo principal es determinar el valor pronóstico de la ratio IgG2/IgG1 e IgG total en la evolución clínica de la infección.

Para ello, se determinarán mediante ELISA comercial (Leiscan® de HIPRA) las IgG totales, IgG1 e IgG2 frente a la infección por *L. infantum* en suero.

Como objetivos secundarios, que ayudarán a conformar un estudio más completo, se llevarán a cabo IFI y AD de los sueros a modo de pruebas complementarias, en las cuales se identificarán anticuerpos totales.

Por último, se contrastarán los resultados con el cuadro clínico que mostrase el animal.

Las técnicas diagnósticas: ELISA, IFI y AD se realizarán en los laboratorios de Parasitología de la Facultad de Veterinaria, según los PNT autorizados.

4. Material y métodos

4.1. Animales

4.1.1. Criterios de inclusión

Para el presente trabajo se utilizaron 30 animales de la especie *Canis lupus familiaris* de la raza Beagle pertenecientes a un estudio realizado en el Departamento de Patología, Universidad de Zaragoza en colaboración con el Centro de Investigaciones Biológicas (CIB-CSIC) Madrid. Los animales participantes en el estudio fueron sometidos a análisis (hematología, bioquímica renal y hepática y electroforesis de proteínas séricas) para comprobar que no sufriesen ningún proceso parasitario o infeccioso antes de comenzar el experimento. Los resultados fueron normales para todos los individuos.

Todos estos animales fueron infectados experimentalmente con 10^8 promastigotes de *L. infantum* vehiculados en solución salina estéril.

4.1.2. Criterios de exclusión

Puesto que el objetivo del presente estudio era determinar los diferentes isotipos de IgG desarrollados por los animales frente a la infección por *L. infantum*, fueron apartados del estudio los perros que resultaron negativos a la serología mediante ELISA frente a *L. infantum*.

4.2. Confirmación de la infección y distribución de grupos

4.2.1. Evaluación del estatus serológico post-infección

Con el fin de confirmar la infección se procedió a la obtención de suero mediante extracción de sangre periférica para realizar Inmunofluorescencia Indirecta, Aglutinación Directa y ELISA a día 300 post infección.

4.2.2. Valoración de la sintomatología clínica y para-clínica post-infección

Durante la fase post-infección todos los animales fueron valorados clínicamente para determinar la presencia de signos clínicos asociados a la infección experimental con *L. infantum*. Los síntomas a valorar fueron los siguientes, en base a recomendaciones previas (Rodríguez-Cortés *et al.*, 2007): Mucosas anémicas, conjuntivitis, linfadenomegalia, atrofia muscular de las extremidades, atrofia muscular de músculos cefálicos temporales (mediante medida del diámetro craneal), lesiones cutáneas (alopecias,

úlceras, hiperqueratosis, onicogrifosis y dermatitis exfoliativa), y esplenomegalia. La presencia de estos signos clínicos se puntuó mediante una escala de 0 a 3 (0=ausencia, 1=leve o unilateral, 2=moderado o bilateral, 3=generalizado o grave). La suma de las puntuaciones de cada paciente nos ayudó a elaborar un score clínico, que nos permitió clasificar a los animales en función de su estatus clínico (de más leve a más severo).

4.3. Bienestar animal

El mantenimiento del bienestar animal y de la salud de los individuos participantes en el estudio, así como su identificación y seguimiento clínico, fueron garantizados por veterinarios cualificados de acuerdo a la legislación española actual (RD 53/2013). El alojamiento, manejo y alimentación de los animales se llevaron a cabo conforme a los requisitos etológicos del animal empleado en la investigación, asegurando la ausencia de estrés asociado al confinamiento prolongado. Todos los procedimientos fueron realizados por personal especializado y previamente entrenado.

4.4. Toma de muestras

Alcanzado el día 300 post-infección, se obtuvo sangre entera a partir de la vena cefálica o yugular, recogiendo en tubo sin anticoagulante con gránulos inertes para rápida retracción del coágulo (aproximadamente 2 mL). A partir de ella, se obtuvo suero mediante centrifugación (10 minutos, 2500 rpm, 21°C), para su posterior análisis. Las muestras fueron almacenadas a -21°C hasta su procesamiento.

4.5. Estudio serológico

La determinación de anticuerpos en suero se llevó a cabo usando distintas técnicas serológicas: IFI, DAT y ELISA. Las tres son técnicas serológicas cuantitativas.

La Inmunofluorescencia Indirecta (IFI) es una técnica en la cual se utiliza antígeno completo de promastigotes (hecho en el laboratorio). En nuestro caso, el punto de corte a partir del cual se considera al animal seropositivo se estableció en la dilución 1:80 (Rodríguez-Cortés *et al.*, 2012) (Tabla 4). Se trata de una técnica subjetiva, ya que la lectura se realiza al microscopio de fluorescencia. El desarrollo de la técnica se realizó en base a los PNTs del Departamento de Parasitología de la Facultad de Veterinaria de Zaragoza (grupo de investigación “Vector Borne Diseases”).

Tabla 4. Interpretación IFI
<1/40 Negativo
1/40 Dudoso
>1/80 Positivo

Para la determinación de anticuerpos IgG totales, IgG1 e IgG2 se utilizó el test comercial ELISA Leiscan® de HIPRA. El protocolo seguido fue el indicado en el kit para la determinación de IgG totales. En el caso de las IgG1 e IgG2, el kit comercial fue modificado mediante la incorporación de nuevos conjugados de anticuerpos (Goat anti-dog IgG1 HRP-conjugated y Sheep anti-dog IgG2 HRP-conjugated, ambos de Bethyl Laboratories). Los conjugados de IgG1 e IgG2 se utilizaron diluidos en solución 1% de BSA (albúmina sérica bovina) en PBS (tampón fosfato salino). Las diluciones realizadas fueron 1:15000 para IgG1, y 1:20000 para IgG2. El punto de corte utilizado para diferenciar seropositivos de seronegativos fue el indicado en dicho kit comercial (Razón > 1,1) (Tabla 5).

