



Facultad de Veterinaria  
Universidad Zaragoza



# Trabajo Fin de Grado en Veterinaria

Diagnóstico de la leishmaniosis visceral canina: Estudio comparativo de diferentes pruebas diagnósticas para su utilización en estudios epidemiológicos.

Diagnosis of canine visceral leishmaniasis: A comparative study of different diagnostic tests for use in epidemiological studies.

**Autor**

PAULA ORTEGA HERNÁNDEZ

**Directores**

JUAN ANTONIO CASTILLO HERNÁNDEZ

ALBERTO H CORTÉS CEBRIÁN

FACULTAD DE VETERINARIA

2016

---

# ÍNDICE

<b>RESUMEN</b>	<b>3</b>
<b>1. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS</b>	<b>4</b>
<b>2. INTRODUCCIÓN</b>	<b>5</b>
2.1 DEFINICIÓN E IMPORTANCIA DE LA ENFERMEDAD	5
2.2 ETIOLOGÍA Y CICLO BIOLÓGICO	6
2.3 RESPUESTA INMUNE	7
2.4 CUADRO CLÍNICO	8
2.5 DIAGNÓSTICO	9
2.6 TRATAMIENTO	15
2.7 PREVENCIÓN	16
<b>3. MATERIAL Y MÉTODOS</b>	<b>17</b>
3.1 ANIMALES	17
3.2 BIENESTAR ANIMAL	17
3.3 EXAMEN CLÍNICO	17
3.4 TOMA DE MUESTRAS	17
3.5 PRUEBAS DIAGNÓSTICAS	18
3.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	21
<b>4. RESULTADOS</b>	<b>22</b>
<b>5. DISCUSIÓN</b>	<b>26</b>
<b>6. CONCLUSIONES</b>	<b>29</b>
<b>7. VALORACIÓN PERSONAL Y AGRADECIMIENTOS</b>	<b>30</b>
<b>8. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>31</b>

## RESUMEN

La leishmaniosis visceral canina (LVC) es una enfermedad parasitaria, causada por *Leishmania infantum* transmisible por vectores, que afecta principalmente al perro, al que puede producir una enfermedad mortal, y que se presenta de forma endémica en España.

El objetivo de este trabajo ha sido validar y comparar una técnica de diagnóstico molecular (RT-PCR o qPCR) frente a tres técnicas serológicas (IFI y AD "in house" y una ELISA comercial) en un estudio epidemiológico de la LVC en una población canina (n=29) mediante muestras de conjuntiva obtenidas con hisopo.

Se demostró, por un lado, que la técnica ELISA fue la más sensible presentando una concordancia moderada y débil con IFI y DAT respectivamente y, por otro lado, PCR en tiempo real detectó ADN del kinetoplasto de *L.infantum* en todos los animales incluso en los que todavía no pudieron desarrollar anticuerpos.

## SUMMARY

Canine visceral leishmaniasis (CVL), an endemic disease in Spain, is caused by *Leishmania infantum*. It is transmitted by vectors, and affects mainly dogs causing progressive lesions and even death.

The aim of this study was to validate and compare a molecular diagnosis technique (RT-PCR or qPCR) and three serological techniques (IFIS and AD "in house" and a commercial ELISA) in an epidemiological study of the (CVL) in an infected canine population (n=29) using samples of conjunctiva obtained with a cotton swab.

On the one hand, the commercial ELISA test gave the highest sensitivity compared to DAT and IFI tests, with moderate and weak agreements with IFI and DAT results, respectively, on the other hand, Real time PCR detected kientoplasto's DNA of *L.infantum* in all animals even in those dogs who had not developed antibodies yet.

# 1. 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, tenemos las diferentes metodologías de detección de ADN /ARN en órganos diana (PCR's) y por otro lado la detección de anticuerpos específicos frente a *Leishmania infatum*. Para un diagnóstico correcto, se ha demostrado que, es necesario la utilización conjunta de este tipo de pruebas. El principal problema que presentan ambos es su sensibilidad y especificidad, la cual puede variar mucho en función del tipo de metodologías que se utilicen y los fines que se pretendan con ellas.

El objetivo del presente trabajo es la validación y comparación de una técnica de diagnóstico molecular (RT-PCR o qPCR) frente a tres técnicas serológicas (IFI y AD "in house" y una ELISA comercial) en el estudio epidemiológico de la LVC en una población canina.

Las pruebas serológicas que se utilizaron fueron IFI y AD estandarizadas y validadas en el laboratorio del grupo de investigación "Enfermedades Metaxénicas" de la Facultad de Veterinaria y un ELISA comercial de Laboratorios HIPRA SA.

La qPCR se ha realizado con muestras conjuntivales y la serología a partir de suero.

A todos los animales se realizó un examen clínico completo en el momento de la toma de muestras.

El fin último del trabajo es conocer la prevalencia de infección en la citada población canina y la comparación (sensibilidad, especificidad, concordancia etc.) de los diferentes tipos de pruebas diagnósticas.

## 2. INTRODUCCIÓN

### 2.1 DEFINICIÓN E IMPORTANCIA DE LA ENFERMEDAD

La leishmaniosis es un grupo de enfermedades parasitarias extendidas a nivel mundial capaz de desarrollar un espectro de enfermedades, visceral, cutánea y mucocutánea, siendo la cutánea la forma más frecuente de presentación. Estas enfermedades son producidas por diferentes especies del género *Leishmania*, que es un parásito protozooario intracelular obligado transmitido por la picadura de un insecto, el flebótomo hembra.

Hoy en día, la leishmaniosis canina es considerada una enfermedad muy preocupante al tratarse de una zoonosis grave que afecta tanto a animales como al hombre en Europa, Asia, África y América. El perro doméstico tiene un papel muy importante ya que se considera el principal reservorio de la leishmaniosis visceral humana (VL) en la cuenca mediterránea, Oriente Medio y América del Sur, donde el agente causante de la infección es la especie *Leishmania infantum*.

*Leishmania infantum* se transmite por la picadura de un insecto hematófago del género *Phlebotomus* en Europa o *Lutzomyia* en América (Slappendel *et al.*, 1990; Bravo *et al.* 1993), *P.perniciosus* y *P. ariasi* son responsables de la transmisión en España. Gracias a dicho vector la leishmaniosis canina se propaga rápida y ampliamente entre las poblaciones de perros cuando existe una alta densidad de vector y de hospedador (Maia *et al.*, 2008).

El perro actúa como principal reservorio, no obstante, la liebre está involucrada como posible reservorio silvestre de la enfermedad (Molina *et al.*, 2012,). Hay otros cánidos silvestres cuyo papel en la transmisión aún está por determinar, y ya se han encontrado evidencias de la infección en zorros (Benavides *et al.*, 1985), en lobos (Zárate *et al.*, 2000), chacales y ratas (Millán *et al.*, 2016). Esto explicaría la existencia de un ciclo de vida silvestre en ausencia de perros.

El diagnóstico de esta enfermedad es complejo debido a que la infección no siempre da lugar a la enfermedad clínica y el desarrollo de una determinada presentación clínica depende de la capacidad del sistema inmunitario de hacer frente al parásito y, por otro lado, de la especie causante de la infección.

## 2.2 ETIOLOGÍA Y CICLO BIOLÓGICO

Leishmania es un protozoo digenético que pertenece al orden Kinetoplasta y a la familia Trypanosomatidae, como todos los protozoos pertenecientes a este orden poseen dos tipos de ADN: uno nuclear (ADN genómico) y otro mitocondrial denominado ADN quinoplastico. (Simpson, 1972; Borst *et al.*, 1979)

El ciclo biológico natural de Leishmania comprende dos estadios principales, bien diferenciados morfológicamente y también con respecto a su hospedador: amastigote y promastigote (Baneth *et al.*, 2012).

Un amplio rango de mamíferos actúa como hospedadores vertebrados, pero los más comunes son la especie humana, roedores y cánidos. La infección del vector ocurre cuando las hembras de los flebótomos toman sangre de un vertebrado infectado para

alimentarse y desarrollar sus huevos, y en su aparato digestivo, Leishmania que ha entrado en forma de amastigote y se transforma en la forma promastigote procíclico que se multiplica activamente en su estómago e intestino y pasa a promastigote metacíclico, estos se sitúan en la región bucal donde pasarán al hospedador vertebrado a través de la picadura.

Con cada picadura del flebótomo, entran en la dermis del hospedador vertebrado promastigotes metacíclicos, algunos de los cuales son destruidos por los leucocitos y eosinófilos, mientras, que otros son englobados en una vacuola parasitófora en el interior de los macrófagos para intentar ser eliminados, aquí el parásito se transformará en forma amastigote. Sin embargo, Leishmania evade esas reacciones inmunológicas inespecíficas del macrófago para poder vivir y multiplicarse en su interior por fisión binaria.

La infección se extiende cuando las células parasitadas se rompen y liberan los amastigotes que son fagocitados por otros macrófagos, o bien cuando los macrófagos infectados se dividen dejando los parásitos en las células hijas. Desde aquí se diseminan a través de la piel o del torrente sanguíneo y linfático por órganos ricos en células macrofágicas como son nodos linfáticos, la médula ósea, el hígado y el bazo principalmente. (Solano-Gallego *et al.*, 2011)

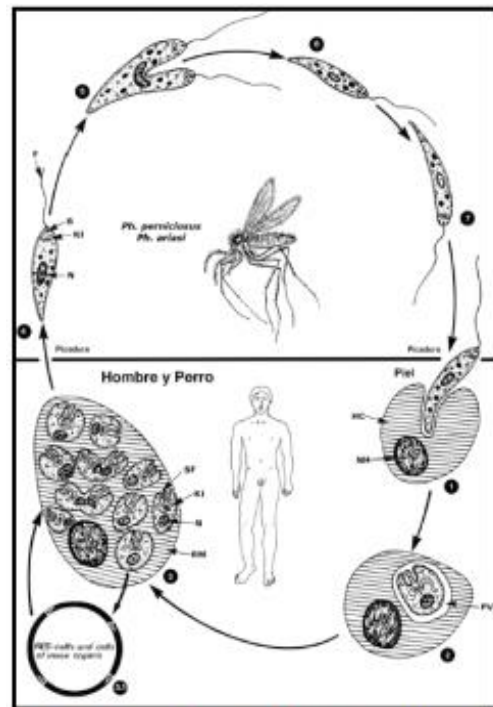


Figura 1. Ciclo de Leishmania en los hospedadores vertebrado e invertebrado. (Jorge P. Alvar Ezquerro, 2001)

Si los parásitos sobreviven, podrán ser tomados por otros flebótomos volviéndose a repetir de nuevo el ciclo, teniendo una duración aproximada de 10 días. (Moody, 1993)

## 2.3 RESPUESTA INMUNE

La leishmaniosis canina es una enfermedad caracterizada por una gran diversidad de signos clínicos y el curso de la infección está ligado tanto a la respuesta inmune del hospedador como a la presencia y multiplicación del parásito (Reis *et al.*, 2010).

