



VALIDACIÓN DE TÉCNICAS PARA EL DESARROLLO DE UN SISTEMA
MULTIDIAGNÓSTICO DE LA LEISHMANIOSIS VISCERAL POR *L. infantum*

ADELA GÓMEZ LUQUE

2021



TESIS DOCTORAL

VALIDACIÓN DE TÉCNICAS PARA EL DESARROLLO DE UN SISTEMA
MULTIDIAGNÓSTICO DE LA LEISHMANIOSIS VISCERAL POR *L. infantum*

ADELA GÓMEZ LUQUE

PROGRAMA DE DOCTORADO EN SALUD PÚBLICA Y ANIMAL

2021



TESIS DOCTORAL

**VALIDACIÓN DE TÉCNICAS PARA EL DESARROLLO DE UN SISTEMA
MULTIDIAGNÓSTICO DE LA LEISHMANIOSIS VISCERAL POR *L. infantum***

ADELA GÓMEZ LUQUE

PROGRAMA DE DOCTORADO EN SALUD PÚBLICA Y ANIMAL

Conformidad de

El Director:

Dr. Juan Carlos Parejo Rosas

Los Codirectores:

Dr. Luis Carlos Gómez Nieto

Dra. Virginia Iniesta Orozco

2021

JUAN CARLOS PAREJO ROSAS, Profesor Contratado Doctor en la unidad de Genética, del Departamento de Producción Animal y Ciencia de los Alimentos, de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Extremadura,

INFORMA:

Que la Graduada en Enfermería por la Universidad de Extremadura Dña. Adela Gómez Luque ha realizado en la unidad de Genética de la Facultad de Veterinaria, bajo mi dirección y los codirectores Doctores D. Luis Carlos Gómez Nieto y Dña. Virginia Iniesta Orozco, el presente trabajo de investigación titulado “VALIDACIÓN DE TÉCNICAS PARA EL DESARROLLO DE UN SISTEMA MULTIDIAGNÓSTICO DE LA LEISHMANIOSIS VISCERAL POR *L. infantum*”, con el que opta al título de Doctora en Salud Pública y Animal.

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

Por lo cual, y para que conste en su memoria de Doctorando, firmo junto con los codirectores del presente informe en Cáceres, a 20 de julio de 2021.

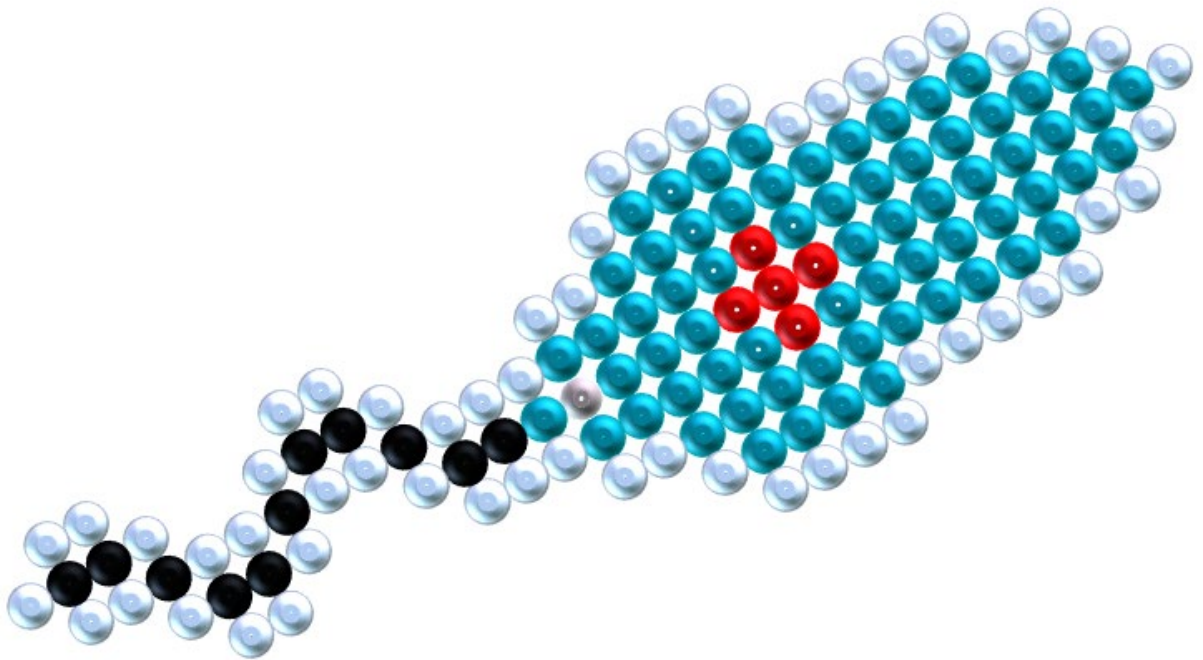
El Director:

Dr. Juan Carlos Parejo Rosas

Los Codirectores:

Dr. Luis Carlos Gómez Nieto

Dra. Virginia Iniesta Orozco



**Validación de técnicas para el
desarrollo de un sistema
multidiagnóstico de la
leishmaniosis visceral por
*L. infantum***

AGRADECIMIENTOS

La redacción de esta tesis doctoral ha tenido su fin en medio de una crisis sanitaria a nivel mundial, la pandemia por COVID-19. Soy enfermera, promotora de Salud Pública y de la ideología One Health. Es un momento muy duro para mis compañeros sanitarios y por eso quiero empezar agradeciendo su valentía, coraje, humanidad y solidaridad y reconocer el respeto y el orgullo que representan para la profesión de Enfermería.