Siguiendo el protocolo del kit ELISA utilizado para la evaluación serológica (Leiscan®), los resultados de cada subclase de anticuerpos se expresaron mediante el ratio “IgG muestra/IgG control positivo bajo”, lo cual facilitó su comparación e interpretación posterior. Además, siguiendo el trabajo realizado por otros autores (Rostamian *et al.*, 2015), se calculó el ratio IgG2/IgG1 como posible indicador del pronóstico de la enfermedad. En varias publicaciones se relacionan valores elevados de este ratio con un predominio de la respuesta inmunitaria tipo Th1, y el desarrollo de protección frente a la enfermedad, mientras que valores menores de dicho ratio estarían relacionados con un predominio de la respuesta inmunitaria tipo Th2, que supone que los animales sean susceptibles a la aparición de sintomatología.

Tabla 5. Interpretación ELISA Leiscan®		
Razón (Rz) de la muestra	Resultado	Correspondencia IFI
Razón de la muestra < 0,5	Negativo	Negativo
0,5 < Rz < 0,7	Negativo	1/20 a 1/40
0,7 < Rz < 0,9	Negativo	1/40 a 1/80
0,9 < Rz < 1,1	Dudoso	1/80
1,1 < Rz < 1,5	Positivo bajo	1/80 a 1/160
1,5 < Rz	Positivo	>1/160

La técnica DAT fue llevada a cabo siguiendo los PNTs del Departamento de Parasitología de la Facultad de Veterinaria de Zaragoza (grupo de investigación “Vector Borne Diseases”). El punto de corte fue establecido en la dilución 1/800 (Tabla 6).

Tabla 6. Interpretación DAT
<1/200 Negativo
1/400 Dudoso
>1/800 Positivo

4.6. Análisis de datos

En primer lugar, se procedió al análisis descriptivo de los datos mediante el cálculo de frecuencias, medias y desviación estándar. Como pruebas de contraste estadístico, tras comprobar la normalidad de las variables cuantitativas mediante la prueba de *Kolmogorov-Smirnov*, se procedió a realizar la prueba *T de Student* para muestras independientes para así comparar las medias de IgG totales, IgG1 e IgG2 entre los diferentes grupos de animales establecidos en el estudio. Dichos resultados se expresaron mediante diagramas de cajas.

Además, para comprobar si los niveles de IgG1 e IgG2 fueron proporcionales a la gravedad de la enfermedad (evaluada mediante el score clínico), se planteó un análisis de regresión lineal de Pearson.

5. Resultados

Mediante las tres pruebas serológicas utilizadas (IFI, DAT y ELISA) se obtuvieron resultados concordantes en cuanto a seropositividad/seronegatividad de los individuos. A partir de aquí, el estudio se centró en el análisis de resultados obtenidos mediante ELISA.

De los 30 animales analizados, un 80% (24/30) presentó anticuerpos frente a la infección por *L. infantum* a día 300 post-infección, siendo valorados mediante el kit de ELISA Leiscan® (HIPRA) frente a un 20% (6/30) que no presentó anticuerpos. Además, un 90% (27/30) de los animales presentó signos clínicos compatibles con la enfermedad (valorados mediante el score clínico), frente a un 10% (3/30) que no mostró clínica. Esta prevalencia de enfermedad es lógica, ya que los animales proceden de un estudio en el que se realizó una infección experimental, con lo cual, lo esperable es que todos ellos desarrollasen la enfermedad. La

existencia de 3 animales asintomáticos podría deberse a la diversidad inmunitaria individual existente, que provoca que algunos individuos sean capaces de mostrar cierta resistencia natural a la enfermedad.

En función del estado clínico y serológico observado, se establecieron 3 grupos de animales en el estudio:

- Seronegativos clínicos (n=6).
- Seropositivos subclínicos (n=3).
- Seropositivos clínicos (n=21).

Puesto que el parámetro a valorar son las diferentes cantidades de IgG que presentaron los animales, se decidió excluir del estudio a todos aquellos que resultaron seronegativos al primer test de ELISA. Una posible explicación a la presencia de estos animales seronegativos clínicos podría ser que estos perros presentaban una sintomatología leve y a lo largo del estudio mostraron un ligero nivel de anticuerpos, si bien en ningún caso llegaron a sobrepasar el punto de corte para ser considerados positivos.

En la tabla 7 se muestran las medias \pm desviación estándar del Ratio de las absorbancias obtenidas para las IgG1, IgG2, IgG totales y Ratio IgG2/IgG1 por grupos.

Tabla 7. Absorbancias reflejadas por los distintos subtipos de IgG								
	Ratio IgG1		Ratio IgG2		Ratio IgGTotales		Ratio IgG2/IgG1	
Grupo animal	Media	DE	Media	DE	Media	DE	Media	DE
Seropositivo subclínico (n=3)	2,06	0,33	1,96	0,07	3,56	0,16	0,97	0,18
Seropositivo clínico (n=21)	7,41	7,4	1,77	0,30	3,12	0,8	0,55	0,42
p-valor	0,004*		0,032*		0,363		0,112	

*Significación según la prueba de t de Student

Se puede apreciar que los valores del Ratio IgG1 son mayores en los animales que desarrollaron signos clínicos de enfermedad. Además, los valores obtenidos para el Ratio IgG2/IgG1 resultaron menores en el caso de aquellos animales que mostraban enfermedad clínica. Este hallazgo parece sugerir el posible valor pronóstico del Ratio IgG2/IgG1 como indicador de la enfermedad.

Por otro lado, en la tabla 7 también puede observarse que los valores de IgG2 e IgG totales se mantienen más o menos constantes entre los dos grupos.

Para confirmar o rechazar la validez estadística de estos hallazgos, se recurrió al análisis estadístico de los datos. Tras comprobar la normalidad de las variables cuantitativas, se llevó a cabo la prueba *T de Student* para muestras independientes. Los valores p obtenidos pueden observarse en la tabla.

Tras el análisis de resultados, podemos confirmar que las principales diferencias entre seropositivos subclínicos y seropositivos clínicos se encontraron con respecto a los niveles de IgG1, siendo los animales con desarrollo clínico de la enfermedad los que presentaron niveles más elevados de IgG1 ($p= 0,004$). En relación a los niveles de IgG2, estas diferencias fueron más leves, aunque también significativas ($p= 0,032$), siendo en este caso los animales seropositivos sin signos clínicos los que presentaron un valor más elevado de IgG2. En el caso de las IgG totales y el ratio IgG2/IgG1, no se encontraron diferencias significativas.

