

LEISHMANIASIS

RESUMEN

Descripción e importancia de la enfermedad: La leishmaniasis no es una entidad única, sino que comprende varios síndromes debidos fundamentalmente a por lo menos 20 especies de *Leishmania* que afectan a seres humanos, y se transmiten por flebótomos de los géneros *Phlebotomus* y *Lutzomyia*. La leishmaniasis se asocia a la distribución geográfica de sus vectores flebótomos y está limitada por la misma. Se han clasificado quince entidades nosogeográficas en todo el mundo, de las cuales 13 tienen un perfil zoonótico conocido o posible. Durante los últimos años, el número de regiones que se están convirtiendo en endémicas de *Leishmania* ha aumentado considerablemente, y ha aumentado también el número de casos en animales y en seres humanos.

En el hombre, el espectro clínico varía desde las infecciones asintomáticas a otras con elevada mortalidad, con tres formas clásicas descritas: visceral (LV), cutánea (LC) y mucocutánea (LMC). La infección en el perro suele tener lugar por *L. infantum* y *L. chagasi* (ahora considerados sinónimos), que causan una enfermedad crónica viscerocutánea en el hospedador (leishmaniasis canina, LCan). La infección asintomática en el perro está muy extendida y contribuye a mantener la presencia del parásito en zonas endémicas a largo plazo. El perfil clínico y la evolución de la leishmaniasis es consecuencia de complejas interacciones entre el parásito y la respuesta inmunitaria del hospedador. La evolución de la infección depende de la capacidad de los macrófagos del hospedador de destruir el parásito de forma eficaz.

Detección del agente: Cuando en el hombre y en los animales afectados se presentan los síntomas clínicos y las lesiones características, la observación del parásito en frotis teñidos de biopsia esplénica, de médula ósea y de ganglios linfáticos, en raspados cutáneos y en biopsias tisulares, constituye un diagnóstico positivo. Si la infección es de un grado bajo, la detección del parásito solo es posible mediante los intentos de aislamiento *in vitro* o por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Como existen pocas diferencias entre las distintas especies, cualquier *Leishmania* aislada debe identificarse por métodos bioquímicos y/o moleculares. Varios centros en el mundo utilizan en la actualidad la caracterización de los isoenzimas y el ADN para identificar el agente.

Pruebas serológicas: La serología es el método de diagnóstico preferido de la LV y la LCan, incluso durante las primeras fases de la enfermedad. En las formas subclínicas, los casos seropositivos se confirman mediante el diagnóstico parasitológico o la PCR. La serología tiene menos valor en la LC y LMC. De entre las diversas técnicas serológicas disponibles, la prueba de inmunofluorescencia indirecta y el enzimoimmunoanálisis son las más adecuadas. Pueden prepararse en el laboratorio antígenos crudos a partir de cultivos de parásitos para el diagnóstico serológico. También pueden usarse pruebas basadas en antígenos recombinantes, que tienen una alta especificidad aunque pueden ser menos sensibles.

El ensayo inmunocromatográfico rápido es fácil de realizar y se puede llevar a cabo en clínicas veterinarias, pero tiene una menor eficacia diagnóstica que la inmunofluorescencia indirecta (IFAT) y el ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA).

Requisitos para las vacunas: No hay en la actualidad ninguna vacuna eficaz disponible en todo el mundo para su uso en el hombre y en los perros. Se están evaluando varias vacunas para animales, y cuatro se han autorizado para su uso en el perro (dos en Brasil y dos en Europa). Además de otros problemas por resolver, el uso de estas vacunas está suponiendo retos actuales y futuros en los ámbitos del diagnóstico, la epidemiología y la vigilancia del parásito, sobre todo en países en los que el parásito no existe. El antígeno de la prueba cutánea de la leishmania ya no está disponible en ninguna parte del mundo y carece de estandarización.

A. INTRODUCCIÓN

Descripción de la enfermedad: La leishmaniasis comprende gran variedad de síndromes causados por parásitos protozoarios del género *Leishmania* (orden Kinetoplastida, familia Tripanosomatidae), que se transmiten a hospedadores mamíferos mediante la picadura de flebotomos de los géneros *Phlebotomus* (Viejo Mundo)¹ y *Lutzomyia* (Nuevo Mundo). La enfermedad deriva de la multiplicación de los amastigotos en los macrófagos del sistema reticuloendotelial. La epidemiología y los signos clínicos de las enfermedades son muy diversos, y generalmente se agrupan en dos entidades principales: las leishmaniasis zoonóticas, cuyos reservorios, ya sean animales domésticos o salvajes, están involucrados en el ciclo de transmisión y en las cuales los humanos juegan un papel como hospedadores accidentales, y las leishmaniasis antroponóticas, en las que los seres humanos son el único reservorio y fuente de la infección por parte del vector (Esch y Petersen, 2013).

Los linfocitos T y las citocinas desempeñan un papel crucial en el hecho de que la infección evolucione a un estado inmunitario protector o bien a una enfermedad progresiva y manifiesta. En modelos murinos consanguíneos, intervienen dos subgrupos distintos de células T ayudantes (Th), denominadas Th1 y Th2, que difieren en cuanto al tipo de citocinas secretadas por una activación polarizada; la respuesta Th1 confiere protección, mientras que la respuesta Th2 hace al hospedador más susceptible a la infección. No obstante, en humanos y perros con infecciones clínicamente manifiestas, lo habitual es que las respuestas Th1 y Th2 no estén polarizadas, puesto que se detectan tanto citocinas activadoras (por ejemplo, interferón gama o interleucina 12) como supresoras (como interleucina 10, interleucina 13, interleucina 4 o TGF beta) (Murray *et al.*, 2005).

Se han descrito varias formas de signos clínicos de la leishmaniasis humana y se han clasificado en tres entidades clínicas principales: leishmaniasis visceral (LV, kala azar), leishmaniasis cutánea (LC localizada, difusa o diseminada, úlcera oriental, uta, pian bois, úlcera de chiclero) y leishmaniasis mucocutánea (MCL, espundia) (Organización Mundial de la Salud [OMS], 2010). Las enfermedades son principalmente zoonosis con dos excepciones, la de LC debida a *L. tropica* en áreas urbanas de Oriente Medio, y la de LV debida a *L. donovani* en el subcontinente indio (norte de India, Nepal y Bangladesh) y en algunas partes de África oriental (por ejemplo, Etiopía y Sudán). La leishmaniasis canina (CanL) es una enfermedad viscerocutánea crónica causada por *L. infantum*, en la cual el perro actúa como reservorio fuente. Los perros asintomáticos resistentes pueden superar >50% de la población canina infectada. Los signos externos característicos registrados en perros susceptibles que evolucionan hacia la enfermedad en sí son agrandamiento de los ganglios linfáticos, pérdida de peso, dermatitis exfoliativa, onicogriposis, alopecia, úlceras y alteraciones oculares. La leishmaniasis felina (FeL) causada por *L. infantum* parece ser una enfermedad felina emergente; en las últimas dos décadas se ha reportado cada vez con más frecuencia en áreas endémicas y esporádicamente también en áreas no endémicas en gatos realojados (Pennisi *et al.*, 2015; Richter *et al.*, 2014; Rüfenacht *et al.*, 2005). Se han reportado casos tegumentarios esporádicos en équidos y bovinos (Gramiccia *et al.*, 2011). Del mismo modo, las poblaciones de cánidos silvestres (lobo, zorro y chacal) pueden mostrar tasas de infección similares a las de los perros, pero la prevalencia de signos clínicos progresivos en estas especies es sustancialmente menor y, por lo tanto, pueden no ser tan infecciosas como las poblaciones de perros para explicar un ciclo de transmisión primaria. En un brote de leishmaniasis visceral en España, se describieron como reservorios liebres (*Lepus granatensis*) y conejos (*Oryctolagus cuniculus*) (Jiménez *et al.*, 2014; Molina *et al.*, 2012).