Tras la infección, pueden desarrollarse dos tipos de respuesta inmune mediada por los linfocitos T, una respuesta celular (Th1) asociada a la inmunidad protectora y otra respuesta humoral (Th2) asociada a la susceptibilidad o progresión de la enfermedad (Alvar *et al* 2004;).

Los diferentes componentes de la respuesta inmune y las interacciones entre ambos tipos de respuesta son realmente diversos y complejos. No observándose necesariamente uno u otro extremo de estas respuestas, sino más bien un espectro del balance entre las mismas, (Cabral *et al* 1998; Reis *et al* 2006a; 2006b; Baneth, 2008) (Figura 2)

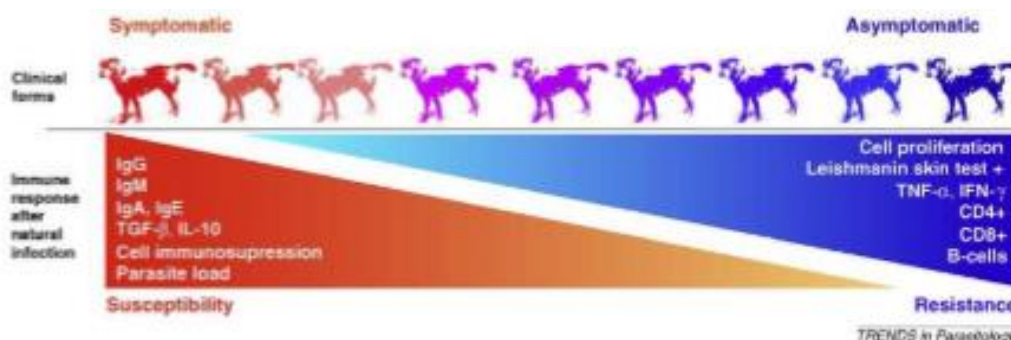


Figura 2. Espectro clínico en perros según la respuesta inmunológica presentada (Reis *et al.*, 2010)

Muchos factores hacen que un perro avance hacia el control de la infección o hacia la enfermedad clínica. El sistema inmunitario y la base genética son los factores más importantes, pero también pueden influir el sexo, estado nutricional, virulencia de la cepa de *Leishmania* y la carga parasitaria en el perro infectado, así como la presencia de infecciones previas o enfermedades concomitantes (Solano-Gallego *et al.*, 2009)

En aquellos perros con una respuesta inmunitaria protectora frente al parásito predominará un perfil con linfocitos T CD4+, caracterizado por la producción de citoquinas de tipo Th1, como IFN-gamma, IL-2 y factor de necrosis tumoral alfa (TNF-alfa), que induce la síntesis y liberación de moléculas con

actividad anti *Leishmania*, por lo que se puede controlar la diseminación del parásito y, por tanto, la infección. En los perros susceptibles se incrementa la actividad humoral, además de reducirse la inmunidad celular, con predominio de linfocitos T CD4+ con un perfil mixto de citoquinas de tipo Th1/Th2 (Barbieri, 2006; Carrillo *et al.*, 2009)

Los niveles de inmunoglobulinas específicas de *leishmania* son mayores en perros enfermos que en subclínicos. Hay una marcada asociación entre estos niveles y el estado clínico del animal. (Reis *et al.* 2006) lo que es muy importante para establecer un buen pronóstico y tratamiento. Los niveles de las diferentes subclases de IgG dependen de la activación de los subtipos Th1 y Th2. Así pues, una respuesta tipo Th1 predispone a la producción de IgG2a, mientras que la respuesta tipo Th2 favorece la secreción de la subclase IgG1.

## 2.4 CUADRO CLÍNICO

La enfermedad del perro presenta gran variabilidad de presentaciones y la respuesta inmunológica se manifiesta como un condicionante de la evolución de la enfermedad (Campino *et al.*, 2000) La infección, incluso, puede ser asintomática en un alto porcentaje de perros (60-80%) (Ferrer, 1999). Se trata de una enfermedad sistémica o visceral por lo que, en la práctica, hay que incluirla en la mayoría de los diagnósticos diferenciales. (Koutinas AF *et al.*,1999)

Los signos clínicos que podemos encontrar en la leishmaniosis son producidos por dos principales mecanismos patogénicos: por un lado, una inflamación granulomatosa no supurativa en los lugares donde se multiplica el parásito y, por otro lado, el depósito de inmunocomplejos circulantes en distintas localizaciones anatómicas. (Ferrer *et al.*,1999)

El primer mecanismo es responsable de la aparición de la sintomatología cutánea, de las lesiones hepáticas, entéricas y parte de las oculares y renales (Ridley *et al.*,1983). Debido al segundo mecanismo aparecen lesiones principalmente renales, oculares y vasculares. (Peña *et al.*, 2008)

En caso de sintomatología clínica, la enfermedad en el perro consiste en un proceso de debilidad crónica que se caracteriza por un estado nutritivo deficiente pudiendo llegar hasta la caquexia, atrofia muscular, letargia, mucosas pálidas, epistaxis, anemia, linfadenomegalia, hepatomegalia, esplenomegalia, cojera o inflamación articular y fiebre.

Los signos clínicos cutáneos o mucocutáneos más comunes son la presencia de una capa de pelo fino, sin brillo; dermatosis exfoliativa, dermatitis ulcerativa, dermatitis papular o nodular, nódulos y ulceraciones en membranas mucosas, lesión en la trufa, onicopatías e hiperqueratosis naso-digital. La



lesión más característica es la dermatitis descamativa furfurácea no pruriginosa, que aparecen principalmente alrededor de los ojos (cara de payaso) donde se ven áreas alopecicas con costras blanquecinas cerca de los ojos, en las orejas, en las patas y diversos salientes óseos. (Figura 3)

Por último, las lesiones oculares que se pueden observar son: blefaritis, conjuntivitis difusas o nodulares, queratitis seca, celulitis orbitaria, uveítis anterior y posterior, lesiones que pueden conducir a un glaucoma o a la panoftalmia y por tanto incluso a la ceguera. La glomerulonefritis es la alteración renal más frecuente y se manifiesta con proteinuria, inicialmente reversible, pero puede evolucionar a una forma terminal o irreversible en la que el animal presenta una insuficiencia renal grave con anemia, poliuria-polidipsia, uremia y vómitos. (Valladares, 1998, Ferrer, 1999).



**Figura 3.** Perro con dermatitis descamativa y áreas alopecicas alrededor de los ojos con costras blanquecinas.

Las pruebas de laboratorio de rutina son el hemograma completo, la bioquímica sérica, el proteinograma y el examen de la orina. 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. Otras alteraciones que se pueden encontrar gracias a éstas pruebas de laboratorio son incrementos de la ALT, gamma GT (marcadores de daño hepático), urea, creatinina y la presencia de proteinuria o de hematuria (Palacio J. *et al.*, 1995) indicadoras de daño renal.

## 2.5 DIAGNÓSTICO

Es necesario realizar el diagnóstico para confirmar la enfermedad clínica y determinar la presencia de infección en estudios de investigación, para la detección de los perros clínicamente sanos que viven en zonas endémicas, para prevenir la trasmisión de portadores subclínicos mediante transfusión de sangre, evitar la importación de perros infectados en zona no endémicas, y monitorizar la respuesta al tratamiento.

Se recomienda combinar el examen clínico-patológico con una confirmación laboratorial de la enfermedad. Para ello, se puede realizar un diagnóstico parasitológico, mediante la observación

directa al microscopio de amastigotes, cultivo o PCR del parásito, o mediante serología, ya sea basada en anticuerpos (IFI, ELISA, DAT, prueba rK39) o en antígenos (Chappuis *et al.*, 2007)

### ❖ **Diagnóstico clínico**

El diagnóstico de la leishmaniosis clínica es complejo por lo que es importante conocer la historia clínica, realizar un examen físico completo que incluya, a ser posible, un examen dermatológico y oftalmológico, y pruebas de laboratorio de rutina, como hemograma, bioquímica, urianálisis y radiografías o ecografías, pueden ayudarnos a aumentar el índice de sospecha de esta enfermedad. (Solano-Gallego & Baneth, 2008)

### ❖ **Diagnóstico laboratorial**

El diagnóstico de la leishmaniosis puede llevarse a cabo mediante técnicas directas o indirectas. Las razones por las que queremos un diagnóstico laboratorial, son para estudios epidemiológicos, confirmación de la infección y control terapéutico entre otras. (Baneth & Aroch, 2008)

#### • **Métodos directos**

##### **Examen microscópico**

Se puede realizar un diagnóstico concluyente mediante observación directa al microscopio de los amastigotes de *Leishmania* en frotis teñidos de órganos y tejidos infectados, como médula ósea, linfonodos, piel o sangre periférica. El principal problema es que la mayoría de estas muestras se obtienen a través de procedimientos invasivos que, generalmente, no son útiles para detectar al parásito en perros asintomáticos (Alvar *et al.*, 2004)

##### **Histopatología**

El análisis histopatológico de órganos infectados teñidos con Hematoxilina-Eosina (HE) también se han empleado para detectar la presencia del parásito, aunque se requiere bastante tiempo para poder identificar el amastigote mediante esta técnica (Xavier *et al.*, 2006).

##### **Inmunohistoquímica (IHQ)**

La IHQ es una herramienta que se basa en la detección del antígeno de *Leishmania* utilizando, como anticuerpos primarios, anticuerpos procedentes del suero de un perro infectado (suero hiperinmunizado) o anticuerpos monoclonales o policlonales. Se trata de una técnica complementaria a la H-E, bastante sensible y específica. (Tafari *et al.*, 2004).

### ***Cultivo in vitro del parásito.***

El cultivo in vitro de diferentes tejidos puede mejorar la detección del parásito. No todas las cepas de *Leishmania* crecen en los mismos medios, y no todos los tejidos y órganos del mismo perro tienen una carga parasitaria similar. Por ello la duplicación de las muestras podría aumentar y mejorar la sensibilidad diagnóstica de esta técnica (Evans, 1989)

La principal aplicación de esta técnica es el aislamiento de la especie responsable de la infección, así como de la posterior especiación, identificación de la cepa o la evaluación in vitro de nuevos fármacos con capacidad leishmanicida (Maia & Campino, 2008)

### ***Xenodiagnóstico***

El xenodiagnóstico se emplea para la detección y aislamiento del parásito a partir de su vector artrópodo. Se emplea para el estudio epidemiológico del papel que juegan los vectores en el estudio clínico y tratamiento de los perros, pero no suele utilizarse como herramienta diagnóstica de leishmaniosis canina, ya que solo puede llevarse a cabo en laboratorios especializados que disponen de colonias viables de flebótomos.

### ***Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)***

Los métodos basados en la PCR son los más fiables para la detección y la identificación del parásito, no solo en animales con la enfermedad activa, sino también en aquellos que están en tratamiento, en los que permite monitorizar la curación parasitológica, ya que amplifican específicamente un fragmento del organismo en cuestión.

En esta técnica se amplifican fragmentos de ADN del quinetoplasto, que aparecen repetidos en múltiples copias en el parásito, alcanzando una sensibilidad del 95%-100%. (Moreira 2007).