En las siguientes gráficas se representa la media, desviación estándar y rango intercuartílico de los ratios IgG1 e IgG2 para los animales con signos clínicos (izquierda) y asintomáticos (derecha):

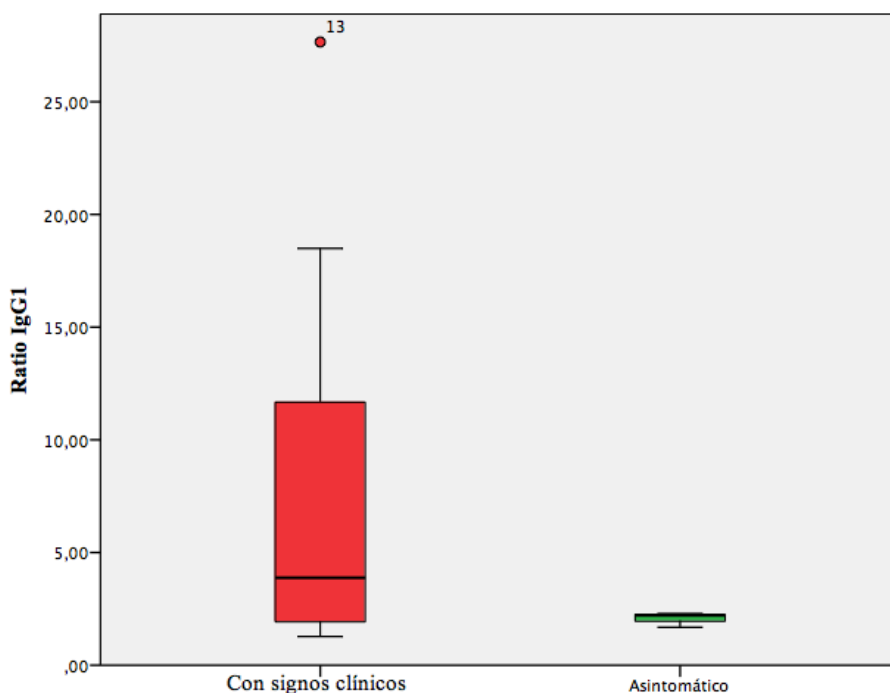


Figura 3. Comparación del Ratio IgG1 entre animales con signos clínicos y asintomáticos.

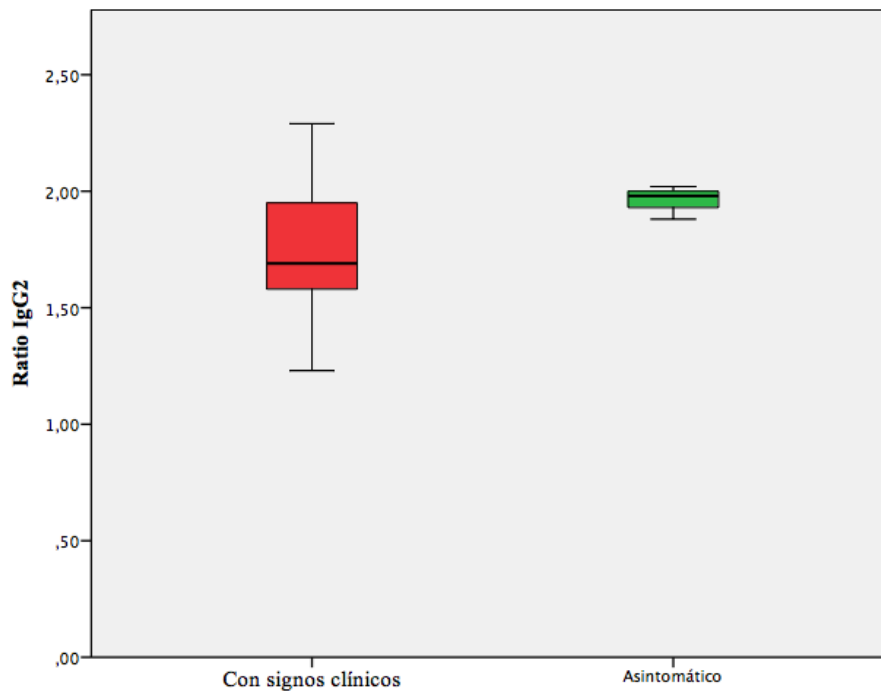


Figura 4. Comparación del Ratio IgG2 entre animales con signos clínicos y asintomáticos.

Por último, para comprobar si el aumento de las IgG1 e IgG2 fue proporcional a la gravedad de la enfermedad (score clínico) se planteó un análisis de regresión lineal de Pearson. Los valores obtenidos para cada subclase de IgG fueron los siguientes:

-IgG1/Score clínico: $R^2=0,058$; $p=0,134$

-IgG2/Score clínico: $R^2=0,03$; $p=0,793$

Aparentemente, en nuestro estudio no existe una relación significativa entre los niveles de IgG1 e IgG2 y el score clínico de los animales o gravedad de la enfermedad. Tan sólo en un 5,8% y un 3% de los animales, los niveles de IgG1 e IgG2 se vieron aumentados respectivamente con el aumento del score clínico.

5.1.Discusión

En 1995, Deplazes *et al.* señalaron que las IgG específicas (IgG1 e IgG2) resultaban más fiables como indicadores del estatus sanitario de un animal infectado por *L. infantum* que las IgG totales. Tras la interpretación de los resultados, los hallazgos obtenidos en nuestro experimento fueron los siguientes:

-Los animales que desarrollaron sintomatología mostraron unos valores de IgG1 significativamente mayores que los correspondientes a aquellos animales asintomáticos. Con lo cual, parece posible asociar el aumento de IgG1 al desarrollo de signos clínicos.