Agente patógeno causal: Alrededor de 20 especies de *Leishmania* conocidas son agentes causales de leishmaniasis humanas. En el Nuevo Mundo, las formas tegumentarias están causadas por *L. braziliensis*, *L. guyanensis*, *L. panamenis*, *L. shawi*, *L. naiffi*, *L. lainsoni*, *L. lindenbergi*, *L. peruviana*, *L. mexicana*, *L. venezuelensis* y *L. amazonensis*; las formas viscerales y, con menor frecuencia, cutáneas, están causadas por *L. infantum*. En el Viejo Mundo, las formas cutáneas están causadas por *L. tropica*, *L. major* y *L. aethiopica*; las formas viscerales y, con menor frecuencia, cutáneas, están causadas por *L. infantum* y *L. donovani*. Mediante genotipificación se ha observado que *Leishmania infantum* y *L. chagasi* son idénticas, y deben considerarse sinónimos (Kuhls *et al.*, 2011). Por otra parte, todavía está en debate la posición taxonómica de otras especies de *Leishmania* causantes de formas tegumentarias (*L. killicki* en el Viejo Mundo; *L. pifanoi*, *L. garnhami* y *L. colombiensis* en el Nuevo Mundo). Otras especies de *Leishmania* no patógenas para el ser humano son parásitos de roedores en el Nuevo y el Viejo Mundo, y una es el agente causal de leishmaniasis cutánea en macrópodos de Australia (Dougall *et al.*, 2009). Los perros resultan infectados principalmente por *L. infantum*, pero en perros del Viejo Mundo se han hallado otras especies de *Leishmania* (*Leishmania amazonensis*, *L. braziliensis*, *L. mexicana*, *L. venezuelensis*) (Pennisi *et al.*, 2015; Solano-Gallego *et al.*, 2009). *Leishmania tropica* y *L. major* se han hallado en alguna ocasión puntual en perros y se encuentran sobre todo asociadas a lesiones cutáneas o mucocutáneas (Baneth *et al.*, 2017).

1 En este capítulo, el término “Nuevo Mundo” hace referencia a las Américas, y el término “Viejo Mundo” hace referencia a Europa, África y Asia (OMS, 2010).

Riesgo zoonótico y requisitos de bioseguridad: El contacto directo con hospedadores infectados o la manipulación de muestras biológicas y cultivos de parásitos obtenidos de dichos hospedadores son de bajo riesgo debido a que las infecciones se transmiten por flebótomos y a la ausencia de formas de resistencia en el medio ambiente. Todas las manipulaciones de laboratorio con *Leishmania sp.* deben llevarse a cabo a un nivel de bioseguridad y biocontención adecuado, que se determinará en función de un análisis del riesgo biológico, según se describe en el Capítulo 1.1.4 *Bioseguridad y bioprotección: norma para la gestión del riesgo biológico en el laboratorio veterinario y en las instalaciones de los animales.*

Papel del vector: Los vectores flebotomianos de la leishmaniasis son, en algunos casos, solo permisivos para el desarrollo completo de las especies de *Leishmania* que transmiten en la naturaleza, mientras que en otros casos pueden transmitir más de una especie de *Leishmania* (Bates, 2007). Hay especies emergentes de *Leishmania* que infectan a seres humanos y animales para las que no se ha identificado un vector. Hay unas 500 especies de flebotomianos conocidas, pero solo unas 30 transmiten la leishmaniasis. Solo la hembra de flebótomo transmite los parásitos (OMS, 2010). En áreas templadas, la transmisión de *Leishmania* ocurre solo durante los meses cálidos, coincidiendo con el período de actividad de los flebótomos adultos, pero debido al variable y prolongado período de prepatencia, la variación estacional en la incidencia de la enfermedad en perros y humanos puede no ser aparente. Por el contrario, en regiones más cálidas, como gran parte del Brasil endémico, la actividad de los flebótomos y la transmisión humana y canina de la LV zoonótica tienen lugar durante todo el año. La temperatura afecta al tiempo de desarrollo y a hibernación de los flebótomos y al período de incubación extrínseco, lo que probablemente se refleje en la duración de la infecciosidad.

B. TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO

El diagnóstico de la leishmaniasis debe basarse en un enfoque integrado que tenga en cuenta la edad, sexo y raza de los animales, el historial veterinario, los hallazgos de la exploración física, los cambios clínicos y anatomopatológicos y los resultados de las pruebas de diagnóstico. Los métodos de diagnóstico actualmente disponibles se describen a continuación.

La lista e idoneidad de cada prueba para los fines propuestos se indican en la Tabla 1.

Tabla 1. Métodos analíticos disponibles para el diagnóstico de la leishmaniasis y su propósito

Método	Propósito					
	Demostrar ausencia de infección en la población	Demostrar ausencia de infección en animales individuales antes de los desplazamientos	Contribuir a las políticas de erradicación	Confirmar casos clínicos	Determinar la prevalencia de la infección – vigilancia	Determinar el estado inmunitario en animales o poblaciones tras la vacunación
Detección del agente²						
Examen citológico	–	–	–	++	–	–
Examen histológico	–	–		++	–	
Aislamiento en cultivo	–	+		++	–	
Métodos moleculares	++	+++		++	++	
Detección de respuesta inmunitaria						
IFAT	+++	++	–	++	+++	–
ELISA	+++	++		++	+++	

2 Se recomienda aplicar una combinación de métodos de identificación del agente en una misma muestra clínica.

Método	Propósito					
	Demostrar ausencia de infección en la población	Demostrar ausencia de infección en animales individuales antes de los desplazamientos	Contribuir a las políticas de erradicación	Confirmar casos clínicos	Determinar la prevalencia de la infección – vigilancia	Determinar el estado inmunitario en animales o poblaciones tras la vacunación
Prueba de aglutinación directa	++	++		++	++	
Prueba inmunocromatográfica rápida	–	–		++	+	

Clave: +++ = método recomendado para este propósito; ++ = método recomendado pero con limitaciones; + = puede utilizarse en muy pocas situaciones; – = no adecuado para este propósito; - = no aplicable a este propósito.

PCR = reacción en cadena de la polimerasa; IFAT = inmunofluorescencia indirecta; ELISA = enzimoimmunoanálisis.

1. Detección del agente

1.1. Examen citológico

El examen citológico permite resaltar la presencia de amastigotes en macrófagos o líquido extracelular después de una tinción adecuada (tinción de May Grunwald-Giemsa). Los amastigotes son pequeños cuerpos intracelulares redondeados u ovalados, de 1,5 a 3 × 2,5 a 6,5 µm de tamaño, que se encuentran en las vacuolas dentro del citoplasma de los macrófagos. No hay flagelo libre. El microorganismo tiene un núcleo relativamente grande y un cinetoplasto que consta de un cuerpo en forma de barra y un cuerpo basal en forma de punto.

Por tanto, la investigación citológica debe realizarse en muestras de:

- i) Lesiones cutáneas papulares, nodulares y ulcerosas: muestreo por aspiración con aguja fina y/o frotis de impronta; sin embargo, las lesiones ulcerosas isquémicas pueden ser negativas;
- ii) Médula ósea y ganglios linfáticos en presencia de signos clínicos o alteraciones clínicas anatomopatológicos atribuibles a la participación del parásito (anemia, linfadenomegalia, etc.);
- iii) Otras localizaciones: líquidos biológicos extraídos de sitios con lesiones (por ejemplo, líquido sinovial en el caso de artritis/poliartritis, líquido cefalorraquídeo en el caso de signos neurológicos, etc.). En ausencia de lesiones de las que se puedan extraer muestras, los órganos o tejidos en los que es más probable encontrar el parásito son los siguientes, en orden decreciente de sensibilidad diagnóstica: bazo, médula ósea, ganglios linfáticos y sangre (Mylonakis *et al.*, 2005; Saridomichelakis *et al.* 2005).

En caso de resultado citológico negativo, el material utilizado para la citología puede conservarse y enviarse al laboratorio para su análisis mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (véase el apartado B.1.4 *Métodos moleculares*). La especificidad de la microscopía para el diagnóstico de la leishmaniasis visceral es alta, pero su sensibilidad varía según los tejidos muestreados: 93 a 99% en el caso del bazo, 52 a 85% en el caso de la médula ósea y 52 a 58% en el caso de los aspirados de ganglios linfáticos. Sin embargo, no se recomienda la aspiración esplénica, dado el alto riesgo de hemorragia potencialmente mortal. La aspiración de médula ósea es menos sensible pero más segura y actualmente se considera el mejor método para obtener una muestra de tejido para analizar.