En momentos de confinamiento he tenido tiempo para hacer balanza de todos estos años invertidos en la realización de este trabajo. Durante todos ellos, mi apoyo principal ha sido mi codirector de tesis doctoral el Dr. Luis Carlos Gómez Nieto. Gracias al entusiasmo y dedicación que ha brindado a este trabajo, al respeto a mis sugerencias e ideas y a sus palabras de apoyo y ánimo que me han guiado a tomar las mejores decisiones en cada momento. Gracias por la confianza que han depositado en mí y en mi trabajo todos y cada uno de mis compañeros del Departamento de Salud Pública y Animal.

Mención especial quiero hacer a mis compañeros del Grupo LeishmanCeres con los que he compartido proyectos e ilusiones durante estos años, Victoria Baz Agudo, Isabel Monroy Pérez, Silvia Belinchón Lorenzo, Javier Fernández Cotrina, José Luis Barneto Lozano, Virginia Iniesta Orozco, Rubén Muñoz Madrid y a Jaime por su apoyo personal, humano y profesional. Un trabajo de investigación es siempre fruto de ideas, proyectos y esfuerzos previos que corresponden a otras personas. En este caso mi más sincero agradecimiento a todos y cada uno de los miembros del grupo LeishmanCeres, con cuyo trabajo estaré siempre en deuda. Gracias por su amabilidad para facilitarme sus tesis, su tiempo y sus ideas. Por su orientación y atención a mis consultas sobre metodología, mi agradecimiento a la Dra. Silvia Belinchón Lorenzo, por el material facilitado y las sugerencias y ayudas recibidas.

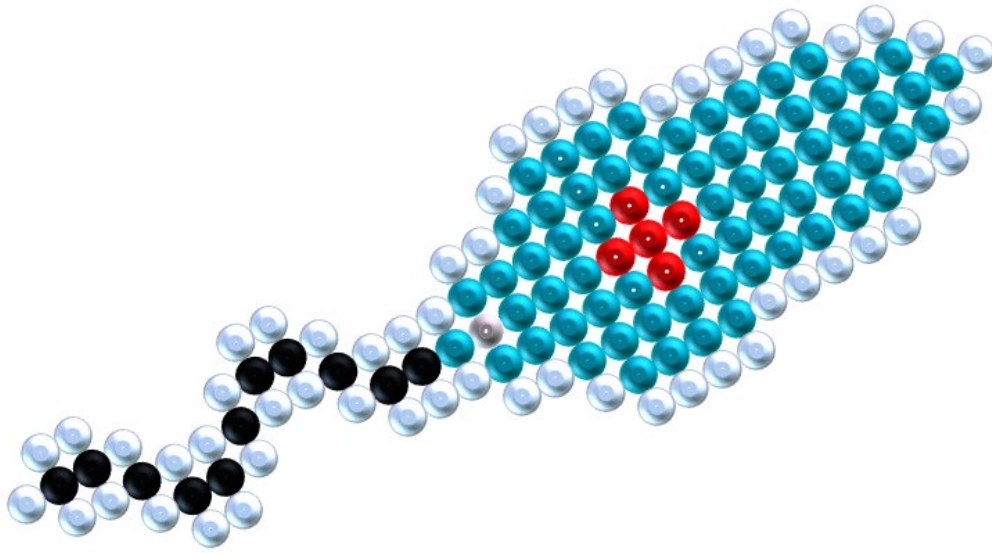
Finalmente, quiero agradecer de forma especial al director de la presente tesis doctoral, Dr. Juan Carlos Parejo Rosas, por la dirección y revisión cuidadosa que ha realizado de

AGRADECIMIENTOS

este texto y sus valiosas enseñanzas sin las cuales no hubiera sido posible alcanzar los objetivos marcados que han sido el desarrollo de técnicas de diagnóstico fiables para la Leishmaniosis canina.

Un trabajo de investigación es también fruto del reconocimiento y del apoyo que nos ofrecen las personas que nos estiman, sin el cual no tendríamos la fuerza y energía que nos anima a crecer como personas y como profesionales. Gracias a mi familia, a mis padres y a mis hermanos Carlos y Pablo.

Gracias a mis amigas, que siempre me han prestado un gran apoyo moral y humano, necesarios en los momentos difíciles de este trabajo y esta profesión.



ÍNDICES

ÍNDICE GENERAL

AGRADECIMIENTOS	1
ÍNDICE GENERAL	5
ÍNDICE DE FIGURAS	9
ÍNDICE DE TABLAS	10
ÍNDICE DE ABREVIATURAS	15
RESUMEN	19
ABSTRACT	23
1. INTRODUCCIÓN	29
1.1. Taxonomía del Género <i>Leishmania</i>	32
1.2. Morfología y ciclo biológico de <i>Leishmania</i>	35
1.3.1. Leishmaniosis humanas: incidencia en España	38
1.3.2. Leishmaniosis canina (LCan): prevalencia en España	47
1.3.3. Leishmaniosis en los reservorios animales	50
1.4. Relación Parásito-Hospedador	51
1.4.1. Establecimiento de la infección.....	52
1.4.2. Respuesta inmune en leishmaniosis	55
1.5. Diagnóstico de la leishmaniosis por <i>L. infantum</i>	60
1.5.1. Sospecha clínica	62
1.5.2. Diagnóstico inmunológico.....	65
1.5.3. Diagnóstico parasitológico.....	68
1.5.4. Utilidad del papel de filtro en el diagnóstico inmunológico y molecular de enfermedades	69
1.5.5. Validación de técnicas aplicadas al diagnóstico	71
2. OBJETIVOS Y JUSTIFICACIÓN	75
3. MATERIAL Y MÉTODOS	79