-El Ratio IgG2/IgG1, considerado por ciertos autores como valor pronóstico de la evolución de la leishmaniosis canina, resultó más elevado en los animales subclínicos, lo cual apoyaría los hallazgos de estos autores, que asocian valores elevados de este Ratio con respuestas protectoras frente a la enfermedad. Sin embargo, la diferencia de ratios entre los animales clínicos y asintomáticos no es tan elevada como para considerarse significativa, por lo que no podemos asegurar la existencia de una asociación clara entre el valor de este Ratio y la respuesta del paciente a la enfermedad.

Una de las hipótesis que parece demostrarse en nuestro estudio es aquella que asocia los altos niveles de IgG2 con el desarrollo de una respuesta inmune tipo Th1, lo cual proporciona al individuo protección frente a la enfermedad. Al contrario, los niveles elevados de IgG1, que en nuestro trabajo se han relacionado con el desarrollo de signos clínicos, se asocian según varios artículos al predominio de la respuesta inmune tipo Th2, que confiere al individuo susceptibilidad frente al desarrollo de la enfermedad (Cardoso *et al.*, 2007; Rodríguez-Cortés *et al.*, 2007). Otros autores (Iniesta *et al.*, 2007), también apoyan esta asociación entre niveles de anticuerpos y tipos de respuesta inmune desarrollada.

Rostamian *et al.* (2015) llevaron a cabo un estudio en ratones que consiguió demostrar que un Ratio IgG2/IgG1 con valor elevado se asocia a un pronóstico positivo en animales infectados por *L. tropica*. Así mismo, afirman que la aparición de niveles altos de IgG2 está relacionada con la creación de inmunidad protectora frente al parásito. Señalan además que este Ratio con valores elevados puede asociarse a respuestas inmunes protectoras en infecciones por distintas especies de Leishmania, entre ellas *L. tropica*, *L. major* y *L. donovani*, y por qué no, en nuestro caso, *L. infantum*. Por tanto, este estudio coincide con el nuestro, ya que nuestros animales asintomáticos mostraron valores mayores del Ratio IgG2/IgG1 que los individuos con signos clínicos, hallándose además valores más elevados de IgG2 en el grupo de asintomáticos.

Uno de los hallazgos más significativos que obtuvimos en nuestra experiencia fue la observación de una diferencia clara en los niveles de IgG1 entre animales con enfermedad clínica (elevados) y asintomáticos (menores). Según Nieto *et al.* (1999), el análisis de las subclases de IgG en perros infectados aporta evidencias sobre una correlación directa entre la inducción de altos niveles de IgG1 y la aparición de signos característicos de la enfermedad. En un estudio realizado por Solano-Gallego *et al.* (2000), que pretendía demostrar la resistencia superior del podenco ibicenco a la infección por *L. infantum* en comparación con las otras razas caninas, los resultados obtenidos al analizar sueros de los perros asintomáticos son coincidentes con las afirmaciones anteriores.

Cabe señalar que en la bibliografía existe también algún trabajo cuyas conclusiones resultan contrarias a las extraídas de este estudio, registrando valores de IgG2 mayores en los animales sintomáticos, mientras que las IgG1 oscilaban sin ningún patrón lógico apreciable, o mostrando incremento generalizado de los anticuerpos al aparecer los signos clínicos, sin superioridad clara de ningún isotipo (Quinnell *et al.*, 2003; Strauss-Ayali *et al.*, 2007). Según Iniesta *et al.* (2007), la no concordancia en los niveles de inmunoglobulinas observados entre distintos estudios, en respuesta a la infección por *L. infantum*, puede deberse a diferencias en el kit diagnóstico utilizado o en los conjugados empleados en éste, además de al escaso número de animales participantes en algunos de los estudios.

Lo verdaderamente interesante de estos hallazgos es su aplicación práctica. Encontrar indicadores de la evolución de la enfermedad en un paciente nos permitiría comprobar si el tratamiento aplicado está resultando efectivo o si, por el contrario, debemos intensificar la terapia. Deplazes *et al.* (1995) ya analizaron la evolución de inmunoglobulinas específicas tras tratamiento, comprobando que tras administrar Antimoniato de Meglumine (Glucantime®, Rhône-Mérieux) durante un periodo de tiempo prolongado, los animales mejoraron su estatus clínico, además de sufrir un descenso en sus niveles de IgG1, mientras que las IgG2 se mantuvieron constantes. Estos datos sugieren un cambio en la respuesta inmune, desde la Th2 a la Th1, convirtiéndose el individuo susceptible en inmunocompetente frente al parásito, lo cual sería un indicador de buen pronóstico.

De la misma manera, Ferrer *et al.* (2000) comprobaron que aquellos animales que experimentaban una recuperación clínica tras tratamiento, sufrían una caída rápida de los niveles de IgG1, seguida de un descenso más lento y menos pronunciado de las IgG2, lo cual, según el investigador, era indicativo de buen pronóstico y podía resultar muy útil en la labor del clínico.

Por tanto, en base a todo lo mencionado con anterioridad, parece interesante insistir en la investigación de dichos aspectos, que posiblemente sean una herramienta diagnóstica muy útil en un futuro.

6. Conclusiones

El análisis de los resultados extraídos de nuestro experimento nos permite constatar varios supuestos:

-En primer lugar, parece cierta la hipótesis que relaciona cada tipo de respuesta inmunitaria celular con su correspondiente respuesta humoral (Th1 con predominio de IgG2 y Th2 con mayoría de IgG1), lo cual condiciona la progresión o el control de la enfermedad (la respuesta tipo Th1 consigue hacer frente a la enfermedad, mientras que la Th2 convierte al individuo en susceptible).

-Por otro lado, los resultados de la serología nos mostraron un aumento significativo de los niveles de IgG1 en animales con enfermedad clínica, con respecto a los individuos seropositivos asintomáticos, lo cual nos permite establecer la relación entre el ascenso de las IgG1 y la aparición de signos clínicos.

-Toda esta investigación fue llevada a cabo con el objetivo de comprobar el posible valor pronóstico de la serología de IgG específicas sobre la evolución de la leishmaniosis en pacientes infectados. La interpretación de los datos recogidos invita a pensar que en un futuro sí podrán usarse estos parámetros como guía para decidir la aplicación de un tratamiento más o menos agresivo, para valorar las opciones de mejoría clínica antes de establecer un tratamiento, o para comprobar si la terapia aplicada está dando buenos resultados.