1.2. Examen histológico

El parásito se puede poner de manifiesto en cortes de lesiones teñidas con hematoxilina-eosina. En asociación con el parásito, también se pueden visualizar alteraciones compatibles con CanL, representadas por inflamación granulomatosa y/o vasculitis que afectan a diferentes órganos, dermatopatías isquémicas, dermatitis linfoplasmocítica de la unión dermoepitelial, o hiperplasia linfoide del bazo y ganglios linfáticos. El uso del examen histológico siempre es aconsejable cuando, a pesar de un examen citológico negativo, persiste una fuerte sospecha de CanL, especialmente en presencia de dermatitis y en formas cutáneas caracterizadas por lesiones focales. Si se detectan alteraciones

histológicas como las descritas anteriormente en cortes teñidos con hematoxilina-eosina, pero sin parásitos detectables, es aconsejable proceder con la tinción inmunohistoquímica para antígenos de *Leishmania*. Si este método también da un resultado negativo, puede emplearse una biopsia para análisis genéticos (PCR, secuenciación, amplificación isotérmica mediada por bucle) (véase el apartado B.1.4 *Métodos moleculares*) (Muller *et al.*, 2003; Roura *et al.*, 1999a).

1.3. Aislamiento en cultivo

El aislamiento en cultivo es la prueba más específica porque el desarrollo de promastigotes vitales en cultivo es atribuible únicamente al género *Leishmania* en el caso de muestras tomadas en áreas endémicas del Viejo Mundo. La investigación parasitológica debe realizarse en las siguientes muestras: aspirado de ganglio linfático, aspirado de médula ósea, raspados de piel y biopsias de piel. En la LV, también se puede utilizar sangre (tomando la capa leucocitaria), con sensibilidad reducida. Sin embargo, el aislamiento en cultivo tiene la desventaja de requerir largos tiempos de ejecución y se realiza solo en laboratorios especializados. La elección de los métodos de aislamiento y cultivo dependerá de las circunstancias inmediatas y de la capacidad técnica y la experiencia del personal del laboratorio (OMS, 2010). Por desgracia, no existe todavía un medio de cultivo “universal” en que crezcan con facilidad todas las leishmanias y es casi imposible predecir qué medio será el más apropiado para el crecimiento de una cepa particular de *Leishmania*. Cada laboratorio tiene que encontrar el medio más adecuado entre los medios bifásicos de agar sangre y los medios de cultivo de tejidos suplementados con suero fetal bovino (Evans, 1987). Cuando se intenta el aislamiento primario de microorganismos desconocidos, se debe utilizar un medio con agar sangre – con preferencia el medio NNN (Novy, McNeil y Nicolle) o, en su defecto, el medio sólido de infusión de cerebro y corazón (BHI) o el medio EMTM (medio de Tobie modificado por Evans). En el apartado B.1.3, a continuación, se describen varios medios adecuados para el cultivo en masa de las cepas conocidas, (véase Evans, 1987 para la composición de los medios). Los microorganismos de los pacientes con LC y LMC crónica pueden ser muy difíciles de cultivar. A veces, incluso cuando el aislamiento inicial tiene éxito, los parásitos pueden morir cuando se subcultivan. Esto parece especialmente frecuente cuando el aislamiento inicial se hace en un medio rico. A menudo esto se puede superar si los subcultivos se realizan en medios nutritivos menos ricos, como el NNN, o uno de los medios semisólidos, como el “Evans mojado” o el agar sangre semisólido de Locke. Existen muchas referencias bibliográficas que describen medios de cultivo alternativos para el cultivo del parásito (Castelli *et al.*, 2014; Santarém *et al.*, 2014).

1.4. Métodos moleculares

Se utilizan los métodos basados en la PCR para diagnosticar y/o identificar *Leishmania* en diferentes tipos de muestras procedentes de humanos o animales. La investigación molecular debe realizarse en las siguientes muestras, expuestas en orden decreciente de sensibilidad: médula ósea/ganglio linfático, piel, conjuntiva, capa leucocitaria, sangre periférica. En perros resistentes, la inoculación de *Leishmania* puede no ir seguida de diseminación del parásito, por lo tanto, en áreas endémicas, un resultado positivo en la PCR en una muestra de piel en ausencia de lesiones cutáneas no significa necesariamente que el perro esté infectado y que vaya a desarrollar la infección (Gradoni, 2002). De manera similar, unos resultados positivos en la PCR de médula ósea pueden posteriormente dar un resultado negativo (Oliva *et al.*, 2006). Siempre es mejor utilizar material fresco o congelado o material fijado en alcohol etílico al 95%. Se pueden utilizar muestras fijadas con formalina o fijadas en parafina, pero dan menores rendimientos de diagnóstico.

En esencia, las técnicas desarrolladas para identificar cepas conocidas de *Leishmania* o para detectar los microorganismos de varias muestras comprenden: (a) la digestión del material con proteinasa K y extracción de ADN. Estos pasos pueden realizarse utilizando protocolos y reactivos internos o bien kits comerciales, de los cuales existe gran variedad; (b) la amplificación por PCR estándar utilizando secuencias oligonucleotídicas (cebadores) seleccionadas del gen del ARNr de la subunidad pequeña (Mathis & Deplazes, 1995), minicírculos del ADN del quinoplasto (Maarten *et al.*, 1992) u otras secuencias altamente repetitivas del ADN genómico (Bulle *et al.*, 2002; Piarroux *et al.*, 1993); (c) el análisis de los productos de amplificación en geles de agarosa al 1–2%. La PCR es un método muy sensible, sobre todo si va dirigida a secuencias genómicas “multicopia”, presentes en altas cantidades en cada parásito individual, como los minicírculos de cinetoplasto (Cortes *et al.*, 2004).

Las tres técnicas más utilizadas son:

- i) PCR convencional o tradicional: el ADN de *Leishmania* se amplifica utilizando un par de cebadores (secuencias de bases complementarias a la secuencia diana contenida en el ADN de *Leishmania*); (Lachaud *et al.*, 2002; Muller *et al.*, 2003);

- ii) PCR anidada: una modificación de la PCR tradicional, más sensible pero menos específica, ya que aumentar el número de pasos tiende a incrementar el riesgo de contaminación por ADN extraño y, por tanto, de falsos positivos (Fisa *et al.*, 2001; Roura *et al.*, 1999b);
- iii) PCR en tiempo real (cuantitativa): el uso de moléculas o sondas fluorescentes permite cuantificar el número de copias de ADN presentes en una muestra biológica. La PCR en tiempo real tiene una sensibilidad similar a la PCR anidada, pero si se realiza con sistemas "cerrados", es más específica porque la muestra se somete a un número menor de manipulaciones y, por lo tanto, es menos propensa a la contaminación. La PCR en tiempo real también puede proporcionar información útil en la fase de seguimiento, p. ej. número de parásitos (Manna *et al.*, 2008).

Los estudios también han demostrado el potencial de la amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP) como técnica de diagnóstico en condiciones de campo para CanL, particularmente en áreas endémicas con recursos limitados (Nzelu *et al.*, 2019).

2. Pruebas serológicas

La seroconversión ocurre a los pocos meses de la infección: de promedio 5 meses (rango 1 a 22) en el caso de infecciones naturales y 3 meses (rango 1 a 6) en el caso de infecciones experimentales (Moreno y Alvar, 2002). Las técnicas de diagnóstico disponibles varían. Algunos, como el Western Blot, aunque muestran un excelente rendimiento diagnóstico, no se utilizan a gran escala debido a limitaciones de tiempo y costo. Los más ampliamente disponibles son la prueba de la inmunofluorescencia indirecta (IFAT), el ensayo de inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA), las pruebas de aglutinación directa (DAT) y el ensayo inmunocromatográfico rápido (tira reactiva o tira de prueba).

2.1. Prueba de inmunofluorescencia indirecta

La prueba de inmunofluorescencia indirecta (IFA) es de amplio uso por su facilidad de aplicación. La prueba es específica de género, aunque se han descrito reacciones cruzadas significativas en individuos infectados por *Trypanosoma cruzi*. Para estos casos, serían más apropiadas las pruebas serológicas basadas en los antígenos específicos recombinantes de *Leishmania* (véanse los apartados B.3.2.2 y B.2.2.4 más adelante). En áreas libres de la enfermedad de Chagas, la prueba IFA para el diagnóstico clínico de LV o LCan tiene una sensibilidad del 96% y una especificidad del 98%, es decir, similares a las del enzimoanálisis (ELISA). Aunque se pueden usar como antígenos los amastigotos de los cortes congelados o de los frotis de órganos infectados, los promastigotos cultivados constituyen la fuente de antígeno más frecuente.