INDICE GENERAL

3.1. Instalaciones	79
3.1.1. Laboratorio.....	80
3.1.2. Bioterio de perros.....	80
3.2. Procedimientos y registros.....	81
3.3. Muestras empleadas.....	81
3.3.1. Obtención, procesado y almacenamiento.....	81
3.3.2. Consideraciones éticas.....	84
3.4. Métodos analíticos validados	85
3.4.1. ELISA SLA IgG2	86
3.4.2. Inmunofluorescencia indirecta (IFI).....	105
3.4.3. PCR cuantitativa a tiempo real (qPCR)	117
3.5. Desarrollo de un sistema de diagnóstico múltiple	142
4. RESULTADOS	145
4.1. Resultados validación ELISA SLA	145
4.1.1. Linealidad y rango.....	145
4.1.2. Especificidad	148
4.1.3. Sensibilidad.....	149
4.1.4. Precisión	150
4.1.5. Robustez.....	153
4.1.6. Estabilidad.....	160
4.2. Resultados validación IFI.....	165
4.2.1. Especificidad	165
4.2.2. Sensibilidad.....	166
4.2.3. Precisión	167
4.2.4. Robustez.....	169
4.3. Resultados validación qPCR	171

INDICE GENERAL

4.3.1. Linealidad y Rango	171
4.3.2. Exactitud	173
4.3.3. Especificidad	176
4.3.4. Sensibilidad.....	176
4.3.5. Precisión	177
4.3.6. Límite de detección.....	181
4.3.7. Límite de cuantificación.....	182
4.3.8. Robustez.....	185
4.3.9. Estabilidad.....	187
4.4. Resultados previos al desarrollo de un sistema de diagnóstico múltiple de la LCan.....	196
4.4.1. Application of qPCR method to hair and cerumen samples for the diagnosis of canine leishmaniosis in Araçatuba, Brazil. Vet Parasitol Reg Stud Reportes 15 (2019) 100267	196
4.5. Resultados sobre el desarrollo del sistema multidiagnóstico de la LCan (MultiLeish 5D), y su utilidad en la Clínica Veterinaria.....	202
5. DISCUSIÓN	247
5.1. Cronobiología de la leishmaniosis canina	247
5.2. Diagnóstico inmunológico de la LCan.....	251
5.3. Diagnóstico parasitológico y molecular de la LCan.....	257
5.3.1. Uso de muestras invasivas y no invasivas en LCan.....	260
5.4. Desarrollo de sistemas múltiples de diagnóstico de la LCan	265
6. CONCLUSIONES.....	275
7. BIBLIOGRAFÍA.....	279

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Clasificación de las especies de <i>Leishmania</i>	34
Figura 2: Formas promastigotes presentes en el flebotomo transmisor (A) y formas amastigotes presentes en los reservorios mamíferos (B)	36
Figura 3: Ciclo biológico de <i>Leishmania spp.</i>	37
Figura 4: Estado de la endemividad de la leishmaniosis cutánea en todo el mundo en 2018.....	42
Figura 5: Estado de la endemividad de la leishmaniosis visceral en todo el mundo en 2018.....	43
Figura 6: Moscas de arena en la Península Ibérica y las Islas Baleares mostrados en un mapa de zona bioclimática	45
Figura 7: Seroprevalencia de la infección canina por <i>L. infantum</i> en España por provincias a partir de una revisión de la literatura publicada entre 1985 y 2019.....	48
Figura 8: Seroprevalencia de la infección canina por <i>L. infantum</i> en España por provincias a partir de una revisión de la literatura publicada entre 1985 y 2019	49
Figura 10: Papel de las células dendríticas y macrófagos en la infección por <i>Leishmania spp.</i>	54
Figura 11: Interacción de las células NK en la infección por <i>Leishmania spp.</i> (113) ..	55
Figura 12: Respuestas inmunes innatas contra las infecciones por <i>Leishmania</i>	56
Figura 13: Los macrófagos como reguladores del resultado de la infección por <i>Leishmania</i>	57
Figura 14: Obtención de muestras de sangre	82
Figura 15: Obtención de muestras de médula ósea.....	83
Figura 16: Obtención de biopsia de ganglio linfático	84
Figura 17: Esquema de un portaobjetos con las 10 gotas de antígeno y las diluciones usadas	110
Figura 18: Ejemplo Recta patrón de los ensayos	122
Figura 19: Curva de calibración con suero GC(+)-SLA (rojo) en comparación con G6-2-SLA (verde) y GC(-)-SLA (azul).....	146

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Características clínicas y epidemiológicas de las principales especies de <i>Leishmania</i>	40
Tabla 2: Estadificación clínica de la LCan basada en el estado serológico, signos clínicos, hallazgos de laboratorio y tipo de terapia y pronóstico para cada etapa clínica.	63
Tabla 3: Clasificación y codificación de los animales y muestras utilizadas para la validación de la técnica ELISA SLA.....	86
Tabla 4: Equipos utilizados para la Validación de la técnica ELISA SLA IgG2.....	88
Tabla 5: Esquema de distribución de las muestras en la placa ELISA.....	90
Tabla 6: Parámetros analizados y grupos de animales utilizados para la validación del método ELISA SLA.....	94
Tabla 7: Resumen de los ensayos para valorar la Precisión Intermedia del método ELISA SLA IgG2	100
Tabla 8: <i>Resumen de los ensayos para valorar el efecto del tiempo de incubación .</i>	101
Tabla 9: Resumen de los ensayos para valorar el efecto de la temperatura de incubación	102
Tabla 10: Clasificación y codificación de los animales utilizados para la validación de la técnica IFI	105
Tabla 11: Equipos utilizados para la Validación de la técnica IFI	107
Tabla 12: Parámetros analizados y grupos de animales utilizados para la validación del método IFI.....	112
Tabla 13: Resumen de los ensayos para valorar la Precisión Intermedia del método IFI	115
Tabla 14: Resumen de los ensayos para valorar el efecto del tiempo de incubación	116
Tabla 15: Clasificación y codificación de los animales y muestras utilizadas para la validación de la técnica qPCR.....	117
Tabla16: Equipos utilizados para la Validación de la técnica qPCR.....	119
Tabla 17: Obtención de los puntos de la recta patrón	122
Tabla 18: Esquema de distribución de placa utilizado en los ensayos qPCR	124