Conclusions

Some theories can be confirmed by analysing the results of our experiment:

- Firstly, It seems to be true the hypothesis that connects each kind of cellular immune response with its pertinent humoral response (Th1 with IgG2 predominance, and Th2 with IgG1 majority), what determines the progression or the control of the disease (Th1-like response gets to face the disease, while Th2-like response makes the individual susceptible).

-What's more, the serology results showed us a significant rise at the IgG1 levels in animals with clinical disease, compared to the group of asymptomatic and seropositive animals, what lets us establish the relationship between the IgG1 rise and the appearance of clinical signs.

- The whole investigation was carried out just to confirm the possible prognostic value of the specific IgG serology about the evolution of leishmaniasis in infected patients. The collected data processing lets us think that it will be possible to use those parameters to decide about the administration of a more intense treatment, in order to value the options of clinical improvement before applying a treatment, and also to confirm if the therapy is giving results.

7. Valoración personal

Elegí el Laboratorio de Parasitología (grupo de investigación consolidado "Vector Borne Diseases") para llevar a cabo mi Trabajo de Fin de Grado con la única intención de aprender lo máximo posible sobre la leishmaniosis, una enfermedad que me ha llamado mucho la atención desde que comencé mis estudios en veterinaria.

Tras todo un curso leyendo, investigando y trabajando en laboratorio sobre aspectos relacionados con esta enfermedad, me he dado cuenta de que se trata de una patología de enorme complejidad desde el punto de vista inmunológico, sobre la cual falta mucho por descubrir.

La elaboración de este trabajo me ha dado la oportunidad de acceder a información de actualidad escrita por los mejores investigadores en este campo, además de poder realizar las técnicas que se usan habitualmente en el laboratorio para el diagnóstico de dicha enfermedad.

Si bien el experimento que planteamos ha tenido que ser algo limitado en cuanto a medios por tratarse de un Trabajo de Fin de Grado y no de una tesis, o de un proyecto financiado por una gran comercial, me ha permitido familiarizarme con el protocolo de elaboración de estos estudios, el cual desconocía totalmente.

Como futuras propuestas, resultaría muy interesante seguir adaptando los conjugados de IgG específicas al kit comercial que se emplee, estandarizando la concentración de cada subtipo de IgG de los controles utilizados. De la misma manera, sería de gran utilidad llevar a cabo este mismo experimento de manera longitudinal, pudiendo comprobar así la evolución de los niveles de cada tipo de IgG y el estado clínico de cada animal a lo largo del tiempo de duración del estudio.

8. Bibliografía

- Akira S, Ohkusu K, Yoshimoto T, Takeda K, Ogura T, Kashiwamura S, *et al.* Potentiality of interleukin-18 as a useful reagent for treatment and prevention of *Leishmania major* infection. *Infect Immun* 2000(68):2449-2456.
- Almeida M, Jesus E, Sousa-Atta M, Alves L, Berne M, Atta A. 2005 Jun 15;106(1-2):151-8. Antileishmanial antibody profile in dogs naturally infected with *Leishmania chagasi*. *Vet Immunol Immunopathol* 2005:151-158.
- Alvar J, Cañavate C, Molina R, Moreno J, Nieto J. Canine leishmaniasis. *Adv Parasitol* 2004;57:1-88.
- Amusatogui I. Tratamiento de la leishmaniosis canina: valoración, caracterización y comparación de la respuesta a distintos protocolos a base de antimonio de meglumine (asociado o no a alopurinol). Tesis doctoral, Universidad Complutense de Madrid 1998.
- Baleeiro C, Paranhos-Silva M, dos Santos J, Oliveira G, Nascimento E, de Carvalho L, *et al.* Montenegro's skin reactions and antibodies against different *Leishmania* species in dogs from a visceral leishmaniosis endemic area. *Vet Parasitol* 2008;139:21-28.
- Baneth G, Aroch I. Canine leishmaniasis: a diagnostic and clinical challenge. *Baneth G, Aroch I. Vet J* 2008;175.
- Barrouin-Melo S, Larangeira D, de Andrade Filho F, Trigo J, Julião F, Franke C, *et al.* Can spleen aspirations be safely used for the parasitological diagnosis of canine visceral leishmaniosis? A study on asymptomatic and polysymptomatic animals. *Vet J* 2006;171:331-339.
- Bogdan C, Gessner A, Rölinghoff M. Cytokines in leishmaniasis: a complex network of stimulatory and inhibitory interactions. *Immunobiol* 1993:356-396.
- Bogdan C, Moll H, Solbach W, Rölinghoff M. Tumor necrosis factor-alpha in combination with interferon-gamma, but not with interleukin 4 activates murine macrophages for elimination of *Leishmania major* amastigotes. *Eur J Immunol* 1990;20(5):1131-1135.
- Borst P, Hoeijmakers J. Kinetoplast DNA. *Plasmid* 1979(2):20-40.
- Botet Fregola J, Portús Vinyeta M. Leishmaniasis in peninsular Spain. A historical-bibliographic review (1912-1985). *Rev Sanid Hig Publica (Madr)* 1993:255-266.
- Brachelente C, Müller N, Doherr MG, Sattler U, Welle M. Cutaneous leishmaniasis in naturally infected dogs is associated with a T Helper-2-biased immune response. *Vet Pathol* 2005(42):166-175.
- Campino L, Santos-Gomes G, Riça Capela M, Cortes S, Abranches P. Infectivity of promastigotes and amastigotes of *Leishmania infantum* in a canine model for leishmaniosis. *Vet Parasitol* 2000:269-275.