La PCR de *Leishmania* se puede realizar por extracción de ADN de diferentes tejidos, sangre, fluidos biológicos e incluso material histológico. La médula ósea, ganglios linfáticos, bazo o piel son los tejidos más sensibles para el diagnóstico mediante PCR (Maia & Campino, 2008; Manna *et al.*, 2008). La obtención de muestras no invasivas de hisopos conjuntivales parece tener una elevada sensibilidad para la detección de *L.infantum* en grupos de perros seropositivos con leishmaniosis clínicas (Strauss-Ayali *et al.*, 2004)

A pesar de su alta fiabilidad, debemos tener en cuenta que un resultado negativo de PCR en un perro clínicamente sospechoso no es suficiente para descartar la infección. El amplio rango de sensibilidad que se observan en los diferentes estudios se podría explicar por la heterogeneidad de la distribución del parásito en cada tejido o por la carga parasitaria del órgano estudiado, que debe asociarse también

al tropismo de la cepa de *Leishmania* y a la respuesta inmunitaria local del hospedador. (Maia *et al.*, 2007)

Además, la eficacia de la técnica de PCR depende de otros muchos factores, como los cebadores seleccionados, el número de copias realizadas, el método de extracción del ADN, el material de muestra a analizar y el protocolo que se sigue de la técnica (Alvar *et al.*, 2004; Baneth & Aroch, 2008)

### ***Real-Time PCR (qPCR)***

La qPCR es un método cuantitativo que permite la monitorización continuada de las secuencias amplificadas de ADN específicas conforme sucede la reacción. Esto permite la cuantificación exacta del ADN presente al principio de la reacción y, a partir de esta, una estimación de la carga parasitaria relativa de las diferentes muestras biológicas empleadas.

Las ventajas que presenta la qPCR con respecto a la PCR convencional son el aumento de la sensibilidad, reducción del tiempo de la prueba, menor riesgo de contaminación, y la utilidad en la monitorización de la carga parasitaria del animal durante la infección y el tratamiento (Rodríguez-Cortés *et al.*, 2007).

En consecuencia, la PCR cuantitativa es muy útil para el diagnóstico de la leishmaniosis canina ya que facilita la monitorización de la carga parasitaria del animal infectado durante y después del tratamiento en diferentes tipos de muestras, lo que permite predecir la reaparición de la infección asociada a las cargas residuales del parásito en los tejidos tras el tratamiento (Francino *et al.*, 2006; Solano-gallego *et al.*, 2007)

- ***Métodos indirectos***

### ***Basados en la respuesta inmune humoral***

Los métodos serológicos se basan en la detección de anticuerpos específicos producto de la respuesta inmunitaria humoral del animal frente al agente infeccioso. Es necesario tener en cuenta que la presencia de anticuerpos no implica que el animal manifieste signos clínicos y que, por el contrario, no todos los animales infectados presentan anticuerpos.

La muestra más habitual en este caso es el suero, donde las concentraciones de anticuerpos antileishmania específicos se correlacionan con la parasitemia y con el estado clínico del animal (Rodríguez-Cortés *et al.*, 2007).

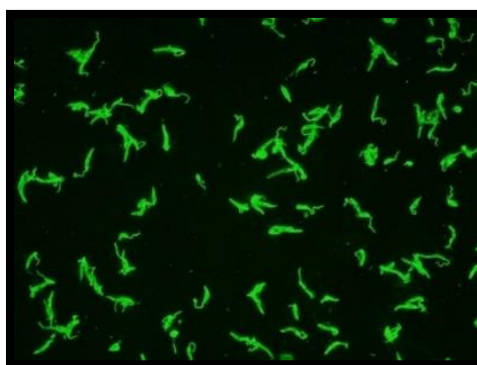
Existe una amplia gama de técnicas serológicas, entre las que destacan la aglutinación directa (DAT), la inmunofluorescencia indirecta (IFI) y el ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA), siendo estas pruebas las más utilizadas. Otros métodos son Western blot (WB), dot-ELISA, los test

rápidos inmunocromáticos, test de inmunodifusión (ID) o Citometría de flujos (CF). La sensibilidad y la especificidad de cada una de ellas no dependen únicamente de las características inherentes a la propia técnica, sino, en gran medida, del antígeno utilizado.

#### ➤ *Inmunofluorescencia indirecta (IFI)*

Se considera la prueba estándar de diagnóstico serológico. En esta técnica se emplea el cuerpo entero del parásito como antígeno por lo que es muy útil en estudios epidemiológicos, en la clínica y en el seguimiento del tratamiento (Alvar *et al.*, 2004)

La limitación de IFI es la subjetividad en la lectura, la poca idoneidad de la técnica para estudios epidemiológicos debido al gran número de muestras que se deben analizar en estos casos y la existencia de diferentes criterios para establecer el límite de positividad de la muestra relacionado a menudo con los diferentes aislamientos de *Leishmania* utilizados (Acedo-Sánchez *et al.*, 1998, Cabral *et al.*, 1998) sumado a la necesidad de un microscopio de fluorescencia. Se debe realizar diluciones seriadas de los sueros, lo que la convierte en una técnica bastante laboriosa y poca práctica cuando se procesa un gran número de muestras.



**Figura 4.** Muestra positiva a *Leishmania* realizada mediante Inmunofluorescencia indirecta. J.A Castillo, 2016.

Se consideran positivas aquellas muestras en las que se observa fluorescencia verde homogénea al microscopio, mientras que las que se ven color rojo se califican como negativas. (Figura 4)

#### ➤ *Aglutinación directa (DAT)*

El DAT es una técnica serológica cuantitativa cuyo principio es el fenómeno de aglutinación en el que los anticuerpos del suero del paciente reaccionan de manera específica con el antígeno. Se puede utilizar tanto en suero como en sangre entera. Se considera un resultado positivo cuando es visible el fenómeno de aglutinación. Esta se observa a simple vista en forma de esfera o botón agrandado en el fondo del pocillo (Schallig *et al.*, 2002)

Esta prueba emplea promastigotes enteros teñidos en forma de suspensión o congelados en polvo (freeze-dried). Es barata y fácil de realizar, lo que la convierte en ideal tanto para uso laboratorial como de campo.

Una de las limitaciones de DAT es que el periodo de incubación necesario para la lectura de los resultados es relativamente largo y que hay que hacer diluciones seriadas de los sueros o sangres, por lo que es laborioso y poco adecuado cuando se trabajan con grandes volúmenes de muestras (Harith *et al.*,1989)

#### ➤ *Ensayo inmunoenzimatico (ELISA)*

La técnica ELISA es útil tanto para análisis en laboratorios como para su uso en el campo y permite trabajar con un gran número de muestras en poco tiempo, ya que su realización es bastante sencilla y se puede aplicar con varios tipos de antígenos, además de la objetividad que presenta la lectura realizada mediante el espectrofotómetro.

El fundamento de esta técnica consiste en evidenciar la reacción antígeno-anticuerpo en el suero de los animales infectados por medio de una enzima que trasforma un substrato en un producto cuantificable mediante espectrofotometría.

La sensibilidad y especificidad de ELISA depende de los antígenos utilizados, que pueden ser extractos enteros o solubles de promastigotes, proteínas recombinantes o purificadas (Miró *et al.*,2008).

#### ***Basados en la respuesta inmune celular***

Este tipo de técnicas se encuentran poco estandarizadas y su uso se restringe casi exclusivamente a la investigación. Una de ellas es el test de reacción intradérmica, test de Montenegro de leishmania (LST), que consiste en valorar la respuesta celular in vivo tras la inoculación intradérmica de promastigotes inactivados. Refleja la presencia de respuesta inmunitaria de células específicas frente a leishmania.

Por último, la detección de IFN $\gamma$ , la citoquina más importante involucrada en la respuesta celular frente al parásito, puede realizarse empleando los sobrenadantes de linfocitos estimulados con antígeno de Leishmania, pero este bioensayo es bastante laborioso.

#### ❖ ***Aproximación diagnostica global***

La aproximación diagnostica más útil para investigar la infección en perros enfermos y sanos incluye por un lado la observación mediante microscopio óptico, por otro lado, la detección de anticuerpos anti-Leishmania mediante técnicas serológicas cuantitativas y, por último, detección de ADN de Leishmania en tejidos mediante técnicas moleculares. Es muy importante insistir en que la información obtenida mediante PCR no puede utilizarse de forma separada de los datos clínico-patológicos y los resultados de la serología. Toda esta información debe interpretarse de manera conjunta para llegar a una evaluación completa, exhaustiva y correcta de cada caso (Solano-Gallego *et al.*, 2009)

## 2.6 TRATAMIENTO

El manejo terapéutico es problemático y discutido porque, aunque la respuesta inicial al tratamiento es buena, raramente consigue evitar las recaídas, situación que seguramente se puede deber a la peculiar respuesta inmune, a la presencia de parásitos intracelulares en zonas poco vascularizadas que dificultan la presencia de concentraciones adecuadas de fármacos y a la aparición de cepas de *Leishmania* resistentes a los antimoniales.

Los medicamentos que más se emplean en el tratamiento de la leishmaniosis canina son: Antimoniato de Meglumine, Alopurinol, Aminosidina, Miltefosina, Amfotericina B, Espiramicina y Marbofloxacin, combinados de diferentes formas entre sí (Solano-Gallego *et al.*, 2009). Estos sirven para mejorar los signos clínicos, pero ninguno de ellos tiene la capacidad de eliminar la infección. Además, hay que tener en cuenta la resistencia a los fármacos y su toxicidad (Noli & Auxilia, 2005).

La combinación del Antimoniato de Meglumine con Alopurinol se considera la terapia más eficaz, y es el protocolo de elección a la hora de tratar la enfermedad (Denerolle & Bourdoiseau., 1999) pero hay muchas variaciones en función de la dosificación de los productos y de la duración del tratamiento. Otra combinación de similar eficacia es la compuesta por Miltefosina con Alopurinol (Manna *et al.*, 2008)

Últimamente se usan moléculas inmunomoduladoras para el tratamiento como la proteína P-MAPA. El tratamiento con este inmunomodulador mejora los signos clínicos y reduce la carga parasitaria en piel (Santiago, 2013). También se utiliza la proteína recombinante de cisteína de *L. infantum* (rLdcccys1) para inmunoterapia (Ferreira, 2014). Los animales tratados con la misma no muestran empeoramiento en los signos clínicos, también reducen la carga parasitaria en bazo, y aumenta la concentración de IFN $\gamma$  y disminuye la de IL-10.

En definitiva, algunos perros que inicialmente responden bien a la terapia pueden presentar recaída después del tratamiento o incluso durante el mismo, lo que nos indica que la infección persiste. Además, no suele haber curación parasitológica, es decir, que, aunque los animales se recuperan clínicamente, suelen albergar al parásito y continúan siendo reservorios y contagiosos para los flebótomos (Manna *et al.*, 2008; Ribeiro *et al.*, 2008)

## 2.7 PREVENCIÓN

El control de la leishmaniosis canina está íntimamente relacionado con el de la leishmaniosis humana ya que al actuar en el perro como el principal reservorio vertebrado de *L.infantum*, puede tener un impacto positivo reduciendo así el número de casos humanos de enfermedad.