2.1.1. Preparación del antígeno

- i) Se recogen 3–4 ml del medio líquido de un cultivo de 3 días que muestre un buen crecimiento de promastigotos (véase el apartado B.1. para los medios de cultivo).
- ii) Se lavan los microorganismos tres veces con solución salina tamponada con fosfato (PBS), pH 7,2–7,4, mediante centrifugación a 350 **g** durante 15 minutos a temperatura ambiente.
- iii) Se resuspende el precipitado celular final en PBS y, con la ayuda de un hemocitómetro, se ajusta la concentración de promastigoto a aproximadamente 4×10^6 /ml.
- iv) Se distribuyen 30 μ l de la suspensión de promastigotos en cada círculo de un porta de muestra múltiple y se deja secar a temperatura ambiente.
- v) Se fijan los promastigotos con acetona fría durante 10 minutos, luego se pasan los portas a una caja de plástico y se guardan en un congelador (-35°C) durante menos de 2–3 meses.

2.1.2. Procedimiento analítico

- i) Los portas congelados recubiertos con el antígeno se lavan con PBS y se dejan secar a temperatura ambiente.
- ii) Se inactivan los sueros durante 30 minutos en un baño de agua a 56°C .
- iii) Se hacen diluciones a la mitad de los sueros problema desde 1/80 a 1/10.240 para la LV humana y desde 1/40 a 1/5.120 para la LCan. Se incluyen también en la prueba sueros control positivos y negativos a diluciones de 1/80 y 1/160 para la LV humana y de 1/40 y 1/80 para LCan. No hay sueros estándar disponibles, pero se deben preparar y titular estándares internos.

- iv) Se distribuyen 30 µl de muestras de suero diluido en cada círculo del porta y se incuban durante 30 minutos a 37°C.
- v) Se eliminan las muestras de suero mediante un lavado vigoroso con PBS y se sumergen los portas en PBS durante 10 minutos. Se deja que se sequen los portas.
- vi) Se distribuyen 30 µl de solución diluida de anti-inmunoglobulina conjugada a isotiocianato de fluoresceína (FITC) en cada círculo del porta y se incuban 30 minutos a 37°C. Existen anticuerpos comercializados anti inmunoglobulinas de perro y de humanos conjugadas a FITC. Para las diluciones apropiadas, síganse las instrucciones.
- vii) Se repite el paso v y se monta con un cubre en unas cuantas gotas de PBS/glicerol (50% [v/v] de cada componente).
- viii) Se observan los portas en un microscopio de fluorescencia. El título de los anticuerpos es la mayor dilución que muestra promastigotos fluorescentes.

2.1.3. Interpretación de los resultados

En la LV humana aguda, el título umbral normalmente oscila entre 1/80 y 1/160. La enfermedad humana asintomática o subclínica suele dar lugar a títulos inferiores a 1/80. En la LCan, el título umbral oscila entre 1/40 (indicativo de exposición pero no necesariamente de infección instaurada) y 1/160 (indicativo de infección instaurada), mientras que un título de 1/320 o superior puede ser indicativo de la enfermedad en perros clínicamente sospechosos (Paltrinieri et al., 2010). En cuanto a otros mamíferos domésticos (como los gatos), no se dispone de límites umbral estandarizados para los resultados de la IFA. Dado que el rendimiento de la IFA puede variar entre laboratorios, es mejor que cada laboratorio defina su propio título umbral empleando sueros de referencia positivos y negativos.

2.2. Enzimoimmunoanálisis

El ELISA se puede llevar a cabo con suero o con un volumen medido de sangre. La sangre se recoge por punción con aguja y depósito sobre tiras de papel absorbente adecuado y se deja secar. La muestra se eluye y se analiza a una dilución única determinada previamente para dar una especificidad y sensibilidad aceptables. Esta prueba se puede utilizar para los estudios epidemiológicos en condiciones de campo.

En el método clásico, el antígeno se prepara como sigue: los promastigotos recogidos del cultivo se lavan cuatro veces con PBS, pH 7,2, a 1.000 **g** durante 15 minutos. El paquete de promastigotos se resuspende al doble de su volumen en agua destilada y se sonica a amplitud media en un baño de hielo. La suspensión se deja toda la noche a 4°C para dejar que las proteínas pasen a la solución. Después de una centrifugación final a 4.000 **g** durante 10 minutos para eliminar los restos celulares, la capa superior, que contiene el antígeno soluble concentrado, se distribuye en viales y se guarda a –20°C hasta su utilización. Para su utilización en la prueba, se reconstituye con PBS a la concentración de proteína óptima predeterminada (aproximadamente 20 µg/ml) medida por el método de Lowry. Los reactivos conjugados a enzima (normalmente peroxidasa de rábano) consisten en anticuerpos anti-inmunoglobulina de perro generados en cabra o Proteína A (Hamarsheh et al., 2012).

El método ELISA es útil para diagnosticar la leishmaniasis del Viejo y del Nuevo Mundo. Se ha descrito reacción cruzada con *Babesia canis* y *Tripanosoma spp.* (Gottstein et al, 1988). Según la cepa de *Leishmania* utilizada, la sensibilidad del ELISA puede oscilar entre el 86% y el 99%.

Para el diagnóstico de la LCan mediante ELISA, se ha utilizado un antígeno del promastigoto soluble en detergente en vez de lisados totales. El detergente fue Tritón X-100 y el extracto proteico se protegió con inhibidores de proteasas. Utilizando este método, la sensibilidad del ELISA aumentó hasta el 99,5%, mientras que su especificidad fue comparable con la de la prueba IFA (97%) (Mancianti et al., 1995).

Los métodos ELISA descritos anteriormente se basan en preparaciones antigénicas crudas. Se ha descrito un antígeno recombinante de una proteína clonada de *L. infantum*, llamada rK39, que es muy reactiva frente a sueros procedentes de casos de leishmaniasis visceral humana y canina cuando se emplea en un formato ELISA. Utilizando 25-50 ng del antígeno, se detectó en todos los casos un 99% de especificidad y de sensibilidad en perros con la enfermedad demostrada mediante parasitología (Scalone et al., 2002). En pacientes positivos al VIH, el ELISA-K39 mostró una mayor sensibilidad (82%) que la prueba IFA (54%) (Houghton et al., 1998). El antígeno K39, que posee una estabilidad y reproducibilidad notables, se produce ahora comercialmente. Más recientemente, se ha evaluado un antígeno quimérico K9-K39-K26 como protocolo ELISA simple para el diagnóstico serológico de infecciones humanas y caninas por *Leishmania* (Daprà et al., 2008). En los perros, se ha observado

que la especificidad y la sensibilidad son del 99,5% y del 98,5%, respectivamente, lo cual supone una alta concordancia (valor K: 0,98) con la prueba IFA, considerada el estándar.

2.3. Prueba de aglutinación directa

Para el diagnóstico de la LV y la LCan, se ha descrito la prueba de la aglutinación directa (DAT). Después de mejoras, la DAT se ha validado como una prueba específica y sensible para investigaciones de campo (Boelaert *et al.*, 1999; Cardoso *et al.*, 2004; Ozbel *et al.*, 2000). El antígeno consiste en promastigotos recogidos de cultivos, lavados con PBS, pH 7,2, tratados con tripsina al 0,4% (durante 45 minutos a 37°C y luego lavados de nuevo), y teñidos con azul brillante Coomassie al 0,02%. En pocillos con fondo en V de placas de microtitulación se preparan diluciones a la mitad seriadas de suero en PBS; se añaden a cada pocillo 50 µl de preparación de antígeno y se agita la placa cuidadosamente con la mano y se deja 18 horas a temperatura ambiente. La prueba se valora visualmente contra un fondo blanco. Las reacciones positivas vienen indicadas por agregados característicos de color azul claro, mientras que las muestras negativas muestran un punto azul de bordes bien definidos.

Para los trabajos epidemiológicos y ecológicos a gran escala y para el diagnóstico de la LCan, resulta muy adecuada una prueba DAT modificada para la detección de anticuerpos específicos contra leishmanias en hospedadores caninos, mostrando una sensibilidad del 100% y una especificidad del 98,9% (Harith *et al.*, 1988; 1989). La fiabilidad de esta prueba se ha mejorado tratando los sueros problema con 2-mercaptoetanol 0,2 M e incubándolos a 37 °C.