- Cardoso L, Neto F, Sousa J, Rodrigues M, Cabral M. Use of leishmanin skin test in the detection of canine Leishmania-specific cellular immunity. *Vet Parasitol* 1998;79:213-220.
- Castillo J. Diagnóstico de la leishmaniosis visceral (LVC). XVII Simposio Anual AVEDILA 2012 18/10/2012:95.
- Cavaliero T, Arnold P, Mathis A, Glaus T, Hofmann-Lehmann R, Deplazes P. Clinical, serologic, and parasitologic follow-up after long-term allopurinol therapy of dogs naturally infected with *Leishmania infantum*. *J Vet Intern Med* 1999;13:330-334.
- Chamizo C, Moreno J, Alvar J. Semi-quantitative analysis of cytokine expression in asymptomatic canine leishmaniasis. *Vet Immunol Immunopathol* 2005;103:67-75.
- Chan M. T cell response in murine *Leishmania mexicana amazonensis* infection: production of interferon- γ by CD8+ cells. *Eur J Immunol* 1993.
- de Paiva-Cavalcanti M, Silva R, Pessoa-e-Silva R, Mendonça L, da Cunha S, de Hollanda d, et al. Leishmaniasis diagnosis: an update on the use of immunological and molecular tools. *Cell & Biosc* 2015(5):31.
- Deplazes P, Smith NC, Arnold P, Lutz H, Eckert J. Specific IgG1 and IgG2 antibody responses of dogs to *Leishmania infantum* and other parasites. *Parasite Immunol.* 1995; 17(9):451-458.
- Dereure J, Pratlong F, Dedet J. Geographical distribution and the identification of parasites causing canine leishmaniasis in the Mediterranean Basin. Proceedings of a Canine Leishmaniasis Forum, Barcelona (Sitges) 28-31 January 1999:18-25.
- el Harith A, Slappendel R, Reiter I, van Knapen F, de Korte P, Huigen E, et al. Application of a direct agglutination test for detection of specific anti-Leishmania antibodies in the canine reservoir. *J Clin Microbiol* 1989:2252-2257.
- Fernández-Bellón H, Solano-Gallego L, Rodríguez A, Rutten V, Hoek A, Ramis A, et al. Comparison of three assays for the evaluation of specific cellular immunity to *Leishmania infantum* in dogs. *Vet Immunol Immunopathol* 2005;107:163-169.
- Ferreira E, de Lana M, Carneiro M, Barbosa A, Vieira D, E da Silva E, et al. Comparison of serological assays for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis in animals presenting different clinical manifestations. *Vet Parasitol* 2007;146:235-241.
- Ferrer L. Clinical aspects of canine leishmaniosis: an update. Proceedings of the International Canine Leishmaniasis Forum Barcelona, Spain 1999:6-10.
- Ferrer L, Roura X. Signos clínicos de la leishmaniosis canina. *PV Argos* 2016 (21/2016).
- Ferrer L, Solano-Gallego L, Arboix M, Alberola J. Evaluation of the specific immune response in dogs infected by *Leishmania infantum*.. *Advances in Veterinary Dermatology* 2000.
- Ferroglio E, Centaro E, Mignone W, Trisciuglio A. Evaluation of an ELISA rapid device for the serological diagnosis of *Leishmania infantum* infection in dog as compared with immunofluorescence assay and Western blot. *Vet Parasitol* 2007;144:162-166.
- Francino O, Altet L, Sánchez-Robert E, Rodríguez A, Solano-Gallego L, Alberola J, et al. Advantages of real-time PCR assay for diagnosis and monitoring of canine leishmaniosis. *Vet Parasitol* 2006;137:214-221.
- Gomes Y, Paiva Cavalcanti M, Lira R, Abath F, Alves L. Diagnosis of canine visceral leishmaniasis: biotechnological advances. *Vet J* 2008;175:45-52.
- Gómez-Ochoa P. Estudio de un nuevo tratamiento de la leishmaniosis canina. Valoración del efecto inmunomodulador de la domperidona. Tesis doctoral 2004.
- Gradoni L, Gramiccia M. Leishmaniasis, In OIE manual of standards for diagnostic tests and vaccine. 4th ed Office International des Epizooties, Paris, France 2002:803-812.
- Griffiths W. Old World cutaneous leishmaniosis. *The leishmaniasis in Biology and Medicine* ;2:617-636.
- Heinzel F, Sadick M, Holaday B, Coffman R, Locksley R. Reciprocal expression of interferon gamma or interleukin 4 during the resolution or progression of murine leishmaniasis. Evidence for expansion of distinct helper T cell subsets. *J Exp Med* 1989;169:59-72.
- Ikeda-García FA, Lima VMF, Laurenti MD, Day MJ, Rosa FA, Gomes AAD, et al. Evaluation of the four IgG subclasses in symptomatic dogs with *Leishmania sp.* and in dogs vaccinated against visceral leishmaniasis. Proceedings of the 34th World Small Animal Veterinary Congress WSAVA 2009.
- Iniesta L. Diagnóstico de la leishmaniosis críptica en el perro. Expresión isotípica e idiotípica de los anticuerpos producidos en distintas fases de la infección. Universitat de Barcelona 2007.