Cualquier intento de control implica el desarrollo de programas de lucha de aplicación en áreas extensas de territorios, en las que se incluyen medidas contra los vectores y los reservorios, así como, medidas para la protección de hospedadores definitivos.

En primer lugar, es importante evitar la picadura de los flebótomos a los perros. Es aconsejable restringir las salidas de los perros durante las estaciones de máxima actividad de los vectores (mayo-octubre) del anochecer al amanecer, evitar los hábitats más favorables para los flebótomos y el uso de insecticidas ambientales y tópicos que protejan de manera específica al perro contra la picadura del vector (Alexander & Maroli, 2003)

Para interrumpir el ciclo y reducir la incidencia existen collares impregnados de permetrina que da buenos resultados y distribuye el producto por todo el tejido adiposo subcutáneo del animal (Halbig *et al*, 2000). El efecto repelente de estos collares suele durar hasta 6 meses (Killick-Kendrick *et al.*, 1997).

Otras medidas de control incluyen sprays y las pipetas que también ofrecen protección, pero su efecto dura 2 o 3 semanas aproximadamente.

En las últimas décadas, se han llevado a cabo esfuerzos considerables para seleccionar los posibles antígenos de *Leishmania* como candidatos vacúnales, así como los mejores adyuvantes para tales vacunas (Palatnik-de-Sousa, 2008)

En Europa está disponible la vacuna LiESP/QA-21 bajo el nombre de CaniLeish (Virbac, Francia) compuesta por proteínas excretoras-secretoras purificadas de *L. infantum* con adyuvante QA-21, fracción purificada de saponina *Quillaja saponaria*. Moreno demuestra un perfil inmunitario predominante de Th1 y una reducción de la carga parasitaria por parte de los macrófagos en cultivos celulares (Moreno *et al.*, 2014).

Por último, se ha demostrado que el uso de la Domperidona (antagonista de los receptores dopaminérgicos D2) reduce los signos clínicos y los títulos de anticuerpos y, por otro lado, aumenta la respuesta inmune celular, junto con un aumento reversible de prolactina en sangre. (Gómez-Ochoa *et al.*, 2009). Además, se ha aprobado su uso como preventivo para la leishmaniosis canina en algunos países europeos.



## 3. MATERIAL Y MÉTODOS

### 3.1 ANIMALES

Para el presente trabajo se han utilizado 29 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 Centro de Investigaciones Biológicas (CIB-CSIC) Madrid. Todos los animales (15 machos y 14 hembras) han sido infectados experimentalmente con  $10^8$  promastigotes de *Leishmania infantum* vehiculados en solución salina estéril.

### 3.2 BIENESTAR ANIMAL

El mantenimiento del bienestar animal y de la salud de los mismos, así como su identificación y seguimiento clínico, han sido garantizados por veterinarios cualificados de acuerdo a la legislación española actual (RD 53/2013). El alojamiento, manejo y alimentación de los animales se llevó conforme a los requisitos etológicos del animal empleado en la investigación, asegurando que se evite el estrés asociado al confinamiento prolongado.

### 3.3 EXAMEN CLÍNICO

Se exploró a cada animal, tomando temperatura y recogiendo las constantes básicas (frecuencia cardíaca, respiratoria, pulso), después se examinaron mucosas (conjuntiva y oral) valorando la coloración, posible presencia de úlceras y el TRC (tiempo rellenado capilar). Se prestó especial atención a la presencia de signos de uveítis en el globo ocular y a las alopecias perioculares y auriculares. Se valoró tamaño de los ganglios submaxilares, preescapulares y poplíteos y se revisó toda la capa del animal en busca de lesiones alopécicas, úlceras en la zona de apoyo, hiperqueratosis o dermatitis exfoliativa. Después de explorar al animal se realizó la toma de muestras.

### 3.4 TOMA DE MUESTRAS

**Suero y sangre entera:** Se obtuvo a partir de la vena cefálica o yugular. Para la obtención de suero se recogieron 2 ml en un tubo sin anticoagulante con gránulos inertes para la rápida retracción del coágulo y para una mejor obtención del mismo se centrifugó 10 minutos a 2500 rpm. Finalmente, para la detección de ADN de *Leishmania* en sangre total se recogió 1 ml en un tubo con anticoagulante (EDTA).

**Hisopo de conjuntiva:** Se utilizó un hisopo de algodón fino (estéril), para ello se separaron los párpados y se recorrió con el hisopo el ángulo interno del ojo, teniendo la precaución de no rozar la parte exterior del mismo.

### 3.5 PRUEBAS DIAGNÓSTICAS

#### ➤ INMUNOFLORESCENCIA INDIRECTA (IFI)

En primer lugar, se antigenaron placas de 10 pocillos cada una, para ello se depositó 10 µl de la dilución de promastigotes en cada pocillo con micropipeta. Una vez terminadas, se secaron durante 1 hora a 37 °C protegidas del polvo y la luz solar en una estufa de cultivo.

Secados los pocillos, se introdujeron 10 minutos en acetona a -20°C y se dejó secar al aire. Después se procedió al lavado de las placas con PBS (pH 7,2) durante 10 minutos con agitación suave. Una vez secas a temperatura ambiente se almacenaron congeladas y en oscuridad hasta su utilización. Antes de realizar la técnica se dejó descongelar aproximadamente 10 minutos a temperatura ambiente.

Siguiendo las indicaciones de Fernández-García *et al.*, 2009, se realizó las diluciones al duplo de los sueros, comenzando por la dilución 1:20. A cada pocillo se añadieron 10 µl de cada dilución de los sueros junto con un pocillo control positivo y otro negativo por cada placa para así aumentar la fiabilidad de la técnica y se incubó media hora a 37 °C en cámara húmeda. Se lavaron 3 veces en PBS durante 10 minutos en agitación suave y se dejó secar.

Se añadió a cada pocillo 10 µl del conjugado (Anti IgG de perro marcada con isotiocinato de fluoresceína -FITC) convenientemente diluido. La dilución del conjugado se hizo con PBS que lleva azul de Evans al 1: 10000 (1 ml de solución madre de Azul de Evans por cada 500 ml de PBS)

Se incubó otra media hora a 37 °C en cámara húmeda y se lavó dos veces en PBS durante 10 minutos en agitación suave, se aclaró con agua destilada y se dejaron secar.

Se les añadió medio de montaje y se depositó un cubreobjetos de 22 x 60 mm y, finalmente se observó en el microscopio de fluorescencia (Nikon Eclipse 80i). Se consideró positiva la prueba cuando la mayoría de promastigotes presentaron fluoresceína verde y negativa cuando presentaron una coloración rojiza mate. En cuanto al punto de corte, se acordó que una titulación igual o superior a 1/80 sería considerada como suero positivo y entre 1/40 y 1/80 dudoso.

### ➤ **AGLUTINACIÓN DIRECTA (DAT)**

La prueba se realizó en placas de 96 (12 x 8) pocillos con fondo en uve. En cada pocillo se puso 50 µl de una dilución del suero problema, comenzando en 1/100, y diluyendo a la mitad sucesivamente en pocillos contiguos (1/200, 1/400, 1/800, 1/1600, 1/3200) en una dilución de β-mercaptoetanol. A continuación, se añadió 50 µl del antígeno a cada pocillo. Además, en cada placa se colocó un control positivo y un control negativo para validar el antígeno. Antes de guardar la placa, se agitó para conseguir una correcta homogeneización, y a continuación en un ambiente húmedo y protegido de la luz se incubó durante 18-24 horas (Harith *et al.*, 1986). La titulación de un suero corresponde a la dilución anterior al punto idéntico al control negativo. En este trabajo se consideraron positivos todos los sueros con una titulación igual o superior a 1/800.

### ➤ **ELISA**

Para la realización de esta técnica se utilizó el Kit de ELISA comercial de HIPRA SA (CaniLeish) y se siguieron las pautas indicadas en el mismo.

Para su lectura, se realizó una medida de la absorbancia como densidad óptica (DO) mediante un lector de ELISA (Multiscan RC 6.0, Labsystems) a 405 nm. Las muestras de suero se analizaron por duplicado y el valor medio de DO se convirtió en un porcentaje relativo siguiendo la siguiente fórmula: % RIPC= (DO muestra-DO control negativo) / (DO control positivo-DO control negativo) x100. Se consideran positivos todas las muestras que se encuentran por encima del valor 1.1, dudosos los que están comprendidos entre 0.9 y 1.1 y por debajo de 0.9 negativos.

### ➤ **REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)**

El procesamiento de la muestra, extracción del DNA y realización de la qPCR se llevó a cabo en los laboratorios de la Unidad de Enfermedades Infecciosas, del Departamento de Patología Animal, de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Zaragoza.

La técnica desarrollada y puesta a punto en nuestro laboratorio se trata de una PCR cuantitativa basada en la detección de un fragmento específico de ADN de *L. infantum* sobre el minicirculo del kinetoplasto, y se fundamenta en la descrita por Khademvatan *et al.*, 2011. Esta qPCR está diseñada para amplificarse mediante el fluorocromo conocido como SYBR Green (GoTaq® Hot Start Green Master Mix 2X, Promega, EEUU).

Para el control interno de amplificación se realizó una determinación de las copias del gen de β-actina en cada muestra de ADN extraída que además se utilizó para la determinación de las copias relativas entre diferentes hisopos.

Las secuencias de los cebadores empleados en este estudio se pueden observar en la Tabla 1.

**Tabla 1.** Secuencias de los cebadores seleccionados.

Nombre cebador	Secuencia	Tipo PCR	Referencia
JW 13	5'- ACTGGGGGTTGGTGTAAAATAGG -3'	qPCR	Khademvatan <i>et al.</i> (2011)
JW 14	5'- TTTCGCAGAACGCCCTACCC -3'	SYBR	
Actina F	5'-ACCTGGAGTTCGAGGYTCGGA-3'	qPCR	Solano-Gallego
Actina R	5'-AAGTAACCCTGGTTGGTGAAGCAG-3'	SYBR	<i>et al.</i> (2001)

**-Extracción del ADN:** En primer lugar, se procedió a la extracción del ADN de las muestras de hisopo mediante el kit comercial de MO BIO UltraClean® BloodSpin® DNA Isolation Kit (MO BIO Laboratories, Ref. 12200-250), siguiendo el protocolo propuesto por la casa comercial con alguna pequeña modificación.

**-Optimización de la PCR cuantitativa:** En base a las condiciones óptimas de amplificación descritas por otros autores, se decidió llevar a cabo cada reacción en un volumen final de 20 µl. Tanto para la detección de ADN de *L. infantum* como para la detección del gen de la β-actina, las concentraciones de los cebadores empleados en este estudio se ajustaron a 0,3 µmol l<sup>-1</sup> por cada uno de ellos y el volumen de muestra de ADN ascendió a 2,5 µl.