2.4. Prueba inmunocromatográfica rápida (en varilla o tira)

El ensayo inmunocromatográfico rápido es fácil de realizar y se puede llevar a cabo en clínicas veterinarias, pero tiene menor sensibilidad diagnóstica que el ELISA o la IFAT: la especificidad es media-alta pero la sensibilidad es baja (30-70%) (Grado Gradoni, 2002; Mettler *et al.*, 2005; Reithinger *et al.*, 2002) y por lo tanto puede dar falsos negativos. Cuando existe una fuerte sospecha de un falso negativo al usar un ensayo inmunocromatográfico rápido, se debe utilizar una de las otras pruebas serológicas. El valor de un positivo es limitado porque la prueba no permite evaluar el título de anticuerpos; sin embargo, los resultados positivos pueden ser útiles para identificar individuos con diseminación del parásito y para monitorear la respuesta terapéutica.

En diferentes condiciones endémicas de la LV, se ha evaluado una prueba inmunocromatográfica rápida en la que se usa rK39 como antígeno (prueba comercializada K39 en varilla o en tira). La membrana de nitrocelulosa del kit de la prueba tiene una almohadilla absorbente en un extremo, una banda de anticuerpo inmovilizado anti-proteína A en el otro (para detectar IgG) (zona de control) y una banda de antígeno rK39 en el centro (zona de prueba). Se emplea un conjugado proteína-A-oro coloidal como reactivo de detección inmunocromatográfica. Se coloca una pequeña gota (20 µl) del suero a examinar sobre la almohadilla absorbente antes de añadir dos gotas mayores (100 µl) del tampón de la prueba y se deja que la mezcla emigre por la tira mediante capilaridad. Tras 2–10 minutos, el resultado es positivo si aparecen dos líneas rojas definidas (una en la zona de la prueba y otra en la zona del control), es negativo cuando no aparece la línea roja en la zona de la prueba, y se considera inválido si no aparece ninguna línea en la zona del control.

En casos clínicos de LV humana, dos marcas comerciales de la prueba K39 mostraron un 99-100% de sensibilidad y un 95-100% de especificidad en la India (Sundar *et al.*, 2006), un 90% de sensibilidad y un 100% de especificidad en Brasil (Carvalho *et al.*, 2003), y un 100% de sensibilidad y especificidad en la cuenca mediterránea (Brandonisio *et al.*, 2002). En casos de leishmania canina tanto asintomáticos como sintomáticos, la sensibilidad y la especificidad de la tira K39 fueron del 97% y del 100%, respectivamente (Otranto *et al.*, 2005).

3. Identificación de especies, subespecies o cepas de *Leishmania*

La identificación morfológica permite la identificación de *Leishmania* a nivel de género, pero no a nivel de especie o subespecie. Se pueden utilizar varias técnicas para identificar las diferentes especies, subespecies o cepas de *Leishmania*. En 2010, la OMS enumeró quince centros de identificación de *Leishmania* reconocidos.

3.1. Caracterización de isoenzimas

También conocida como electroforesis de enzimas de multilocus (MLEE), la caracterización de isoenzimas es el método de referencia para la identificación de especies (Rioux *et al.*, 1990; OMS, 2010), aunque esta técnica requiere el cultivo de una gran cantidad de parásitos (5×10^9 – 1×10^{10}). Los principios de la electroforesis enzimática son los siguientes: se extraen enzimas solubles de los

microorganismos cultivados en medios para cultivo a granel (medio BHI, medio MEM/FCS/EBLB [medio mínimo esencial/suero fetal bovino/ caldo de lisado de sangre de Evans], medio *Drosophila* de Schneider). Luego se deposita una pequeña cantidad del extracto en una sustancia de soporte inerte, la matriz, que contiene un tampón a un pH fijo. La matriz suele ser gel de almidón, pero también podría ser acetato de celulosa absorbente, acrilamida o agarosa. El pH del tampón en la matriz se elige normalmente de modo que las isoenzimas estén cargadas negativamente. Una corriente continua pasa a través de la matriz transportada por los iones del tampón. Cuando se completa la electroforesis, la mayoría de las proteínas se habrán desplazado por la matriz hacia el ánodo, dependiendo de la cantidad de carga negativa. Si se tiñe en esta etapa con una tinción de proteína general, se verán muchas bandas. Sin embargo, la alta especificidad de sustrato y el cofactor de las enzimas hace posible teñir solo estas proteínas. Por lo tanto, la movilidad electroforética de una enzima particular se puede comparar entre varios microorganismos. La matriz teñida con su colección de bandas de isoenzimas teñidas se conoce como zimograma. Normalmente, uno o más extractos de microorganismos de referencia, para los cuales los patrones de bandas enzimáticas están bien documentados, se incluyen en el gel para ayudar a interpretar los resultados. La mayoría de las enzimas utilizadas con fines de caracterización se tiñen mediante métodos que incorporan una reacción de deshidrogenasa. Deben examinarse al menos 12 enzimas; los microorganismos que muestran zimogramas idénticos se clasifican en zimodemas de una especie determinada.

3.2. caracterización molecular

Se han desarrollado diferentes técnicas moleculares que permiten la caracterización de *Leishmania* a nivel de especie o cepa, como (a) el análisis de la polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción por PCR (RFLP), en el que los productos de la PCR son digeridos por enzimas de restricción apropiadas y los patrones de los fragmentos de restricción resultantes son analizados (Marfurt *et al.*, 2003; Minodier *et al.*, 1997; Montalvo *et al.*, 2012; Volpini *et al.*, 2004); (b) la tipificación de microsátélites multilocus (MLMT) (Kuhls *et al.*, 2011) y (c) la tipificación de secuencias multilocus (MLST) (Mauricio *et al.*, 2006). En estos casos, se dirigen secuencias de ADN repetidas y polimórficas, como el espaciador transcrito interno ribosómico 1 (ITS1), la cisteína proteasa B, los minicírculos de ADN del cinetoplasto, la glucoproteína de superficie 63, la proteína de shock térmico 70, los minixones y los microsátélites (Reithinger y Dujardin, 2007; Schönian *et al.*, 2008).

C. REQUISITOS PARA LAS VACUNAS Y EL MATERIAL DE DIAGNÓSTICO

1. Vacunas

1.1. Descripción de la producción y requisitos mínimos para las vacunas

Actualmente, no se dispone de antígenos creados en el laboratorio para producir vacuna contra *Leishmania*. Existen tres vacunas inactivadas autorizadas contra *Lcan*, que están protegidas por patentes. La primera vacuna se desarrolló en Brasil. El Ministerio de Agricultura, Ganadería y Alimentación de Brasil aprobó las características y requisitos para la producción. Esta vacuna contiene la fracción de *L. donovani* denominada "ligando fucosa-manosa" (FML) enriquecida con glucoproteína. En estudios de campo se ha observado que el antígeno administrado con saponina QuilA como adyuvante confiere alrededor de un 80% de protección clínica, y también se ha comprobado una buena eficacia inmunoterapéutica al utilizarlo en perros enfermos (Palatnik-de-Sousa *et al.*, 2008). En Brasil también se ha desarrollado una segunda vacuna, en la que se emplea el antígeno A2 recombinante de *L. donovani* junto con una saponina adyuvante. Dicha vacuna ha mostrado un 43% de protección contra un estado positivo según un cultivo en un modelo de exposición artificial. La tercera vacuna se ha autorizado en Europa. La Agencia Europea del Medicamento ha autorizado las características y requisitos para la producción.

Las proteínas excretadas/secretadas purificadas de *L. infantum* y con saponina QA-21 reducen significativamente el riesgo de progresar a una infección activa o enfermedad manifiesta, con una eficacia clínica del 68%. En los perros vacunados que desarrollaron la enfermedad y que estuvieron expuestos a la picadura del vector *P. perniciosus* criado, la reducción en la transmisión del parásito fue significativa en comparación con los controles. Sin embargo, la vacuna no permite diferenciar los animales vacunados de los infectados. Además, se han descrito algunos problemas de seguridad en perros vacunados con proteínas excretadas-secretadas purificadas (Oliva *et al.*, 2014). La cuarta vacuna, disponible en la UE, contiene el principio activo proteína Q, que se compone de diferentes fragmentos de proteínas de *L. infantum*. Un perro vacunado con proteína Q recombinante de *L. infantum* MON-1 tiene cinco veces menos riesgo de desarrollar una enfermedad clínica que un perro no vacunado. Falta información sobre la interrupción de la transmisión de *Leishmania* por parte de los perros vacunados con la proteína Q recombinante MON-1 de *L. infantum* (Cotrina *et al.*, 2018).