INTRODUCCIÓN

Tabla 19: Parámetros analizados y grupos de animales utilizados para la validación de PCR Cuantitativa a Tiempo Real.....	126
Tabla 20: Datos de la recta de regresión obtenidos en los ensayos qPCR.....	127
Tabla 21: Ensayos para evaluar el efecto del tiempo de incubación del método qPCR	135
Tabla 22: Ensayos para valorar el efecto de la concentración LeishTaq-ADN.....	136
Tabla 23: Resumen de los ensayos para valorar la Estabilidad del método qPCR...	139
Tabla 24: Resultados de validación del parámetro linealidad y rango para el método ELISA SLA.....	147
Tabla 25: Resultados de validación del parámetro especificidad para el método ELISA SLA.....	149
Tabla 26: Resultados de validación del parámetro sensibilidad para el método ELISA SLA.....	150
Tabla 27: Resultados de validación del parámetro precisión instrumental para el método ELISA SLA.....	151
Tabla 28: Resultados de validación del parámetro repetibilidad para el método ELISA SLA.....	152
Tabla 29: Resultados de validación del parámetro precisión intermedia para el método ELISA SLA.....	153
Tabla 30: Resultados de validación del parámetro robustez, efecto del tiempo de incubación, para el método ELISA SLA.....	155
Tabla 31: Resultados de validación del parámetro robustez, efecto de la temperatura de incubación, para el método ELISA SLA.....	157
Tabla 32: Resultados de validación del parámetro robustez, efecto del lote de antígeno, para el método ELISA SLA.....	160
Tabla 33: Resultados de la estabilidad, efecto del almacenamiento prolongado a -80°C para el método ELISA SLA.....	161
Tabla 34: Resultados de la estabilidad, efecto tres procesos de congelación-descongelación para el método ELISA SLA.....	162
Tabla 35: Resultados de la estabilidad, efecto manteniendo las muestras en refrigeración (2-8°C) para el método ELISA SLA	163

INTRODUCCIÓN

Tabla 36: Resultados de validación del parámetro especificidad para el método IFI	166
Tabla 37: Resultados de validación de la sensibilidad del método IFI.....	167
Tabla 38: Resultados de validación del parámetro repetibilidad para el método IFI .	168
Tabla 39: Resultados de validación del parámetro precisión intermedia para el método IFI.....	169
Tabla 40: Resultados de validación del parámetro robustez para el método IFI.....	170
Tabla 41: Resultados de validación del parámetro linealidad y rango para el método qPCR.....	172
Tabla 42: Resultados previos a la contaminación de las muestras	173
Tabla 43: Resultados de validación del factor de recuperación que mide la exactitud del método qPCR.....	174
Tabla 44: Resultados de validación que verifica la ausencia de contaminación durante el proceso de extracción de las muestras y que mide la exactitud del método qPCR	175
Tabla 45: Resultados de validación del parámetro especificidad para el método qPCR	176
Tabla 46: Resultados de validación del parámetro sensibilidad para el método qPCR	177
Tabla 47: Resultados de validación del parámetro precisión instrumental para el método qPCR.....	178
Tabla 48: Resultados de validación del parámetro repetibilidad para el método qPCR	179
Tabla 49: Resultados de validación del parámetro precisión intermedia para el método qPCR.....	180
Tabla 50: Resultados de validación del parámetro límite de detección del método qPCR	182
Tabla 51: Resultados de validación del parámetro límite de cuantificación del método qPCR.....	184
Tabla 52: Resultados de validación de robustez del método qPCR, realizando modificaciones en el tiempo de incubación	185
Tabla 53: Resultados de validación de robustez del método qPCR, realizando modificaciones en la concentración LeishTaq-ADN en la amplificación.....	186

INTRODUCCIÓN

Tabla 54: Resultados de estabilidad de alícuotas de la Recta Patrón conservadas a -80°C para el método qPCR	188
Tabla 55: Resultados de estabilidad de muestras de Control + y Control –conservadas a-80 °C para el método qPCR	190
Tabla 56: Resultados de estabilidad de muestras sometidas a 2 ciclos de congelación -80°C - descongelación para el método qPCR	191
Tabla 57: Resultados de estabilidad de muestras conservadas a -80°C y analizadas con el método qPCR	192
Tabla 58: Resultados de estabilidad del ADN extraído y conservado a -80°C	193
Tabla 59: Resultados de estabilidad de muestras conservadas en refrigeración a 2-8°C y analizadas con el método qPCR.....	194

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

AEMPS	Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNk	ADN del kinetoplasto
a.C.	antes de Cristo
ANOVA	Análisis de la varianza
BPL	Buenas Prácticas de Laboratorio
C+	Control positivo
C-	Control negativo
CCAA	Comunidades Autónomas
CDC	Centro para el Control y Prevención de Enfermedades
CHMP	Comité de Medicamentos de Uso Humano
Cm	Coeficiente de linealidad
CMBD	Conjunto Mínimo de Datos Básicos
Ct	Ciclo umbral
CV	Coeficiente de variación
d. C.	después de Cristo
DE	Desviación estándar
DIL	Dilución
DO	Densidad óptica
EDO	Enfermedades de Declaración Obligatoria
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
EMA	Eropean Medicines Agency
FDA	Food and Drug Administration
GL	Ganglio linfático
GP	Glicoproteína de superficie
IFN- γ	Interferón gamma