Como soporte de la reacción se utilizaron placas de PCR de 48 pocillos (low 48-well Clear, Bio-Rad, Ref. 012250). La amplificación de todas las muestras se realizó por duplicado, distribuyendo en un primer pocillo la muestra a su concentración de origen y realizando en el segundo una dilución 1/10 de la primera. En la placa de reacción se incluyó, por un lado, una réplica de un control positivo del proceso elaborado a partir de promastigotes de *L. infantum* procedentes de cultivo para confirmar la repetitividad de la técnica y comprobar que las condiciones de amplificación habían sido las adecuadas. Por otro, se añadió un control negativo (agua libre de ADN) en cada placa para corroborar la ausencia de contaminación durante la manipulación de las muestras.

Todas las reacciones se llevaron a cabo en el termociclador MiniOpticon™ System (BIORAD) según las siguientes condiciones: una desnaturalización inicial a 94 °C durante 5 minutos seguida de 45 ciclos de amplificación con 15 segundos a 94 °C, 30 segundos a 55 °C y 20 segundos a 72 °C. La adquisición de fluorescencia para la fase cinética se realizó a la temperatura de 79 °C. Para poder confirmar el

resultado final en la técnica molecular “qPCR SYBR” se realizó la curva de fusión obtenida de cada pocillo de la placa. Se consideró positiva la muestra que da una amplicón de 83 °C de temperatura de disociación. Este paso se realizó en un rango de temperaturas comprendido entre 67 °C y 95 °C con un incremento de 0,5 °C. Los resultados obtenidos fueron analizados usando el programa Bio-Rad CFX Manager, versión 2.1. Para el cálculo de la carga parasitaria de las muestras se procedió a la cuantificación relativa mediante el uso de la fórmula  $2^{-\Delta\Delta CT}$  (Livak *et al.*, 2001), teniendo en cuenta que el ADN del gen del kinetoplasto de los amastigotes de *Leishmania* tiene una media de 10.000 copias (Francino *et al.*, 2006). Además, también se realizó una curva estándar con muestras de promastigotes de cultivo puro con el fin de verificar el cálculo de las cargas parasitarias.

### **3.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Todas las muestras y datos obtenidos se recogieron en una hoja de cálculo Microsoft Office Excel para su posterior análisis estadístico. Los cálculos estadísticos se realizaron con el programa IBM SPSS Statistics Base 22.0 y la herramienta WinEpi. El análisis descriptivo de los datos se efectuó mediante el cálculo de frecuencias, medias y desviación estándar. El grado de concordancia entre las tres técnicas serológicas empleadas se estimó mediante el coeficiente Kappa. Como pruebas de contraste estadístico, cuando la variable cuantitativa fue homocedástica, se calculó el coeficiente de correlación de Pearson. Los valores de  $P < 0.05$  fueron considerados estadísticamente significativos.

## 4. RESULTADOS

En primer lugar, se describen los resultados serológicos obtenidos con las tres técnicas desarrolladas. En la Tabla 2 se puede observar el porcentaje de animales que resultaron seropositivos, seronegativos y dudosos según la técnica serológica empleada (DAT, IFI y ELISA).

**Tabla 2.** Resultados serológicos obtenidos mediante DAT, IFI y ELISA.

Técnica serológica	Resultados		
	Positivo	Negativo	Dudoso
DAT	51,7% (15/29)	37,9% (11/29)	10,3% (3/29)
IFI	65,5% (19/29)	20,7% (6/29)	13,8% (4/29)
ELISA	82,8% (24/29)	17,2% (5/29)	0%

Según estos resultados, se pudo apreciar que la técnica más sensible fue el ELISA, detectando un 82,8% de animales positivos, seguido por el IFI que detectó un 65,5% y finalmente el DAT, que mostró un 51,7%. Por otro lado, es importante resaltar que, a diferencia del resto de pruebas serológicas, la técnica de ELISA no arrojó ningún resultado dudoso.

Respecto a los cinco animales que salieron seronegativos con el método ELISA cabe señalar que se detectó un ligero rastro de anticuerpos a lo largo del estudio a pesar de que en ningún caso llegó a sobrepasar el punto de corte para ser considerados como positivos.

Para el cálculo de la concordancia entre las tres técnicas serológicas se recurrió al cálculo del coeficiente de concordancia kappa mediante el programa WinEpi. Como puede observarse en la Tabla 3, los resultados de la prueba DAT con respecto a los obtenidos con IFI y ELISA mostraron una concordancia débil. Sin embargo, las técnicas de IFI y ELISA fueron las que mayor grado de concordancia manifestaron entre sí.

**Tabla 3.** Concordancia entre las técnicas DAT, IFI y ELISA.

Técnica serológica	Coefficiente Kappa	Grado de concordancia*
IFI-DAT	0,231	Débil
ELISA-DAT	0,387	Débil
IFI-ELISA	0,592	Moderada

\*Interpretación del coeficiente según (Thrusfield, 2007)

Tomando en consideración todo lo anterior, se decidió elegir la técnica de ELISA para su posterior comparación con el diagnóstico molecular.

Respecto a la evaluación clínica de los animales, un 89,7% (26/29) presentaron algún signo clínico compatible con leishmaniosis canina, frente a un 10,3% (3/29) que no presentó ningún signo.

En relación al diagnóstico molecular de la leishmaniosis canina en la conjuntiva ocular, la PCR cuantitativa desarrollada detectó ADN del parásito en un 100% (29/29) de los animales. Con respecto a la temperatura de fusión de la técnica, tanto los controles positivos como las muestras presentaron una temperatura entre 83-84 °C, lo que permitió confirmar la detección de ADN de *L. infantum* en las muestras problemas (Figura 5). Por otro lado, se detectó ADN del gen de la  $\beta$ -actina en las 29 muestras, con un valor de Ct medio de  $26,81 \pm 1,87$  (dentro de la normalidad), lo que sugiere que tanto la toma de muestras como la amplificación del ADN fue correcta.

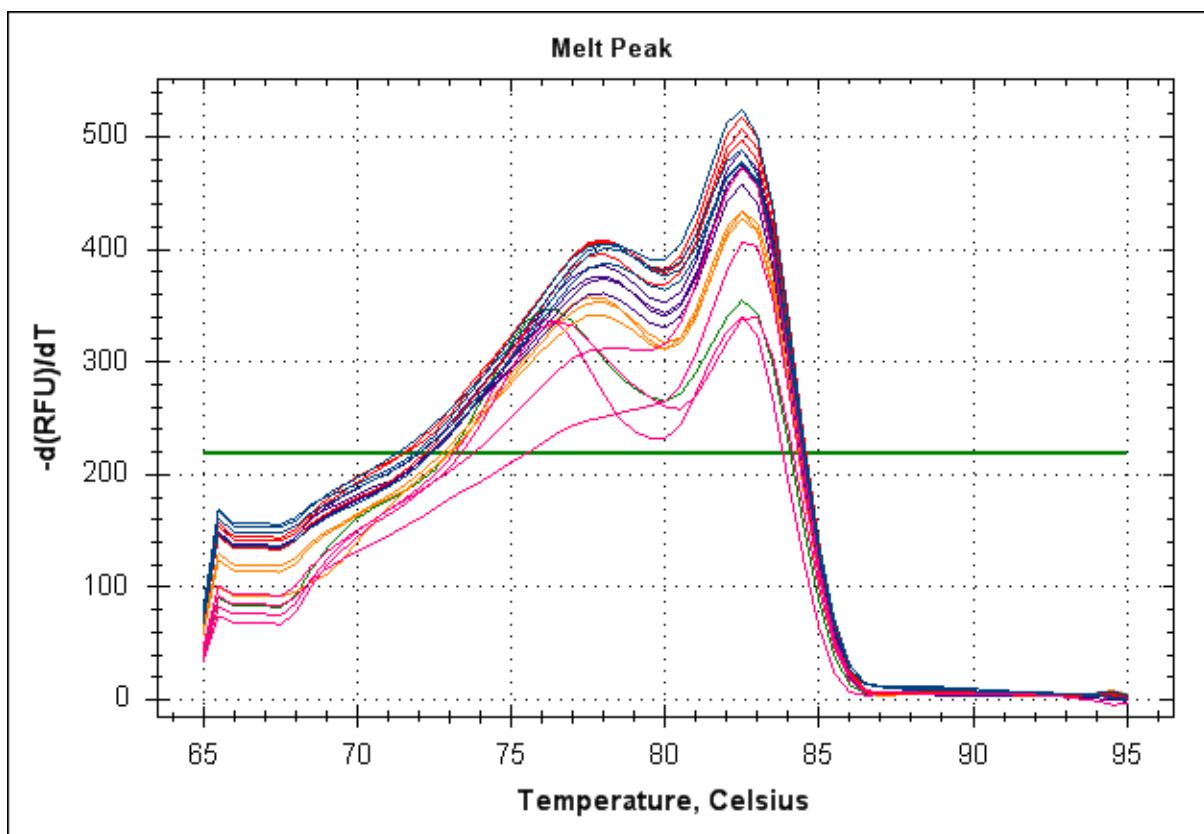


Figura 5. Curva con la temperatura de fusión de la PCR cuantitativa para la detección de *L. infantum*.

Los valores Ct observados para la detección de *L. infantum* variaron de 24,14 a 35,38, siendo la Ct media de las muestras  $30,88 \pm 2,67$ , lo que indica una cantidad media de ADN equivalente a 2,23 parásitos por muestra de hisopo. Estos cálculos se determinaron basándose en la curva estándar de los promastigotes. (Figura 6 a, b), según la fórmula  $2 e^{(38-ct)} * (80/10000)$