Los programas de vigilancia, especialmente los que se basan únicamente en la serología canina, deben revisarse para empezar a tener en cuenta el impacto de la vacunación y garantizar que los datos epidemiológicos se interpreten de forma adecuada.

Actualmente, están en fase de evaluación experimental varias vacunas anti-leishmania que resultan prometedoras (Coler & Reed, 2005; Das & Ali, 2012). Un antígeno quimérico generado a partir de tres antígenos recombinantes de *Leishmania* en los que se ha comprobado la capacidad de desencadenar respuestas inmunitarias celulares (denominados Leish-111f y protegidos por patentes) y adyuvantados con emulsión estable de monofosforil lípido A (MPL-SE), constituye la primera vacuna definida para la leishmaniasis humana, y ha superado las pruebas de seguridad e inmunogenicidad de fase 1 y de fase 2 en personas sanas (Coler *et al.*, 2007). El mismo antígeno poliproteínico y el adyuvante no resultaron útiles para proteger perros contra la infección por *L. infantum* en un ensayo de fase 3 (Gradoni *et al.*, 2005), aunque confirieron cierta protección frente a la enfermedad cuando se utilizaron a modo de agente inmunoterapéutico en perros con Lcan leve (Trigo *et al.*, 2010). Recientemente, se ha observado que un nuevo antígeno quimérico generado a partir de cuatro antígenos recombinantes (KSAC, protegido por patente) resulta prometedor como protección vacunal tanto en la LV humana como en la LCan (Goto *et al.*, 2011).

2. Productos biológicos para el diagnóstico (antígenos para pruebas cutáneas)

Dado que la prueba cutánea no se utiliza para el diagnóstico de infecciones en los animales, y que el antígeno leishmanina no se ha estandarizado a nivel internacional, la OIE no puede realizar recomendaciones.

BIBLIOGRAFÍA

- ALIMOHAMMADIAN M.H., JONES S.L., DARABI H., RIAZIRAD F., AJDARY S., SHABANI A., REZAEI M.A., MOHEBALI M., HOSSEINI Z. & MODABBER F. (2012). Assessment of interferon- γ levels and leishmanin skin test results in persons recovered for leishmaniasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **87**, 70–75.
- BANETH G., YASUR-LANDAU D., GILAD M. & NACHUM-BIALA Y. (2017). Canine leishmaniasis caused by *Leishmania major* and *Leishmania tropica*: comparative findings and serology. *Parasit. Vectors*, **10**, 113.
- BATES P.A. (2007). Transmission of *Leishmania metacyclic* promastigotes by phlebotomine sand flies. *Int. J. Parasitol.*, **37**, 1097–1106.
- BOELAERT M., EL SAGFI S., JACQUET D., DE MUYNCK A., VAN DER STUYFT P. & LE RAY D. (1999). Operational validation of the direct agglutination test for diagnosis of visceral leishmaniasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **60**, 129–134.
- BULLE B., MILLON L., BART J.M., GALLEGO M., GAMBARELLI F., PORTUS M., SCHNUR L., JAFFE C.L., FERNANDEZ-BARREDO S., ALUNDA J.M. & PIARROUX R. (2002). Practical approach for typing strains of *Leishmania infantum* by microsatellite analysis. *J. Clin. Microbiol.*, **40**, 3391–3397.
- CASTELLI G., GALANTE A., LO VERDE V., MIGLIAZZO A., REALE S., LUPO T., PIAZZA M., VITALE F. & BRUNO F. (2014). Evaluation of two modified culture media for *Leishmania infantum* cultivation versus different culture media. *J. Parasitol.*, **100**, 228–230.
- CARDOSO L., SCHALLIG H.D., NETO F., KROON N. & RODRIGUES M. (2004). Serological survey of *Leishmania* infection in dogs from the municipality of Peso da Regua (Alto Douro, Portugal) using the direct agglutination test (DAT) and fast agglutination screening test (FAST). *Acta Trop.*, **91**, 95–100.
- CARVALHO S.F., LEMOS E.M., COREY R. & DIETZE R. (2003). Performance of recombinant K39 antigen in the diagnosis of Brazilian visceral leishmaniasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **68**, 321–324.
- COLER R.N. & REED S.G. (2005). Second-generation vaccines against leishmaniasis. *Trends Parasitol.*, **21**, 244–249.
- COLER R.N., GOTO Y., BOGATZKI L., RAMAN V. & REED S.G. (2007). Leish-111f, a recombinant polyprotein vaccine that protects against visceral Leishmaniasis by elicitation of CD4+ T cells. *Infect. Immun.*, **75**, 4648–4654.

- CORTES S., ROLAO N., RAMADA J. & CAMPINO L. (2004). PCR as a rapid and sensitive tool in the diagnosis of human and canine leishmaniasis using *Leishmania donovani* s.l.-specific kinetoplastid primers. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **98**, 12–17.
- COTRINA J.F., INIESTA V., MONROY I., BAZ V., HUGNET C., MARAÑÓN F., FABRA M., GÓMEZ-NIETO L.C. & ALONSO C. (2018) A large-scale field randomized trial demonstrates safety and efficacy of the vaccine LetiFend® against canine leishmaniasis. *Vaccine*, **36**, 1972–1982.
- DAPRÀ F., SCALONE A., MIGNONE W., FERROGLIO E., MANNELLI A., BIGLINO A., ZANATTA R., GRADONI L. & ROSATI S. (2008). Validation of a recombinant based antibody ELISA for diagnosis of human and canine leishmaniasis. *J. Immunoassay Immunochem.*, **29**, 244–256.
- DAS A. & ALI N. (2012). Vaccine development against *Leishmania donovani*. *Front. Immunol.*, **3**, 99.
- DOUGALL A., SHILTON C., LOW CHOY J., ALEXANDER B. & WALTON S. (2009). New reports of Australian cutaneous leishmaniasis in Northern Australian macropods. *Epidemiol. Infect.*, **137**, 1516–1520.
- ESCH K.J. & PETERSEN C.A. (2013). Transmission and epidemiology of zoonotic protozoal diseases of companion animals. *Clin. Microbiol. Rev.*, **26**, 58–85.
- EVANS D.A. (1987). Leishmania. In: *In-Vitro Methods for Parasite Cultivation*, Taylor A.E. & Baker J.R., eds. Academic Press, London, UK, 52–75.
- FISA R., RIERA C., GÁLLEGO M., MANUBENS J. & PORTÚS M. (2001). Nested PCR for diagnosis of canine leishmaniasis in peripheral blood, lymph node and bone marrow aspirates. *Vet. Parasitol.*, **99**, 105–111.
- GOTO Y., BHATIA A., RAMAN V.S., LIANG H., MOHAMATH R., PICONE A.F., VIDAL S.E., VEDVICK T.S., HOWARD R.F. & REED S.G. (2011). KSAC, the first defined polyprotein vaccine candidate for visceral leishmaniasis. *Clin. Vaccine Immunol.*, **18**, 1118–1124.
- GOTTSTEIN B., DEPLAZES P., ARNOLD P., MEHLITZ D., REITER I. & ECKERT J. (1988). Immundiagnose der Leishmaniose des Hundes mit ELISA und Mini-Western-Blot. *Schweiz. Arch. Tierheilk.*, **130**, 249–262. (in German)
- GRADONI L. (2002). The diagnosis of canine leishmaniasis. In: *Canine Leishmaniasis: Moving Towards a Solution*, Killick-Kendrick R., ed. Intervet International, Boxmeer, Netherlands.
- GRADONI L., FOGLIA MANZILLO V., PAGANO A., PIANTEDOSI D., DE LUNA R., GRAMICCIA M., SCALONE A., DI MUCCIO T. & OLIVA G. (2005). Failure of a multi-subunit recombinant leishmanial vaccine (MML) to protect dogs from *Leishmania infantum* infection and to prevent disease progression in infected animals. *Vaccine*, **23**, 5245–5251.
- GRAMICCIA M. (2011). Recent advances in leishmaniasis in pet animals: Epidemiology, diagnostics and anti-vectorial prophylaxis. *Vet. Parasitol.*, **181**, 23–30.
- HAMARSHEH O., NASEREDDIN A., DAMAJ S., SAWALHA S., AL-JAWABREH H., AZMI K., AMRO A., AREKAT S., ABDEEN Z. & AL-JAWABREH A. (2012). Serological and molecular survey of *Leishmania* parasites in apparently healthy dogs in the West Bank, Palestine. *Parasit. Vectors*, **5**, 183.
- HARITH A.E., KOLK A.H.J., LEEUWENBURGH J., MUIGAI R., HUIGEN E., JELSMA T. & KAGER P.A. (1988). Improvement of a direct agglutination test for field studies of visceral leishmaniasis. *J. Clin. Microbiol.*, **26**, 1321–1325.
- HARITH A.E., SLAPPENDEL R.J., REITER I., VAN KNAPEN F., KORTE P.D., HUIGEN E. & KOLK A.H.J. (1989). Application of a direct agglutination test for detection of specific anti-*Leishmania* antibodies in the canine reservoir. *J. Clin. Microbiol.*, **27**, 2252–2257.
- HOUGHTON R.L., PETRESCU M., BENSON D.R., SKEIKY Y.A.W., SCALONE A., BADARO R., REED S.G. & GRADONI L. (1998). A cloned antigen (recombinant K39) of *Leishmania chagasi* diagnostic for visceral leishmaniasis in human immunodeficiency virus type 1 patients and a prognostic indicator for monitoring patients undergoing drug therapy. *J. Infect. Dis.*, **177**, 1339–1344.
- JIMENEZ M., GONZÁLEZ E., MARTÍN-MARTÍN I., HERNÁNDEZ S. & MOLINA R. (2014). Could wild rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) be reservoirs for *Leishmania infantum* in the focus of Madrid, Spain? *Vet. Parasitol.*, **202**, 296–300. doi: 10.1016/j.vetpar.2014.03.027. Epub 2014 Apr 4.