- Iniesta L, Fernández-Barredo S, Bulle B, Gómez M, Piarroux R, Gállego M, et al. Diagnostic techniques to detect Cryptic Leishmaniasis in dogs. Universitat de Barcelona 2002.
- Jiménez M, González E, Martín-Martín I, Hernández S, Molina R. Could wild rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) be reservoirs for *Leishmania infantum* in the focus of Madrid, Spain?. *Vet Parasitol* 2014 May 28(202(3-4)):296-300.
- Kaye P, Scott P. Leishmaniasis: complexity at the host–pathogen interface. *Nat Rev Microb* 2011; 9:604-615.
- Kemp K, Kemp M, Kharazmi A, Ismail A, Kurtzhals J, Hvid L, et al. Leishmania-specific T cells expressing interferon-gamma (IFN-g) and IL-10 upon activation are expanded in individuals cured of visceral leishmaniasis. Centre for Medical Parasitology at Laboratory Centre and RHIMA Centre, Copenhagen University Hospital (Rigshospitalet), and Institute for Medical Microbiology and Immunology, University of Copenhagen, Copenhagen, Denmark, and Institute of Endemic Diseases 1999.
- Lariviere M, Beauvais B, Derouin F, Traore F. *Parasitologie Medicale. Par Med* 1987:55-62.
- Lebel-Binay S, Berger A, Zinzindohoué F, Cugnenc P, Thiounn N, Fridman W, et al. Interleukin-18: biological properties and clinical implications. *Eur Cytokine Netw* 2000;11:15-26.
- Liarte D, Mendonça I, Luz F, Abreu E, Mello G, Farias T, et al. QBC for the diagnosis of human and canine american visceral leishmaniasis: preliminary data. *Rev Soc Bras Med Trop* 2001; 34:577-581.
- Liew FY, Hale C, Howard JG. Immunological regulation of experimental cutaneous leishmaniasis. V. Characterisation of effector and specific suppressor T cells. *J Immunol* 1982;128:1917-1922.
- Liew FY, O'Donnell CA. Immunology of leishmaniasis. *Adv Parasitol (Academic Press)* 1993;32:161-259.
- Llinas J, Gómez-Ochoa P, Sabate D, Homedes J, Ferrer L. Clinical efficacy of a domperidone-based treatment program for the prevention of canine leishmaniosis. Southern European Veterinary Congress, Barcelona 2011.
- Lucientes J, Palmero J, Guarga J, Gracia M, Peribáñez M, Zárata J, et al. Risk of transmission of canine leishmaniosis in eastern Spain. *Vet Rec* 2005(156):743-744.
- Maia C, Campino L. Methods for diagnosis of canine leishmaniasis and immune response to infection. *Vet Parasitol* 2008 25 July 2008(158):274-287.
- Maia C, Ramada J, Cristóvão J, Gonçalves L, Campino L. Diagnosis of canine leishmaniasis: conventional and molecular techniques using different tissues. *Vet J* 2007;179:142-144.
- Mancianti F, Pedonese F, Poli A. Evaluation of dot enzyme-linked immunosorbent assay (dot-ELISA) for the serodiagnosis of canine leishmaniosis as compared with indirect immunofluorescent assay. *Vet Parasitol* 2002;65:1-9.
- Manna L, Reale S, Vitale F, Picillo E, Pavone L, Gravino A. Real-time PCR assay in *Leishmania*-infected dogs treated with meglumine antimoniate and allopurinol. *Vet J* 2008;177:279-282.
- Maüel J, & Behin R. Immunology of Leishmaniasis. *Biochemistry and Physiology of Protozoa* 1981;4:385-429.
- Meredith S, Kroon N, Sondorp E, Seaman J, Goris M, van Ingen C, et al. Leish-KIT, a stable direct agglutination test based on freeze-dried antigen for serodiagnosis of visceral leishmaniasis. *J Clin Microbiol* 1995;33:1742-1745.
- Mettler M, Grimm F, Capelli G, Camp H, Deplazes P. 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* 2005;43:5515-5519.
- Millán J, Travaini A, Zanet S, López-Bao JV, Trisciuglio A, Ferroglio E, et al. Detection of *Leishmania* DNA in wild foxes and associated ticks in Patagonia, Argentina, 2000 km south of its known distribution area. *Par & Vect* 2016.
- Miró G, Cardoso L, Pennisi MG, Oliva G, Baneth G. Canine leishmaniosis--new concepts and insights on an expanding zoonosis: part two. *Trends Parasitol* 2008;24:371-377.
- Mohebbi M, Javadian E, Yaghoobi-Ershadi M, Akhavan A, Hajjaran H, Abaei M. Characterization of *Leishmania* infection in rodents from endemic areas of the Islamic Republic of Iran. *East Mediterr Health J* 2004;10:591-599.
- Molina R, Jiménez M, Cruz I, Iriso A, Martín-Martín I, Sevillano O, et al. The hare (*Lepus granatensis*) as potential sylvatic reservoir of *Leishmania infantum* in Spain. *Vet Parasitol* 2012 Nov 23(190(1-2)):268-271.
- Montenegro J. A cutis-reaccao na leishmaniose. *Ann Fac Med Univ Sao Paulo* 1926:323-330.
- Moody S, Handman E, McConville M, Bacic A. The structure of *Leishmania major* amastigote lipophosphoglycan. *J Biol Chem* 1993 Sep 5;268(25):18457-66 1993 Sep. 5(268 (25)):457-466.
- Moreira M, Luvizotto M, Garcia J, Corbett C, Laurenti M. Comparison of parasitological, immunological and molecular methods for the diagnosis of leishmaniasis in dogs with different clinical signs. *Vet Parasitol* 2007;145:245-252.