INTRODUCCIÓN

ICs	Inmunocomplejos
IFI	Inmunofluorescencia indirecta
IgGT	Inmunoglobulina G total
IgG2	Inmunoglobulina subclase G2
IL-	Interleucina
INTI	Instituto Nacional de Tecnología Industrial
ISO	Organización Internacional de Normalización
Kb	Kilobases
LC	Leishmaniosis cutánea
LCD	Leishmaniosis cutánea difusa
LCDs	Leishmaniosis cutánea diseminada
LDPKA	Leishmaniosis dérmica post Kala-azar
LMC	Leishmaniosis mucocutánea
LPG	Lipofosfoglicano
LV	Leishmaniosis visceral
<i>L. infantum</i>	<i>Leishmania infantum</i>
LCan	Leishmaniosis canina
MAC	Complejo ataque de membrana
Mb	Megabases
MO	Médula ósea
OMS	Organización Mundial de la Salud
OPD	Diclorhidrato de o-fenilendiamina
PBS	Solución salina tampón de fosfato
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PG	Prostaglandina
pp	Parásitos
PR	Proteínas recombinantes
Q	Cantidad estimada de parásitos
qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa

INTRODUCCIÓN

R ²	Coefficiente de determinación
RENAVE	Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica
RL	Recidiva de leishmaniosis
rpm	Revoluciones por minuto
SLA	Antígeno total soluble de <i>Leishmania</i>
SMF	Sistema Mononuclear Fagocítico
t=0	Tiempo cero
TFN- α	Factor de necrosis tumoral alfa
Th1	Linfocitos T colaboradores de tipo 1
Th2	Linfocitos T colaboradores de tipo 2
USP	Farmacopea de Estados Unidos
Y-intercept	Cantidad de ADN correspondiente a un parásito

RESUMEN

Las leishmaniosis son un conjunto de enfermedades zoonóticas y antroponóticas conocidas desde hace cientos de años y producidas por protozoos parásitos pertenecientes al género *Leishmania*.

Hoy en día, aunque se estima que las leishmaniosis tienen una de las mayores tasas de morbilidad entre las enfermedades infecciosas desatendidas, la Organización Mundial de la Salud publicó el primer informe técnico actualizado sobre la leishmaniosis en 2010. Con la finalidad de concienciar de la necesidad de llevar a cabo estudios epidemiológicos y actuaciones para su control con el fin de planificar, con un enfoque apropiado y basado, fundamentalmente, en una detección activa de casos, en su tratamiento precoz, así como en el desarrollo de nuevos fármacos y de vacunas seguras y eficaces.

Estas zoonosis están presentes en siete de los órdenes de mamíferos; a saber: Marsupialia, Cingulata, Pilosa, Rodentia, Primata, Carnivora y Chiroptera, responsables de mantener las especies de *Leishmania* en la naturaleza y de poder transmitir a humanos la infección a través de los vectores específicos, como son los flebotomos, presentes en los diferentes países y continentes endémicos.

Respecto a los carnívoros, el perro es uno de los reservorios principales de especies de *Leishmania* y, en concreto, es el hospedador más importante de la especie *L. infantum*, siendo España uno de los países con mayor endemismo del sur de Europa.

El diagnóstico de la infección por *Leishmania infantum* (*L. infantum*) en la especie canina es complejo por múltiples motivos. Entre otros, cabe destacar el largo periodo de incubación una vez infectados los animales, la existencia de portadores inaparentes capaces de transmitir en mayor o menor medida el parásito a los insectos vectores y finalmente, la necesidad de utilizar diferentes técnicas de diagnóstico. Actualmente, se utilizan técnicas inmunológicas y moleculares para la detección precoz de los animales

RESUMEN

infectados desde la primoinfección, e independientemente del estado de susceptibilidad o resistencia de cada individuo a esta enfermedad.

Además, una vez tratados los casos diagnosticados, tienen que ser monitorizados puede que durante muchos meses o incluso años, para comprobar la eficacia de los fármacos empleados y de la detección de las muy frecuentes recidivas, lo más temprano posible.

Por lo expuesto anteriormente, uno de los objetivos que planteamos en la presente Tesis Doctoral ha sido la validación de técnicas tanto inmunológicas (IFI y ELISA SLA IgG2) como genéticas (qPCR) que el Laboratorio de Parasitología de la Universidad de Extremadura tiene estandarizadas desde hace muchos años para el diagnóstico de la leishmaniosis canina por *L. infantum*.

En la validación de la técnica de ELISA SLA IgG2 se analizaron un total de 116 perros (suero sanguíneo), para determinar la linealidad, especificidad, sensibilidad, precisión (precisión instrumental, repetibilidad y precisión intermedia), robustez y estabilidad del método, tomando como referencia los resultados obtenidos de perros analizados por las técnicas de IFI y qPCR, esta última de médula ósea.

En la validación de la técnica de IFI se analizaron un total de 96 perros (suero sanguíneo), para determinar la especificidad, sensibilidad, precisión (repetibilidad y precisión intermedia), robustez y estabilidad del método, tomando como técnicas de referencia los resultados obtenidos de perros analizados por las técnicas de ELISA SLA IgG2 y de qPCR.

En la técnica de qPCR se analizaron un total de 44 animales (médula ósea y ganglio linfático), para determinar la linealidad, exactitud, especificidad, sensibilidad, precisión (precisión instrumental, repetibilidad y precisión intermedia), límite de detección, límite de cuantificación, robustez y estabilidad del método, tomando como referencia los resultados obtenidos de los perros analizados por las técnicas de ELISA SLA IgG2 e IFI. Los resultados obtenidos revelan que nuestros métodos inmunológicos estandarizados de diagnóstico, (ELISA SLA IgG2 e IFI) mediante muestras de suero son altamente

RESUMEN

fiables. Los atributos estudiados en técnica ELISA SLA IgG2 evidencian que es un método diagnóstico para la leishmaniosis canina (LCan) 100% específico y entre el 75-100% sensible. Además, es preciso, puesto que los resultados obtenidos tras múltiples análisis de las mismas muestras sometiendo a diferentes situaciones evidencian coeficientes de variación aceptables. Sin embargo, no es un método robusto puesto que variaciones en la temperatura, tiempo de incubación y el lote de antígeno utilizado en el tapizado de placas pueden alterar los resultados.