- KUHLS K., ALAM M.Z., CUPOLILLO E., FERREIRA G.E., MAURICIO I.L., ODDONE R., FELICIANGELI M.D., WIRTH T., MILES M.A. & SCHÖNIAN G. (2011). Comparative microsatellite typing of new world *Leishmania infantum* reveals low heterogeneity among populations and its recent Old World origin. *PLoS Negl. Trop. Dis.*, **5**, e1155.
- LACHAUD L., MARCHERGUI-HAMMAMI S., CHABBERT E., DEREURE J., DEDET J.P. & BASTIEN P. (2002). Comparison of six PCR methods using peripheral blood for detection of canine visceral leishmaniasis. *J. Clin. Microbiol.*, **40**, 210–215.
- MAARTEN H.L., DE BRUJIN M.H.L. & BARKER D.C. (1992). Diagnosis of New World leishmaniasis: specific detection of species of the *Leishmania braziliensis* complex by amplification of kinetoplast DNA. *Acta Trop.*, **52**, 45–58.
- MANCIANTI F., FALCONE M.L., GIANNELLI C. & POLI A. (1995). Comparison between and enzyme-linked immunosorbent assay using a detergent-soluble *Leishmania infantum* antigen and indirect immunofluorescence for the diagnosis of canine leishmaniasis. *Vet. Parasitol.*, **59**, 13–21.
- MANNA L., REALE S., VITALE F., PICILLO E., PAVONE L.M. & GRAVINO A.E. (2008). Real-time PCR assay in *Leishmania*-infected dogs treated with meglumine antimoniate and allopurinol. *Vet. J.*, **177**, 279–282.
- MANSON-BAHR P.C. (1987). Diagnosis. In: The Leishmaniasis in Biology and Medicine. Vol. II. Clinical Aspects and Control, Peters W. & Killick-Kendrick R., eds. Academic Press, London, UK, 703–729.
- MARFURT J., NASEREDDIN A., NIEDERWIESER I., JAFFE C.L., BECK H.P. & FELGER I. (2003). Identification and differentiation of *Leishmania* species in clinical samples by PCR amplification of the miniexon sequence and subsequent restriction fragment length polymorphism analysis. *J. Clin. Microbiol.*, **41**, 3147–3153.
- MATHIS A. & DEPLAZES P. (1995). PCR and *in vitro* cultivation for detection of *Leishmania* spp. in diagnostic samples from humans and dogs. *J. Clin. Microbiol.*, **33**, 1145–1149.
- MAURICIO I.L., YEO M., BAGHAEI M., DOTO D., PRATLONG F., ZEMANOVA E., DEDET J.P., LUKES J. & MILES M.A. (2006). Towards multilocus sequence typing of the *Leishmania donovani* complex: resolving genotypes and haplotypes for five polymorphic metabolic enzymes (ASAT, GPI, NH1, NH2, PGD). *Int. J. Parasitol.*, **36**, 757–769.
- METLER M., GRIMM F., CAPELLI G., CAMP H. & DEPLAZES P. (2005). Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assays, an immunofluorescent-antibody test, and two rapid tests (immunochromatographic-dipstick and gel tests) for serological diagnosis of symptomatic and asymptomatic *Leishmania* infections in dogs. *J. Clin. Microbiol.*, **43**, 5515–5519.
- MINODIER P., PIARROUX R., GAMBARELLI F., JOBLET C. & DUMON H. (1997). Rapid identification of causative species in patients with Old World leishmaniasis. *J. Clin. Microbiol.*, **35**, 2551–2555.
- MOLINA R., JIMÉNEZ M.I., CRUZ I., IRISO A., MARTÍN-MARTÍN I., SEVILLANO O., MELERO S. & BERNAL J. (2012). The hare (*Lepus granatensis*) as potential sylvatic reservoir of *Leishmania infantum* in Spain. *Vet. Parasitol.*, **190**, 268–271. doi: 10.1016/j.vetpar.2012.05.006. Epub 2012 May 23.
- MONTALVO A.M., FRAGA J., MAES L., DUJARDIN J-C. & VAN DER AUWERA G. (2012). Three new sensitive and specific heat-shock protein 70 PCRs for global *Leishmania* species identification. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, **31**, 1453–1461.
- MORENO J. & ALVAR J. (2002). Canine leishmaniasis: epidemiological risk and the experimental model. *Trends Parasitol.*, **18**, 399–405.
- MULLER N., ZIMMERMANN V., FORSTER U., BIENZ M., GOTTSTEIN B. & WELLE M. (2003). PCR-based detection of canine *Leishmania* infections in formalin-fixed and paraffin embedded skin biopsies: elaboration of a protocol for quality assessment of the diagnostic amplification reaction. *Vet. Parasitol.*, **114**, 223–229.
- MURRAY H.W., BERMAN J.D., MARTIN V., DAVIES C.R. & SARAVIA N.G. (2005). Advances in leishmaniasis. *Lancet*, **366**, 1561-1577.
- MYLONAKIS M.E., PAPAIOANNOU N, SARIDOMICHELAKIS M.N., KOUTINAS A.F., CHARALAMBOS B. & VASSILIOS I.K. (2005) Cytologic patterns of lymphadenopathy in dogs infected with *Leishmania infantum*. *Vet. Clin. Pathol.*, **34**, 243–247.