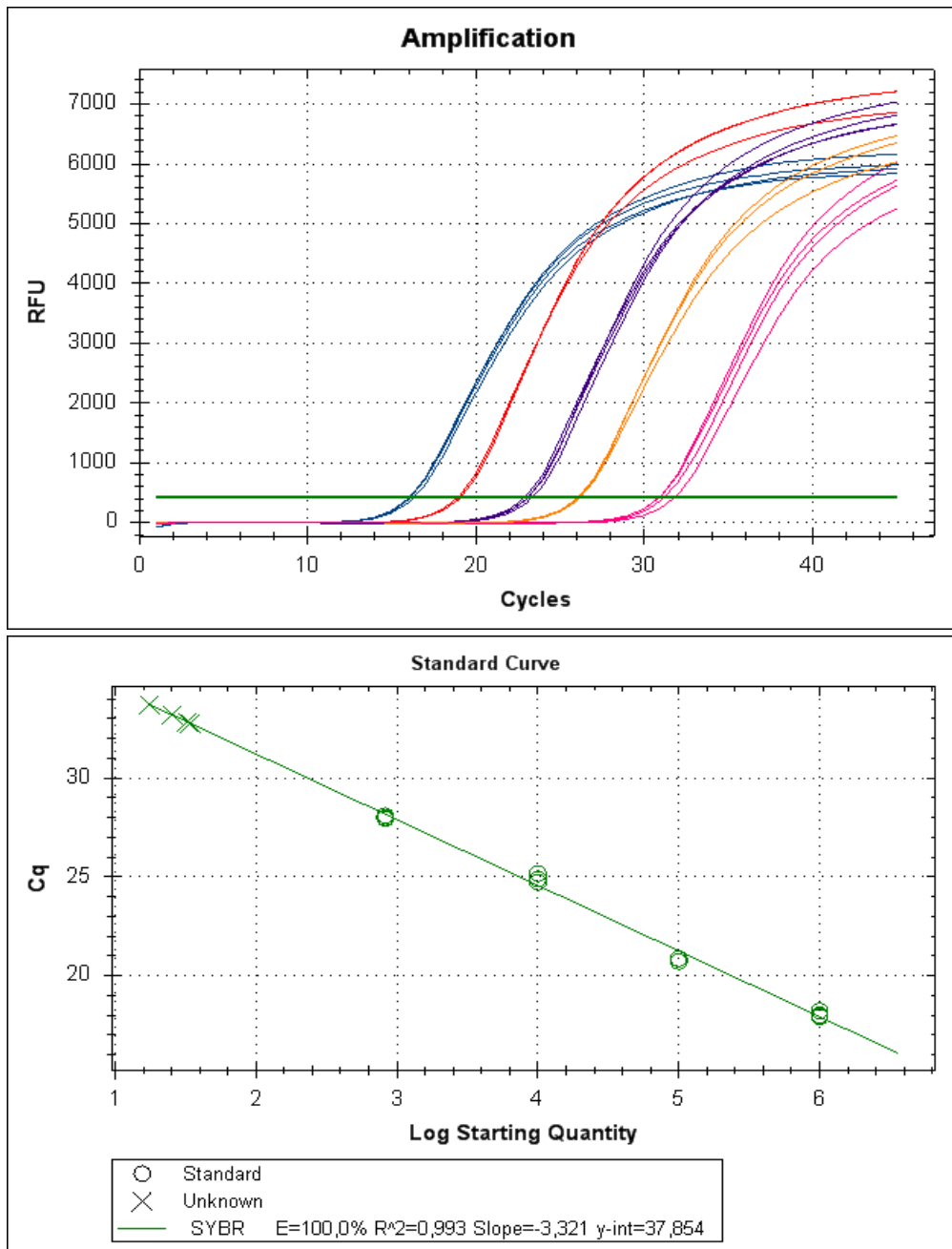
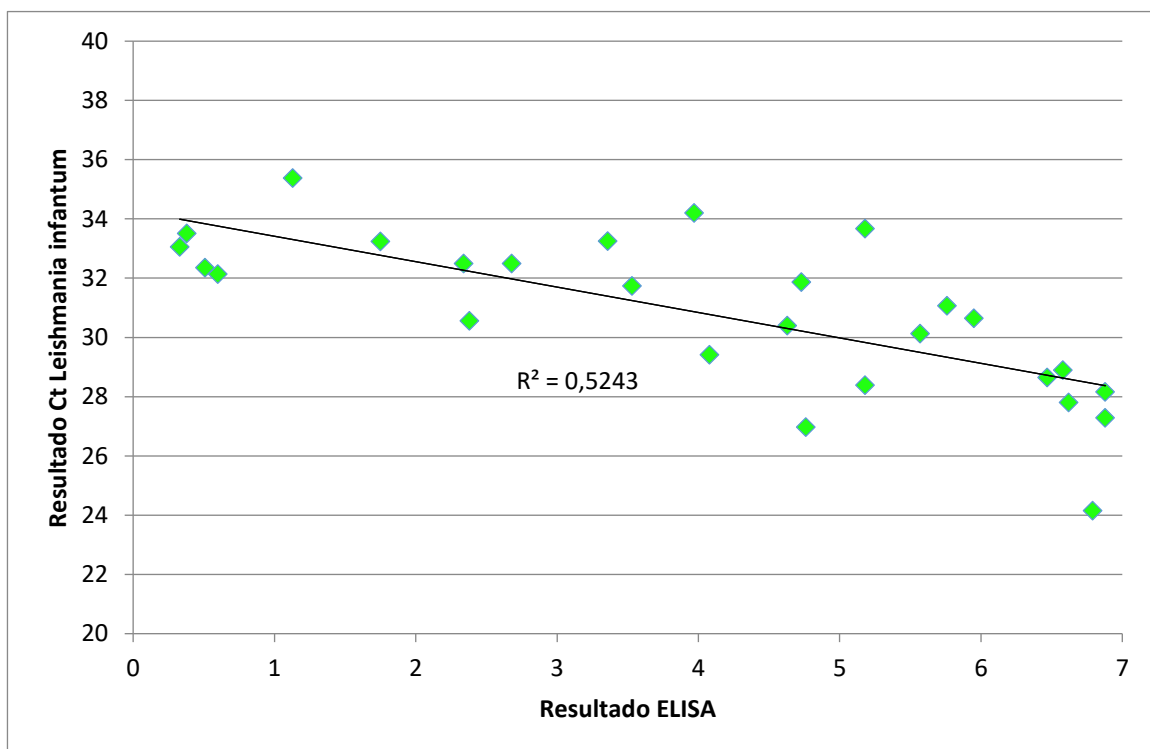


Figura 6 a,b : Curva estándar de promastigotes de cultivo puro por qPCR SYBER



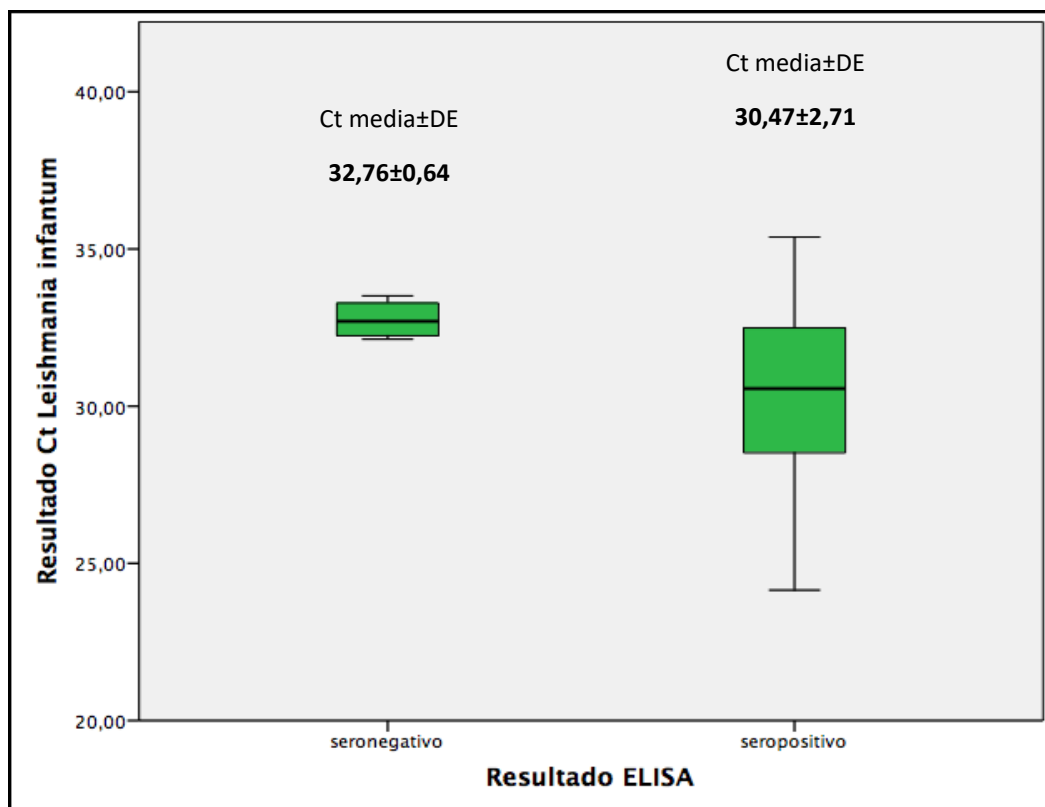
Basándonos en la hipótesis de que en presencia del parásito hay una estimulación constante de sistema inmune, se planteó un análisis de la posible relación existente entre la presencia de ADN del parásito detectada en conjuntiva ocular y la intensidad de la respuesta inmune desarrollada por el animal. Tras comprobar la normalidad de las variables cuantitativas ELISA y Ct de Leishmania, se procedió al análisis de la posible correlación existente entre los títulos de ELISA y las cargas parasitarias mediante el análisis de regresión lineal de Pearson. El resultado mostró un coeficiente de determinación significativo ( $R^2=0,524$ ,  $p<0,001$ ).

Como puede verse en la gráfica (Figura 7), los resultados indican que aproximadamente en un 50% de los casos, existe la tendencia de que los animales con mayores cargas parasitarias (menor valor de Ct) presentaron a su vez las respuestas inmunitarias más intensas.



**Figura 7.** Distribución de la intensidad de anticuerpos (DO ELISA) en función del valor de Ct resultante en la PCR cuantitativa frente a *L.infantum*.

Posteriormente, se planteó un análisis para comprobar la posible existencia de diferencias en las cargas parasitarias presentadas por los animales en función de su estado serológico. En la Tabla 3 puede observarse que los resultados de Ct media presentaron diferencias significativas entre animales seronegativos y seropositivos. Aquellos animales que presentaron anticuerpos frente a *L. infantum* detectables mediante ELISA presentaron de media una Ct menor, y por tanto una mayor carga parasitaria, que aquellos que no desarrollaron anticuerpos (Figura 8).



**Figura 8.** Valor de Ct medio y desviación estándar resultante en la PCR de *L. infantum* en función del estado serológico de los animales.

## 5. DISCUSIÓN

Los métodos serológicos como IFI, DAT y ELISA se encuentran entre las técnicas diagnósticas más empleadas en estudios clínicos y de investigación de la infección por *L.infantum* canina.

Algunos autores como (Gradoni *et al.*, 2008; Gramiccia *et al.*, 2010) consideran la IFI como la técnica de referencia para el diagnóstico serológico de la infección por Leishmania debido a la buena sensibilidad y especificidad que presenta. Sin embargo, según los resultados del presente estudio, fue ELISA la que mostró mayor número de animales positivos con respecto a IFI y DAT, además de ser la única que no arrojó ningún resultado dudoso, lo que generalmente conlleva a repetir la prueba. Por tanto, se consideró esta técnica la más indicada para la detección de anticuerpos frente a *L. infantum*. No obstante, cabe destacar, que tanto IFI como ELISA guardan un grado de concordancia adecuado, a diferencia de lo observado en DAT.

En un estudio realizado por Solano-Gallego *et al.* (2014), en el que se compararon varias pruebas serológicas entre sí (tres técnicas de ELISA comerciales, un test rápido y un IFI “in house”) en perros infectados de forma natural también encontraron que la técnica más sensible fue el mismo ELISA comercial que el empleado en este estudio. Esto parece apoyar la recomendación del uso de la técnica ELISA hecha en el presente trabajo como prueba de elección para el diagnóstico serológico de la leishmaniosis canina. Además, dicha técnica presenta la ventaja de ser poco laboriosa y permite procesar mayor número de muestras en menor tiempo, características ideales para una técnica de cribado.