- Moreno J, Nieto J, Chamizo C, González F, Blanco F, Barker DC, *et al.* The immune response and PBMC subsets in canine visceral leishmaniasis before, and after, chemotherapy. *Vet Immunol and Immunopathol* 1999;71:181-195.
- Morillas F, Benavides I, Gonzalez J, Reyes A, Valero A. Découverte de *Leishmania* spp. dans le *Rattus rattus* de la Province de Grènade (Espagne). *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée* 1985(60):768-770.
- Müller I, Kropf P, Etges R, Louis J. Gamma interferon response in secondary *Leishmania major* infection: role of CD8+ T cells. *Infect Immun* 1993;61(3730):3738.
- Murray HW, Stern JJ, Welte K, Rubin BY, Carreiro SM, Nathan CF. Experimental visceral leishmaniasis: production of Interleukin-2 and interferon- γ , tissue immune reaction and response to treatment with interleukin-2 and interferon- γ . *J Immunol* 1987;138:2290-2297.
- Oliva G, Scalone A, Foglia Manzillo V, Gramiccia M, Pagano A, Di Muccio T, *et al.* 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* 2006;44:1318-1322.
- Organización Mundial de la Salud. Leishmaniasis. Nota descriptiva N° 375 2015 Febrero 2015. Disponible en <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/es/>. [Acceso 17/7/2016].
- Pennisi M, De Majo M, Masucci M, Britti D, Vitale F, Del Maso R. Efficacy of the treatment of dogs with leishmaniasis with a combination of metronidazole and spiramycin. *Vet Rec* 2005 156:346-349.
- Peris A. Estudio seroepidemiológico de la dinámica de infección de *Leishmania infantum* en poblaciones caninas del valle medio del Ebro. Tesis doctoral 2010.
- Pinelli E, Killick-Kendrick R, Wagenaar J, Bernadina W, del Real G, Ruitenber J. Cellular and humoral immune responses in dogs experimentally and naturally infected with *Leishmania infantum*. *Infect Immun* 1994;62(1):229-235.
- Porrozzì R, Santos da Costa M, Teva A, Falqueto A, Ferreira A, dos Santos C, *et al.* Comparative evaluation of enzyme-linked immunosorbent assays based on crude and recombinant leishmanial antigens for serodiagnosis of symptomatic and asymptomatic *Leishmania infantum* visceral infections in dogs. *Clin Vaccine Immunol* 2007;14:544-548.
- Quinnell R, Courtenay O, Shaw M, Day M, Garcez L, Dye C, *et al.* Tissue cytokine responses in canine visceral leishmaniasis. *J Infect Dis* 2001;183:1421-1424.
- Rajasekariah G, Cardoso L, Dogcio D, Martin S, Smithyman A. A novel exo-antigen-based ELISA for the detection of canine leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* 2008;78:616-623.
- Ramiro MJ, Zárate JJ, Hanke T, Rodríguez D, Rodríguez JR, Esteban M, *et al.* Protection in dogs against visceral leishmaniasis caused by *Leishmania infantum* is achieved by immunization with a heterologous prime-boost regime using DNA and vaccinia recombinant vectors expressing LACK. *Vaccine* 2003;21:2474-2484.
- Ramos I, Alonso A, Marcén JM, Peris A, Castillo JA, Colmenares M, *et al.* Heterologous prime-boost vaccination with a non-replicative vaccinia recombinant vector expressing LACK confers protection against canine visceral leishmaniasis with a predominant Th1-specific immune response. *Vaccine* 2008;26(3):333-344.
- Ramos I, Alonso A, Peris A, Marcén JM, Abengozar MA, Alcolea PJ, *et al.* Antibiotic resistance free plasmid DNA expressing LACK protein leads towards a protective Th1 response against *Leishmania infantum* infection. *Vaccine* 2009(27):6695-6703.
- Reiner S, Locksley R. The regulation of immunity to *Leishmania major*. *Annu Rev Immunol* 1995;13:151-177.
- Rodríguez-Cortés A, Fernández-Bellón H, Ramis A, Ferrer L, Alberola J, Solano-Gallego L. Leishmania-specific isotype levels and their relationship with specific cell-mediated immunity parameters in canine leishmaniasis. *Vet Immunol Immunopathol* 2007;116:190-198.
- Rodríguez-Cortés A, Ojeda A, Todolí F, Alberola J. Performance of commercially available serological diagnostic tests to detect *Leishmania infantum* infection on experimentally infected dogs. *Vet Parasitol* 2012;191:363-366.
- Rolão N, Cortes S, Rodrigues O, Campino L. *J Parasitol*. 2004 Oct;90(5):1150-4. Quantification of *Leishmania infantum* parasites in tissue biopsies by real-time polymerase chain reaction and polymerase chain reaction-enzyme-linked immunosorbent assay. *J Parasitol* 2004;90:1150-1154.
- Rostamian M, Sohrabi M, Kavosifard H, Niknam H. Lower levels of IgG1 in comparison with IgG2a are associated with protective immunity against *Leishmania tropica* infection in BALB/c mice. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection* 2015.

- Rosypal A, Troy G, Duncan R, Zajac A, Lindsa D. Utility of diagnostic tests used in diagnosis of infection in dogs experimentally inoculated with a North American isolate of *Leishmania infantum infantum*. J Vet Intern Med 2005;19:802-809.
- Sakai T, Hisaeda H, Nakano Y, Ishikawa H, Maekawa Y, Ishii K, *et al*. Gene gun-mediated delivery of an interleukin-12 expression plasmid protects against infections with the intracellular protozoan parasites *Leishmania major* and *Trypanosoma cruzi* in mice. Authors Immunol 2000.
- Saló E. ¿What's new on canine leishmaniasis? Proceedings of the Southern European Veterinary Conference and Congreso Nacional de AVEPA 2012.
- Santos-Gomes G, Rosa R, Leandro C, Cortes S, Romão P, Silveira H. Cytokine expression during the outcome of canine experimental infection by *Leishmania infantum*. Vet Immunol Immunopathol 2002;88:21-30.
- Schalling H, Cardoso L, Hommer S, Knoon C, Belling G, Rodrigues M, *et al*. Development of a dipstick assay for detection of *Leishmania*-specific canine antibodies. J Clin Microbiol 2004;42:193-197.
- Solano-Gallego L, Koutinas A, Miró G, Cardoso L, Pennisi M, Ferrer L, *et al*. Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniosis. Vet Parasitol 2009;165:1-18.
- Solano-Gallego L, Koutinas A, Miró G, Cardoso L, Penni MGea. Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniosis. Vet. Parasitol. 2009(165):1-18.
- Solano-Gallego L, Llul J, Ramos G, Riera C, Arboix M, Alberlola J, *et al*. The Ibizaian hound presents a predominantly cellular immune response against natural *Leishmania* infection. Vet Parasitol 2000(90):37-45.
- Solano-Gallego L, Morell P, Arboix M, Alberola J, Ferrer L. Prevalence of *Leishmania infantum* infection in dogs living in an area of canine leishmaniasis endemicity using PCR on several tissues and serology. J of Clin Microbiol 2001(39):560-563.
- Solano-Gallego L, Villanueva S, Cardoso L, Ordeix L, Miró G, Fondati A, *et al*. Leishmaniosis: una revisión actualizada. Servet editorial - Grupo Asís Biomedica S L 2013.
- Strauss-Ayali D, Baneth G, Jaffe C. Splenic immune responses during canine visceral leishmaniasis. Vet Res 2007;38:547-564.
- Suárez B, Isidoro B, Sierra M, Molina R, Mochales A, Amela C. Situación epidemiológica y de los factores de riesgo de transmisión de *Leishmania infantum* en España. Rev Esp Salud Pública 2012 Noviembre 2012(86):555-564.
- Todolí F. Vacunación y diagnóstico de la leishmaniosis visceral mediante proteínas recombinantes de *Leishmania infantum* producidas en larvas de insecto. Universitat Autònoma de Barcelona 2009.
- Vidarsson G, Dekkers G, Rispens T. IgG subclasses and allotypes: from structure to effector functions. Frontiers in immunology 20 October 2014.