- NZELU C.O., KATO H. & PETERS N.C. (2019). Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): An advanced molecular point-of-care technique for the detection of *Leishmania* infection. *PLOS Negl. Trop. Dis.*, **13**, e0007698. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007698>
- OLIVA G., NIETO J., FOGLIA MANZILLO V., CAPPIELLO S., FIORENTINO E., DI MUCCIO T., SCALONE A., MORENO J., CHICHARRO C., CARRILLO E., BUTAUD T., GUEGAND L., MARTIN V., CUISINIER A.M., MCGAHIE D., GUEGUEN S., CANAVATE C. & GRADONI L. (2014). A randomised, double-blind, controlled efficacy trial of the LiESP/QA-21 vaccine in naïve dogs exposed to two *Leishmania infantum* transmission seasons. *PLoS Negl. Trop. Dis.*, **8**(10):e3213
- OLIVA G., SCALONE A., FOGLIA MANZILLO V., GRAMICCIA M., PAGANO A., DI MUCCIO T. & GRADONI L. (2006). Incidence and time course of *Leishmania infantum* infections examined by parasitological, serologic, and Nested-PCR techniques in a cohort of naïve dogs exposed to three consecutive transmission seasons. *J. Clin. Microbiol.*, **44**, 1318–1322.
- OTRANTO D., PARADIES P., SASANELLI M., LEONE N., de CAPRARIIS D., CHIRICO J., SPINELLI R., CAPELLI G. & BRANDONISIO O. (2005). Recombinant K39 dipstick immunochromatographic test: a new tool for the serodiagnosis of canine leishmaniasis. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **17**, 32–37.
- OZBEL Y., OSKAM L., OZENSOY S., TURGAY N., ALKAN M.Z., JAFFE C.L. & OZCEL M.A. (2000). A survey on canine leishmaniasis in western Turkey by parasite, DNA and antibody detection assays. *Acta Trop.*, **74**, 1–6.
- PALATNIK-DE-SOUSA C.B., BARBOSA ADE F., OLIVEIRA S.M., NICO D., BERNARDO R.R., SANTOS W.R., RODRIGUES M.M., SOARES I. & BORJA-CABRERA G.P. (2008). FML vaccine against canine visceral leishmaniasis: from second-generation to synthetic vaccine. *Expert Rev. Vaccines*, **7**, 833–851.
- PALTRINIERI S., SOLANO-GALLEGO L., FONDATI A., LUBAS G., GRADONI L., CASTAGNARO M., CROTTI A., MAROLI M., OLIVA G., ROURA X., ZATELLI A. & ZINI E. (2010). Canine Leishmaniasis Working Group, Italian Society of Veterinarians of Companion Animals. Guidelines for diagnosis and clinical classification of leishmaniasis in dogs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, **236**, 1184–1191.
- PENNISI M.G., CARDOSO L., BANETH G., BOURDEAU P., KOUTINAS A., MIRÓ G., OLIVA G. & SOLANO-GALLEGO L. (2015). LeishVet update and recommendations on feline leishmaniasis. *Parasit. Vectors*, **8**, 302.
- PIARROUX R., AZAIEZ R., LOSSI A.M., REYNIER P., MUSCATELLI F., GAMBARELLI F., FONTES M., DUMON H. & QUILICI M. (1993). Isolation and characterization of a repetitive DNA sequence for *Leishmania infantum*: development of a visceral leishmaniasis polymerase chain reaction. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **49**, 364–369.
- REITHINGER R. & DUJARDIN J-C. (2007). Molecular diagnosis of leishmaniasis: current status and future applications. *J. Clin. Microbiol.*, **45**, 21–25.
- REITHINGER R., QUINNELL R.J., ALEXANDER B. & DAVIES C.R. (2002). Rapid detection of *Leishmania infantum* infection in dogs: comparative study using an immunochromatographic dipstick test, enzyme-linked immunosorbent assay, and PCR. *J. Clin. Microbiol.*, **40**, 2352–2356.
- RICHTER M., SCHAARSCHMIDT-KIENER D., KRUDEWIG C. (2014). Ocular signs, diagnosis and long-term treatment with allopurinol in a cat with leishmaniasis. *Schweiz. Arch. Tierheilkd.*, **156**, 289-294
- RIOUX J.A., LANOTTE G., SERRES E., PRATLONG F., BASTIEN P. & PERIERES J. (1990). Taxonomy of *Leishmania*, use of isoenzymes. Suggestions for a new classification. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.* **65**, 111–125.
- ROURA X., FONDEVILA D., SANCHEZ A. & FERRER L. (1999a). Detection of *Leishmania* infection in paraffin-embedded skin biopsies of dogs using polymerase chain reaction. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **11**, 385–387.
- ROURA X., SANCHEZ A. & FERRER L. (1999b). Diagnosis of canine leishmaniasis by a polymerase chain reaction technique. *Vet. Rec.*, **144**, 262–264.
- RÜFENACHT S., SAGER H., MÜLLER N., SCHAEERER V., HEIER A., WELLE M.M. & ROOSJE P.J. (2005). Two cases of feline leishmaniasis in Switzerland. *Vet. Rec.*, **156**, 542–545.
- SANTARÉM N., CUNHA J., SILVESTRE R., SILVA C., MOREIRA D., OUELLETTE M. & CORDEIRO-DA-SILVA A. (2014). The impact of distinct culture media in *Leishmania infantum* biology and infectivity. *Parasitology*, **141**, 192–205.
- SARIDOMICHELAKIS M.N., MYLONAKIS M.E., LEONTIDES L.S., KOUTINAS A.F., BILLINIS C. & KONTOS V.I. (2005). Evaluation of lymph node and bone marrow cytology in the diagnosis of canine leishmaniasis (*Leishmania infantum*) in symptomatic and asymptomatic dogs. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **73**, 82–86.

SCALONE A., DE LUNA R., OLIVA G., BALDI L., SATTÀ G., VESCO G., MIGNONE W., TURILLI C., MONDESIRE R.R., SIMPSON D., DONOGHUE A.R., FRANK G.R. & GRADONI L. (2002). Evaluation of the *Leishmania* recombinant K39 antigen as a diagnostic marker for canine leishmaniasis and validation of a standardized enzyme-linked immunosorbent assay. *Vet. Parasitol.*, **104**, 275–285.

SCHÖNIAN G., MAURICIO I., GRAMICCIA M., CAÑAVATE C., BOELAERT M. & DUJARDIN J-C. (2008). Leishmaniasis in the Mediterranean in the era of molecular epidemiology. *Trends Parasitol.* **24**, 135–142.

SHUIKINA E.E., SERGIEV V.P., TRIERS I.I., SHCHERBAKOV V.A. & DIVEEV S.KH. (1968). Experience of antileishmaniasis vaccination with cultures of *Leishmania tropica major* grown in various types of media. *Med. Parazitol. (Mosk.)*, **37**, 648–651 (in Russian).

SOLANO-GALLEGO L., KOUTINAS A., MIRÓ G., CARDOSO L., PENNISI M.G., FERRER L., BOURDEAU P., OLIVA G. & BANETH G. (2009). Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniasis. *Vet. Parasitol.*, **165**, 1–18,

SUNDAR S., MAURYA R., SINGH R.K., BHARTI K., CHAKRAVARTY J., PAREKH A., RAI M., KUMAR K. & MURRAY H.W. (2006). Rapid, noninvasive diagnosis of visceral leishmaniasis in India: comparison of two immunochromatographic strip tests for detection of anti-K39 antibody. *J. Clin. Microbiol.*, **44**, 251–253.

TRIGO J., ABBEUSEN M., NETTO E.M., NAKATANI M., PEDRAL-SAMPAIO G., DE JESUS R.S., GOTO Y., GUDERIAN J., HOWARD R.F. & REED S.G. (2010). Treatment of canine visceral leishmaniasis by the vaccine Leish-111f+MPL-SE. *Vaccine*, **28**, 3333–3340.

TURGAY N., BALCIOGLU I.C., TOZ S.O., OZBEL Y. & JONES S.L. (2010). Quantiferon-Leishmania as an epidemiological tool for evaluating the exposure to *Leishmania* infection. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **83**, 822–824.

VOLPINI A.C., PASSOS V.M., OLIVEIRA G.C. & ROMANHA A.J. (2004). PCR-RFLP to identify *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *L. (Leishmania) amazonensis* causing American cutaneous leishmaniasis. *Acta Trop.*, **90**, 31–37.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO) (2010). Control of the leishmaniasis, WHO Technical Report Series 949, WHO, Geneva, Switzerland, 1–186.

*

* *

NB: Existe un Laboratorio de Referencia de la OIE para la leishmaniasis (puede consultarse en la página web de la OIE: <https://www.oie.int/es/gue-ofrecemos/red-de-expertos/laboratorios-de-referencia/#ui-id-3>).

Por favor, contacte con el Laboratorio de Referencia de la OIE para más información sobre las pruebas de diagnóstico, los reactivos y las vacunas para la leishmaniasis

NB: ADOPTADO POR PRIMERA VEZ EN 1991; ÚLTIMAS ACTUALIZACIONES ADOPTADAS EN 2021.