Por otro lado, varios autores están de acuerdo con respecto al diagnóstico molecular que la PCR en tiempo real se ha convertido en una técnica útil en zonas endémicas de leishmaniosis canina, en especial cuando los perros muestran signos clínicos compatibles pero los resultados serológicos son dudosos. (Solano-Gallego *et al.*, 2007, 2009).

La muestra elegida para la realización de la PCR cuantitativa fue el hisopo de conjuntiva. Dicha elección se hizo ya que se trata de una prueba no invasiva y de fácil obtención. En este sentido, existen varios estudios donde también refleja que este tipo de muestras pueden ser útiles para el diagnóstico de leishmaniosis por su alta sensibilidad. Autores como Gramiccia M, *et al.* 2010. evaluaron la sensibilidad de dicha muestra en comparación con la punción de nódulo linfático y biopsia de piel, resultando el hisopo de conjuntiva de las muestras más sensibles. Además, estos mismos autores consideran que la PCR en muestras de hisopo de conjuntiva puede dar una idea de la evolución de la infección o

enfermedad en el transcurso del tiempo, ventaja que descartan para el caso de la PCR en sangre periférica.

En el trabajo realizado por Di Muccio *et al.*, 2012, donde se estudió el valor diagnóstico de las muestras de hisopo de conjuntiva en perros naturalmente expuesto a *Leishmania* mediante PCR anidada, se vio que la tasa de positividad se ajustó a la perfección con la tasa encontrada en la misma población mediante la prueba serológica de IFI. En nuestro estudio, dado que la población estaba compuesta por perros infectados experimentalmente por *L.infantum*, no es sorprendente encontrar una sensibilidad del 100% en PCR a tiempo real, sin embargo, la serología no llegó a mostrar seropositividad en la totalidad de las muestras. Esto hace pensar que los animales que resultaron seronegativos podrían tratarse de individuos infectados, pero con cierta resistencia natural al desarrollo de la enfermedad.

Por otra parte, en el presente estudio también se observó que un 50% de los animales presentaron una correlación positiva entre la carga parasitaria detectada por PCR y la cantidad de anticuerpos detectados por ELISA. Estos hallazgos moleculares parecen confirmar la hipótesis planteada por otros autores como Courtenay O, *et al.*, 2014 de que existe una estimulación continua del sistema inmunitario en presencia de *L. infantum*. No obstante, en el estudio también se han podido observar animales que presentaron ADN del parásito en las muestras de hisopo que no desarrollaron anticuerpos frente a la infección detectables mediante ELISA, lo que parece indicar que esta relación encontrada entre las cargas parasitarias y los niveles de anticuerpos es proporcional si bien no siempre se cumple.

Según nuestros resultados parece que el valor de Ct 30,5 actúa como punto de corte por debajo del cual la respuesta de anticuerpos comienza a ser detectable por ELISA. Por encima de este valor, hubo animales que no presentaron anticuerpos, pero sí ADN del parásito. Esto parece indicar que la PCR cuantitativa, además de ser útil para confirmar la presencia del parásito en animales con sospecha clínica de leishmaniosis, permite el diagnóstico de la LVC en las fases iniciales de la infección.

## 6. CONCLUSIONES

1. De las técnicas serológicas realizadas para la detección de anticuerpos frente a la infección por *L. infantum*, la prueba de ELISA es la que mostró mayor sensibilidad con respecto a DAT e IFI, además de ser la única de no presentar ningún resultado dudoso.
2. Los resultados de la prueba DAT mostraron una concordancia débil en comparación con los obtenidos con IFI y ELISA. En cambio, las técnicas de IFI y ELISA fueron las que mayor grado de concordancia manifestaron entre sí.
3. La PCR cuantitativa desarrollada en muestras de hisopo de conjuntiva fue capaz de evidenciar ADN del parásito en todos los animales incluidos en el estudio.
4. En este trabajo se ha podido observar que, en más de la mitad de los individuos las mayores cargas parasitarias se correspondieron con las respuestas inmunitarias más intensas, significa que cuanto más antígeno presenta en conjuntiva, mayor respuesta de anticuerpos de leishmania están presentes en sangre.
5. Por último, la PCR cuantitativa parece ser capaz de detectar ADN del parásito en muestras de conjuntiva antes de que los animales desarrollen una respuesta de anticuerpos detectables por serología.

## CONCLUSIONS

1. The commercial ELISA test gave the highest sensitivity compared to DAT and IFI tests, with moderate and weak agreements with IFI and DAT results, respectively. Furthermore, ELISA did not show any doubtful result
2. The results of the test DAT showed a concordance weak in comparison with those obtained with IFI and ELISA. In contrast, the techniques of IFI and ELISA were the greatest degree of concordance expressed among themselves.
3. The quantitative PCR developed in samples of conjunctiva swab was able to show DNA of the parasite in all animals included in the study.
4. The Optical Density values from the ELISA test and the CT value from real time PCR results, showed that in more than half of the animals, a higher OD values from ELISA test corresponded with Lower CT value in qPCR, meaning that the more antigen present in the conjunctiva, a higher antibody response to leishmania are present in blood.
5. Finally, quantitative PCR seems capable of detecting parasite DNA from conjunctiva swab samples before the animal even had developed a detectable antibody response by serology.

## **7. VALORACIÓN PERSONAL Y AGRADECIMIENTOS**

### **VALORACIÓN PERSONAL**

Esta última asignatura del grado en forma de trabajo ha supuesto una fuente de aprendizaje y evolución como estudiante y como futura profesional de la veterinaria. En primer lugar, la propuesta de este trabajo del director experto en la parasitología me ha brindado la oportunidad de profundizar en el conocimiento de una de las enfermedades más importantes que aparece a nivel mundial como es la leishmaniosis.

En cuanto a este nivel de conocimiento de la misma, cabe destacar la mejoría en mis habilidades para la gestión de la información tras este trabajo. También he conocido nuevas fuentes de búsqueda para trabajos científicos y de investigación, pudiendo ser de utilidad en futuros trabajos.

Al mismo tiempo, una experiencia muy enriquecedora para mi persona ha sido el compartir el trabajo diario en el laboratorio de forma continua, y esporádicamente con el diferente personal del departamento de Parasitología de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Zaragoza.

Por otro lado, he mejorado la lectura y comprensión de artículos científicos en inglés, así como la expresión escrita en el mismo idioma.

### **AGRADECIMIENTOS**

A mis directores Juan Antonio y Alberto Cortés, muchas gracias por vuestra confianza y darme la oportunidad de trabajar con vosotros.

A Paz y Adriana, muchísimas gracias por haberme acogido durante todo este año y hacerme sentir una más del equipo enseñándome día a día, además de prestarme vuestra ayuda en todo momento

A Héctor y Nabil por vuestra amabilidad y dedicar parte de vuestro tiempo a enseñarme.

Y, por último, gracias a amigos y familia por apoyarme durante todos estos años en mi paso por veterinaria y darme tantos ánimos para seguir adelante.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

- Acedo-Sánchez C, Morillas-Márquez F, Sanchíz-Marín MC, Martín-Sánchez J. (1998) Changes in antibody titres against *Leishmania infantum* in naturally infected dogs in southern Spain. *Vet Parasitol.* 75(1):1-8.
- Alexander B & Maroli M (2003). Control of phlebotomine sandflies. *Med Vet Entomol*, 17:1-18.
- Alvar J, Cañavate C, Molina R, Moreno J & Nieto J. (2004) Canine Leishmaniasis. *Adv Parasito*; 57:1-88.
- Baneth G & Aroch I (2008). Canine leishmaniasis: a diagnostic and clinical challenge. *Vet J*, 175(1):14-15.
- Baneth G, Koutinas AF, Solano-Gállego L, Bourdeau P & Ferrer L. (2008) Canine leishmaniosis - new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. *Trends Parasitol*, 24:324-330.
- Baneth G, Solano-Gallego L, (2012) Global aspects of leishmaniosis: canine leishmaniosis. In: Greene C.E (Ed.) *Infectious diseases of the dog and cat*. 4 th edn. Saunders Elsevier, St. Louis.pp. 735-746
- Barbieri CL. (2006) Immunology of canine leishmaniasis. *Parasite Immunol*, 28:329337.
- Benavides I, Morrillas F, González Castro J, Reyes A & A Valero. (1985) Aislamiento de *Leishmania* spp. en *Rattus* en la provincia de Granada. En: IV. Congreso Nacional de Parasitología., Tenerife. p:224.
- Borst P, Hoeijmakers JHJ. (1979) Kinetoplast ADN. *Plasmid*; 2: 20-40
- Bravo L, Frank LA & KA Brenneman. (1993) Canine Leishmaniasis in the United States. *The Compendium*, 15 (5): 699-708.
- Cabral M, O'Grady JE, Gomes S, Sousa JC, Thompson H & Alexander J. (1998) The immunology of canine leishmaniosis: strong evidence for a developing disease spectrum from asymptomatic dogs. *Vet Parasitol*; 76(3):173-180.
- Campino L, Santos-Gomes G, Riça Capela J. M. Cortes S. & P. Abraches. (2002) Infectivity of amastigotes of *Leishmania infantum* in a canine model for Leishmaniosis. *Vet. Parasitol*; 92: 269.275
- Carrillo E., Moreno J, (2009) Cytokine profiles in canine visceral leishmaniasis. *Vet.Immunol. Immunopathol.*128, 67-70
- Chappuis F, Sundar S, Hailu A, Ghalib H, Rijal S, Peeling RW, Alvar J y Boelaert M (2007). Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control. *Nat Rev Microbiol*, 5:873-882.
- Courtenay O, Carson C, Calvo-Bado L, Garcez LM, Quinnell RJ (2014) Heterogeneities in *Leishmania infantum* Infection: Using Skin Parasite Burdens to Identify Highly Infectious Dogs. *PLoS Negl Trop Dis* 8(1): e2583.
- Denerolle P & Bourdoiseau G (1999). Combination allopurinol and antimony treatment versus antimony alone and allopurinol alone in the treatment of canine leishmaniasis (96 cases). *J Vet Intern Med*, 13(5):413-415.