Por otro lado, los atributos estudiados en la técnica IFI evidencian que es un método 100% específico y sensible, preciso y robusto. Con respecto a la estabilidad, no debemos olvidar, aunque el suero no puede almacenarse 48 horas en refrigeración, si puede almacenarse durante tiempo prolongado en congelación a -80°C mostrándose inalterable.

Igualmente, el método estandarizado de detección y cuantificación del ADNk de *L. infantum*, qPCR, aplicado al diagnóstico de la LCan con muestras de médula ósea y ganglio linfático, es muy fiable puesto que los resultados obtenidos de los atributos estudiados evidencian que se ajusta la respuesta medida de la cantidad de parásitos en función del Ct obtenido, es decir, es un método lineal. Es exacto y 100% específico y sensible para ambas matrices, siendo mayor la precisión utilizando muestras de médula ósea. Además, podemos asegurar que nuestro método es capaz de detectar y cuantificar entre 1,5 y 3,848 parásitos, siempre y cuando no se produzcan modificaciones en el método como el tiempo de incubación o la concentración LeishTaq-ADN. En cuanto a la estabilidad, los resultados evidencian que las muestras de tejido son poco estables, pero que el ADN ya extraído se conserva inalterable hasta los 48 meses almacenado a -80°C.

Otro de los objetivos que planteamos en la presente tesis doctoral ha sido el desarrollo de "*Multileish 5D: un Sistema de Diagnóstico Múltiple para la detección y seguimiento de perros infectados por L. infantum*", utilizando otras muestras y soportes, que permite a los profesionales de clínicas veterinarias el diagnóstico de la leishmaniosis canina en

RESUMEN

las diferentes fases y estados de la patocronia: primoinfectados, latentes evolutivos y patentes. Los resultados indican que Multileish 5D es una importante herramienta diagnóstica aplicada al seguimiento de perros tratados, debido a que es capaz de detectar tanto la remisión de la infección y como las respuestas inmunitarias en los casos de éxito terapéutico o, por el contrario, las frecuentes recidivas, permitiendo descartar con total especificidad la presencia de este parásito, tanto en perros sanos como enfermos de otras patologías.

En este sistema de diagnóstico múltiple se utilizan muestras no invasivas de perros como son el pelo y las obtenidas mediante hisopado (cerumen, mucosas y piel), las cuales se analizan mediante la técnica qPCR para la detección y cuantificación del ADNk de *L. infantum*. Además, en este sistema de diagnóstico múltiple, se analiza a partir de sangre seca adherida a papel Whatman, la presencia de anticuerpos y magnitud de la respuesta inmune, en los casos positivos, o ausencia de anticuerpos frente a antígenos de *L. infantum*.

En la presente tesis, también se incluye la metodología y resultados obtenidos con Multileish-5D aplicado en estudios epidemiológicos y publicados en la revista *Veterinary Parasitology* en el año 2019, titulado "*Application of qPCR method to hair and cerumen samples for the diagnosis of canine leishmaniosis in Araçatuba, Brazil*".

Como parte de los resultados obtenidos tras aplicar el Multileish-5D en clínicas veterinarias de gran parte del territorio español, se presenta el artículo publicado en el año 2020 en la revista *Argos* y titulado "*Multileish-5D: un novedoso sistema multidiagnóstico fiable de la leishmaniosis canina con valor pronóstico*".

Finalmente decir que, para el desarrollo de todas las técnicas de diagnóstico presentes a la memoria de tesis, se ha utilizado la cepa de *L. infantum* aislada de un perro en Extremadura tipificada como MCAN/ES/1996/BCN150, zymodema MON-1 muy utilizada en investigación sobre leishmaniosis.

ABSTRACT

Leishmaniasis are a set of zoonotic and anthroponotic diseases known for hundreds of years and produced by parasite protozoa that belong to the group *Leishmania*.

Nowadays, although it is estimated that leishmaniasis have one of the highest rates of morbidity among the unattended, infectious diseases, World Health Organization published the first updated report about leishmaniasis in 2010 to raise awareness about the need of realizing more epidemiologic research to control them and with the sole purpose of planification; thanks to an appropriate approach, based on an active detection of the cases, early treatment, as well as the development of new drugs, and effective and safe vaccines.

These zoonosis affect specially seven mammals' orders: Marsupialia, Cingulate, Pilosa, Rodentia, Primates, Carnivora and Chiroptera. Hence, they are responsible for the survival of the different species of *Leishmania* in nature and the spreading towards humans via specific vectors, Phlebotomus, which are present in different countries and continents.

If we pay special attention to carnivores, dogs are one of the main species reservoirs for *Leishmania*, more specifically the most important host for the *Leishmania infantum* (*L. infantum*); and Spain one of the countries with the highest endemism in South Europe. *L. infantum* infection diagnosis in canines is very complex for different reasons. Namely the extensive incubation period once the animals are infected, the existence of silent carriers which can spread the parasite at different rates through vector insects, and lastly, the need to use different diagnostic techniques. Nowadays, immunologic and molecular techniques are used for the early detection of the infected animals from the primoinfection, and independently of the susceptibility or resistance of each individual to this illness.

ABSTRACT

Furthermore, once all the diagnosed cases are treated, they have to be monitored for many months and sometimes even years, to check the effectiveness of the drugs and for the detection of the very frequent residue, as soon as possible.

Taking into account the above-mentioned information, one of the objectives for this PhD report has been the validation of the standardized immunologic (IFI and SLA IgG2 ELISA) and genetic (qPCR). Techniques that the Parasitology Laboratory of the University of Extremadura has had standardized for the diagnoses of the canine leishmaniosis by *L. infantum* for many years now.

For the evaluation of technique SLA IgG2 ELISA were analysed a total of 116 dogs (blood serum), to determine linearity, specificity, sensitivity, precision (instrumental precision, repeatability and intermediate precision), robustness and methodology stability. Using the results obtained analysing blood serum by IFI and bone marrow by qPCR technique as frame of reference.

For the evaluation of technique IFI were analysed a total of 96 dogs (blood serum), to determine specificity, sensitivity, precision (repeatability and intermediate precision), robustness and methodology stability. Using the results obtained using SLA IgG2 ELISA and qPCR technique as frame of reference.

For the evaluation of technique qPCR were analysed a total of 44 dogs (bone marrow and lymph node) to determine linearity, exactitude, specificity, sensitivity, precision (instrumental precision, repeatability and intermediate precision), robustness and methodology stability. Using the results obtained analysing by SLA IgG2 ELISA and by IFI technique as frame of reference.

Results show that our standardized immunologic methods of diagnostic (SLA IgG2 ELISA and IFI, blood serum) are highly reliable. The attributes studied by SLA IgG2 ELISA evince it as a diagnosis method 100% specific for canine leishmaniosis (L.Can) and with a sensitivity between the 75-100%. Furthermore, it is precise, since the results, after several analysis of the same samples under different circumstances, show acceptable variation coefficients. However, it is not a robust method. Variations in

ABSTRACT

temperature, incubation period and the antigen batch used to coat the dish can alter the results.

On the other hand, the studied attributes to IFI show that is a method 100% specific and sensitive as well as accurate and robust. However, stability wise, we should not forget that although blood serum cannot be refrigerated for 48 hours, it can be frozen at -80°C for longer periods and remain unaltered.

Correspondingly, detection and quantification standardized method for the kDNA of the *L. infantum* (qPCR applied for the diagnostic of LCan by bone marrow and lymph node) is quite reliable since the results of the studied attributes show that it adjusts to the average amount of the number of parasites depending on the obtained Ct it is a lineal method. It is exact and 100% specific, as well as sensitive for both types of samples, although the higher precision happened when using bone marrow. Besides, we can assure that our method can detect and quantify between 1.5 and 3.848 parasites, as long as there is no modification of the method as incubation period or LeishTaq- DNA concentration. Stability wise, the results show that the tissue samples are a bit unstable but extracted DNA at -80°C can be kept unaltered up to 48 months.

Another of the objectives in this PhD report has been the development of "*Multileish 5D: A Multiple Diagnosis System for the detection and follow-ups of dogs infected by L. infantum*", using other samples and mediums. Allowing professional of veterinary clinics, the diagnosis of leishmaniosis canine in different stages and states of the pathocrony: primoinfected, latent and patent. The results show that Multileish 5D is an important diagnostic tool when applied during the follow ups of the treated dogs since it is able to detect remission of the infection, as well as immune responses in those cases of therapeutic success or, on the contrary, the frequent residives. These allows the researcher to dismiss, with complete specificity, the presence of this parasite, in both healthy dogs and those suffering any other pathology.

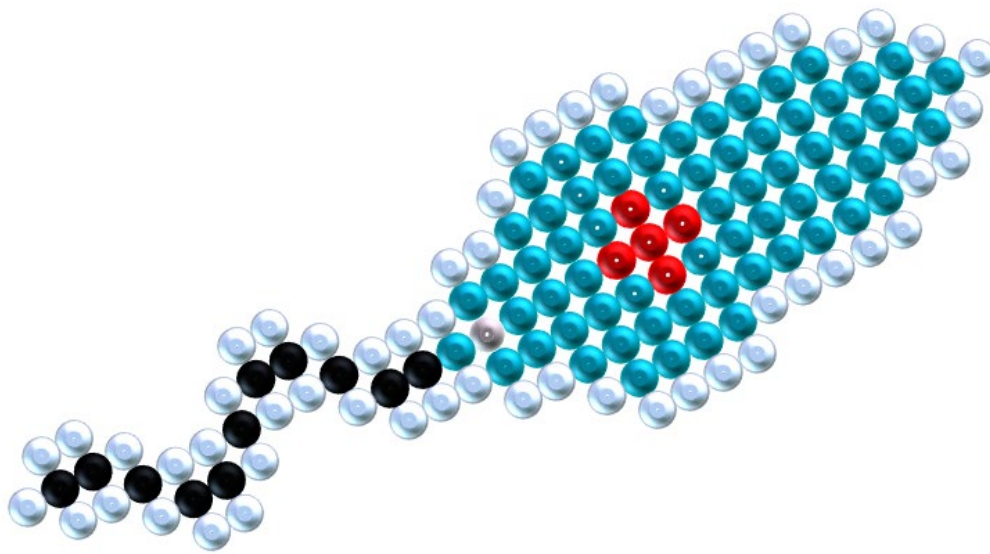
With this Multiple Diagnosis System, non-invasive samples are used, as for example, hair, or those obtained through cotton swab (cerumen, mucosa and skin), which are

ABSTRACT

analyzed by qPCR technique for the detection and quantification of the kDNA of *L. infantum*. Additionally, this Multiple Diagnosis System analyses dried blood on Whatman's paper either the presence of antibodies and the magnitude of the response with immunity (in positive cases), or the absence of antibodies for *L. infantum* antigens. As well, this PhD report includes the methodology and the results with Multileish-5D, which was applied to epidemiologic studies published in the journal *Veterinary Parasitology* in 2019, entitled: "*Application of qPDR method to hair and cerumen samples for the diagnosis of canine leishmaniosis in Araçatuba, Brazil*"

A section of the results obtained when applying Multileish-5D in veterinary clinics in most of Spain are published in the journal *Argos* in 2020 and entitle: "Multileish-5D: A new, reliable and Multiple Diagnostic System for the canine leishmaniosis with prognosis value".