- Di Muccio T, Veronesi F, Antognoni MT, Onofri A, Piergili Fioretti D, Gramiccia M. (2012) Diagnostic value of conjunctival swab sampling associated with nested PCR for different categories of dogs naturally exposed to *Leishmania infantum* infection. J Clin Microbiol. 50:2651–9. doi: 10.1128/JCM.00558-12.
- Evans D. (1989). En: Handbook on Isolation Characterization and Cryopreservation of Leishmania. En: UNDP/World Bank/WHO Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases (TDR), Geneva. pp.1-45.
- Fernández-García A, Álvarez-García G, Risco-Castillo V, Aguado-Martínez A, Marugán Hernández V. & Ortega-Mora LM, (2009): Pattern of recognition of *Besnoitia besnoiti* tachyzoite and bradyzoite antigens by naturally infected cattle. Veterinary Parasitology. 164, 104- 110.
- Ferreira JHL, Silva LD, Longo-Maugeri I M, Katz S & Barbieri C.L. (2014). Use of a recombinant cysteine proteinase from *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* for the immunotherapy of canine visceral Leishmaniasis. PLoS Neglected Tropical Diseases 8, e2729.
- Ferrer LM (1999) Clinical aspects of canine leishmaniasis. En: Canine Leishmaniasis an update. Proceeding of International Canine Leishmaniasis Forum. Barcelona, Spain.pp.6-10.
- Francino O, Altet L, Sánchez-Robert E, Rodríguez A, Solano-Gallego L, Alberola J, Ferrer L, Sánchez A y Roura X (2006). Advantages of real-time PCR assay for diagnosis and monitoring of canine leishmaniosis. Vet Parasitol, 137(3-4):214-221.
- Gómez-Ochoa P, Castillo JA, Gascón M, Zarate JJ, Alvarez F, Couto C.G (2009). Use of domperidone in the treatment of canine visceral leishmaniasis: a clinical trial. Vet. J. 179, 259-263.
- Gradoni L, Gramiccia M. (2008.) Leishmaniosis. In OIE Manual of Diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals (mammals, birds and bees), 6th ed. Office International des Epizooties, Paris, France. p 240 – 250.
- Gramiccia M, (2010). Longitudinal study on the detection of canine *Leishmania* infections by conjunctival swab analysis and correlation with entomological parameters. Vet. Parasitol. 171:223–228
- Halbig P, Hodjati MH, Mazloumi-Gavani AS, Mohite H y Davies CR (2000). Further evidence that deltamethrin-impregnated collars protect domestic dogs from sandfly bites. Med Vet Entomol, 14(2):223-226
- Harith A, Slappendel RJ, Reiter I, van Knapen F, de Korte P, Huigen E, Kolk AHJ. (1989) Application of a direct agglutination test for detection of specific anti-*Leishmania* antibodies in the canine reservoir. J Clin Microbiol. 27(10):2252-2257.
- Harith AE, Kolk AHJ, Kager PA, (1986) Evaluation of newly developed direct agglutination test (DAT) for serodiagnosis and seroepidemiological studies of visceral leishmaniasis: comparison with IFAT and ELISA. Trans R Soc Trop Med Hyg :81, 603-6.



- Khademvatan S, Neisi N, Maraghi S, Saki J. (2011) Diagnosis and identification of *Leishmania* spp. from Giemsa-stained slides, by real-time PCR and melting curve analysis in south-west of Iran. *Ann Trop Med Parasitol*; 105:559–565.
- Killick-Kendrick R, Killick-Kendrick M, Focheux C, Dereure J, Puech MP y Cadiergues MC (1997). Protection of dogs from bites of phlebotomine sandflies by deltamethrin collars for control of canine leishmaniasis. *Med Vet Entomol*, 11:105-111.
- Koutinas AF, Polizopoulou ZS, Saridomichelakis MN,(1999)Clinical consideration on canine leishmaniasis in Greece: a retrospective study of 158 cases (1989-1996). *JAAHA*; 35:376-383,
- Livak KJ, Schmittgen TD. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method. *Gene Expr*. 2001; 408:402–8.
- Maia C & Campino L (2008). Methods for diagnosis of canine leishmaniasis and immune response to infection. *Vet Parasitol*, 158:274-287
- Maia C, Cristóvão J, Campino L. (2007). Diagnosis of canine leishmaniasis: conventional and molecular techniques using different tissues. *Vet J*.
- Manna L, Reale S, Vitale F, Picillo E, Pavone LM y Gravino AE (2008). Real-time PCR assay in *Leishmania*-infected dogs treated with meglumine antimoniate and allopurinol. *Vet J*, 177(2):279-282
- Millán J, Travaini A, Zanet S, López-Bao JV Trisciuglio A, Ferroglio E & Rodríguez A. (2016). “Detection of *Leishmania* ADN in Wild Foxes and Associated Ticks in Patagonia, Argentina, 2000 Km South of Its Known Distribution Area.” *Parasites & vectors* 9(1): 241.
- Miró G, Cardoso L, Pennisi MG, Oliva G y Baneth G (2008). Canine leishmaniosis new concepts and insights on an expanding zoonosis: part two. *Trends Parasitol*, 24:371-377.
- Molina R, Jiménez MI, Cruz I, Iriso A, Martín-Martín I, (2012) The hare (*Lepus granatensis*) as potential sylvatic reservoir of *Leishmania infantum* in Spain. *Vet. Parasitol*. 190,268-271.
- Moody SF. (1993) Molecular variation in *Leishmania*. *Acta Trop*; 53: 185-204
- Moreira M, Luvizotto M, Garcia J, Corbett C, Laurenti M. (2007). Comparasion of parasitological, immunological and molecular methods for the diagnosis of leishmaniasis in dogs with different clinical signs. *Vet Parasitol*.145: 245-252
- Moreno MA, Abramov A, Abendroth J, Alonso, Zhang S, Alcolea PJ, Edwards T, Lorimer D, Myler PJ, Larraga V (2014) Structure of tyrosine aminotransferase from *Leishmania infantum*. *Acta Crystallogr. F Struct. Biol. Commun*. 70:583–587.
- Noli C & Auxilia ST (2005). Treatment of canine Old World visceral leishmaniasis: a systematic review. *Vet Dermatol*, 16:213-232.

- Palacio J, Liste F & Gascón M (1995) Urinary protein creatinin ratios in the evaluation of renal failure in canine leishmaniasis. *Vet Rec*;137: 567-568.
- Palatnik-de-Sousa CB (2008). Vaccines for leishmaniasis in the fore coming 25 years. Review. *Vaccine*, 26:1709-1724.
- Peña MT, Naranjo C, Klauss G, Fondevila D, Leiva M, Roura X, Davidson MG, Dubielzig RR(2008) Histopathological features of ocular leishmaniosis in the dog. *J Comp Pathol*. 138(1): 32-39.
- Reis AB, Giunchetti RC, Carrillo E, Martins-Filho OA, Moreno J. (2010) Immunity to *Leishmania* and the rational search for vaccines against canine leishmaniasis. *Trends Parasitol*. ;26, 341-349
- Reis AB, Teixeira-Carvalho A, Giunchetti RC, Guerra LL, Carvalho MG, Mayrink W, Genaro O, Corrêa-Oliveira R Y Martins-Filho OA. (2006) Phenotypic features of circulating leucocytes as immunological markers for clinical status and bone marrow parasite density in dogs naturally infected by *Leishmania chagasi*. *Clin Exp Immunol*;146:303-311
- Ribeiro RR, Moura EP, Pimentel VM, Sampaio WM, Silva SM, Schettini DA, Alves CF, Melo FA, Tafuri WL, Demicheli C, Melo MN, Frézard F y Michalick MS (2008). Reduced tissue parasitic load and infectivity to sand flies in dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi* following treatment with a liposome formulation of meglumine antimoniate. *Antimicrob Agents Chemother*, 52:2564-2572.
- Ridley DS, Ridley MJ. (1983) The evolution of the lesion in cutaneous leishmaniasis. *J Pathol*. 141 (1): 83-96
- Rodriguez-Cortés A, Ojeda A, López-Fuertes L, Timón M, Altet L, Solano-Gallego L, Sánchez-Robert E, Francino O, Alberola J. (2007) A long term experimental study of canine visceral leishmaniasis. *Int J Parasitol*;37: 683-693
- Santiago MEB, Neto LS, Alexandre EC, Munari DP, Andrade MMC, Somenzari MA, Ciarlini PC & de Lima VMF (2013). Improvement in clinical signs and cellular immunity of dogs with visceral leishmaniasis using the immunomodulator P-MAPA. *Acta Tropica* 127, 174–180.
- Schallig HD, Canto-Cavalheiro M y da Silva ES (2002). Evaluation of the direct agglutination test and the rK39 dipstick test for the sero-diagnosis of visceral leishmaniasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 97(7):1015-1018.
- Simpson L. (1972) The kinetoplast ADN of hemoflagellates. *Int Rev Cytol*; 32: 139-207
- Slappendel RJ & CE Green. (1990) *Infectious Diseases of the Dog and Cat*. En: Ed. C.E. Green. Philadelphia, W.B. Saunders Company, Philadelphia, PA 19106. pp.769-777.
- Solano-Gallego L, Koutinas A, Miró G, Cardoso L, Pennisi MG, 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.

- Solano-Gallego L, Rodríguez-Cortés A, Trotta M, Zampieron C, Razia L, Furlanello T, Caldin M, Roura X, Alberola J. (2007) Detection of *Leishmania infantum* ADN by fret-based real-time PCR in urine from dogs with natural clinical leishmaniosis. *Vet Parasitol.* 147(3-4):315-319.
- Solano-Gallego L., Baneth G., (2008). Canine leishmaniosis – a challenging zoonosis. *Eur. J. Companion Anim. Pract.* 18, 232-241
- Solano-Gallego L., Miró G, Koutinas A, Cardoso L, Pennisi M.G. (2011) LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniosis. *Parasit. Vectors.*4,86.
- Solano-Gallego, Villanueva-Saz S, Carbonell M, Trotta M, Furlanello T, *et al.* (2014) Serological diagnosis of canine leishmaniosis: comparison of three commercial ELISA tests (Leiscan, ID Screen and Leishmania 96), a rapid test (Speed Leish K) and an in-house IFAT. *Parasit Vectors.* 7:111. doi: 10.1186/1756-3305-7-111.
- Strauss\_Ayali D, Jaffe CI, Burshtain O, Gonen L, Baneth G. (2004) Polymerase chain reaction using noninvasively obtained samples, for the detection of *Leishmania infantum* ADN in dogs. *J Infect Dis.* 189(9): 1729-1733
- Tafuri W, Santos R, Arantes R, Gonçalves R, Melo M, Michalick M, Tafuri W. (2004) An alternative immunohistochemical method for detecting *Leishmania* amastigotes in paraffin-embedded canine tissues. *J Immunol Methods*,292 (1-2): 17-23
- Valladares JE, Ruiz de Copegui R, Riera C, Alberola J, Gallego M, Espada & Portús M, Arboix M.(1998) Study of haemostatic disorders in experimentally induced leishmaniasis in Beagle dogs. *Res Vet Sc*; 64: 195-198.
- Xavier S, Anrdrade H, Haddad S, Chiarelli I, Lima W, Michalick M, Tafuri W. (2006) Comparison of paraffin-embedded skin biopsies from different anatomical regions as sampling methods for detecting *Leishmania* infection in dogs using histological, immunohistochemical and PCR methods. *BMC Vet Res.* 2 (1): 17
- Zárate JJ, Castillo JA, Blasco JC, Cortés Y, Sáenz de Buruaga M, Gortázar C, Fernández de Luco D & Lucientes J. (2000) Serological study of Leishmaniosis (*Leishmania* spp.) in Iberian wolves (*Canis lupus signatus*). En: 4th Meeting of European Wildlife Disease Association. (Abstr). p:66