To conclude, just mention that for the development of all the techniques of diagnosis present in this PhD report the isolated *L. infantum* strain of a dog from Extremadura (Spain) has been used. Said strain is classified as MCAN/ES/1996/BCN150, zymodema MON-1 and is used very often for Leishmaniosis research.



INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

Las leishmaniosis son un conjunto de enfermedades zoonóticas y antroponóticas conocidas desde hace cientos de años y producidas por protozoos parásitos pertenecientes al género *Leishmania*.

El orden de los trypanosomátidos comparte un origen evolutivo datado hace más de 500 millones de años, que les caracteriza por tener un flagelo y un kinetoplasto (1). A pesar de no existir registros fósiles de estos parásitos, se contemplan dos posibles orígenes del género *Leishmania* y en concreto de sus dos subgéneros, *Viannia* y *Leishmania*. Se propone que el subgénero *Viannia* haya podido tener su origen en el Nuevo Mundo, mientras que el subgénero *Leishmania* ha surgido en África. Posteriormente ha sido introducido de manera continuada en el continente europeo (2).

Respecto a su historia, hasta nuestros días existen documentos antiguos y datos paleoparasitológicos, como la presencia de Ácido desoxirribonucleico (ADN) mitocondrial de *Leishmania* en restos de momias egipcias, que indican que la leishmaniosis ya estaba extendida en la antigüedad (3-5). Las primeras evidencias de estos parásitos corresponden a las causantes de formas cutáneas de esta enfermedad en el Viejo Mundo, existiendo datos desde el siglo VII (a.C.), encontrados en Mesopotamia en la biblioteca del rey Ashurbanipal, incluso en textos pertenecientes al periodo comprendido entre los años 1500-2500 a.C., que hacían referencias a estas lesiones (6).

En el Nuevo Mundo existen esculturas precolombinas de cerámica encontradas en zonas donde se desarrollaron las culturas Mochica (330 a.C.-500 d.C.), que representan figuras humanas con lesiones desfigurantes faciales en los labios y la nariz que hacen referencia a las lesiones típicas de la leishmaniosis mucocutánea (LMC) y la leishmaniosis cutánea (LC). Además, existen textos que datan del siglo XV y XVI que hacen referencia a que, durante la colonización española, existía un gran riesgo para los trabajadores agrícolas de zonas de los Andes y de los valles de padecer lesiones de

INTRODUCCIÓN

la piel de tipo ulcerado, que más tarde se convertían en lesiones desfigurantes de la boca y la nariz. Estas lesiones características de la LC y LMC de países de América del Sur y Central siguen denominándose como “ulcera del chiclero” “uta”, etc. (7,8).

La identificación de los parásitos de *Leishmania* como agentes etiológicos, comenzó a finales del siglo XIX por el médico escocés David Douglas Cunningham (1885), quien en India observó unas estructuras ovaladas en muestras de piel ulceradas (9). Con posterioridad, a principios del siglo XX, William Boog Leishman (1901) durante el examen de muestras patológicas del bazo de un paciente irlandés que había muerto de fiebre Dum-Dum o kala-azar, observó unos cuerpos ovals intracelulares de 2-3 micrómetros y publicó acerca de ellos en 1903 (10). Unas semanas más tarde, el médico irlandés Charles Donovan, publicó un artículo en el que informaba que había encontrado cuerpos similares en muestras esplénicas tomadas durante la vida y en autopsia de sujetos nativos de la India (Madrás) que supuestamente habían muerto de malaria porque habían tenido fiebre y bazo agrandado (11). En 1903, Ronald Ross relaciona estos organismos con el Kala-azar y propone el nombre de *Leishmania donovani* (*L. donovani*) en honor a sus descubridores (12).

Hoy en día, aunque se estima que las leishmaniosis tienen una de las mayores tasas de morbilidad entre las enfermedades infecciosas, han sido ampliamente ignorada en las discusiones de enfermedades tropicales prioritarias (13,14).

El envío al olvido de esta enfermedad se debe a su compleja epidemiología, ecología, la falta de herramientas sencillas y de fácil aplicación para el manejo de casos, la escasez de datos de incidencia actuales y, a menudo, la falta de responsabilidad política para reconocer su importancia (15,16).

Como consecuencia de la Resolución de la Asamblea Mundial de la Salud 2007/60.13, la Organización Mundial de la Salud (OMS) convocó al Comité de Expertos en Leishmaniosis en marzo de 2010, que posteriormente publicó el primer informe técnico actualizado sobre la leishmaniosis (17,18). Desde entonces, se tomó conciencia de la necesidad de llevar a cabo estudios epidemiológicos con el fin de planificar, con un

INTRODUCCIÓN

enfoque apropiado, el control de la leishmaniosis, y a partir del año 2013 el programa mundial de leishmaniosis de la OMS ha informado por separado el número de nuevos casos autóctonos e importados, para vigilar las tendencias de su incidencia. Según esta organización, el control de esta enfermedad se basa fundamentalmente en una detección activa de casos y en su tratamiento, sin embargo, en la actualidad no existe un modelo bien definido para un control costo-efectivo (18,19).

Hasta el momento, el diagnóstico definitivo se ha basado en el hallazgo microscópico del parásito. Sin embargo, puesto que la mayor parte de los hospitales y clínicas veterinarias no tienen recursos materiales o humanos para realizar este diagnóstico definitivo, que requiere extraer aspirados de médula ósea (MO) e identificar el parásito, o incluso realizar pruebas cutáneas, es preciso disponer de técnicas rápidas y fáciles de interpretar que permitan el grado de incidencia y control de esta enfermedad (20). La magnitud del problema de salud representado por las leishmaniosis, combinada con la complejidad de su epidemiología, hace necesario aclarar todos los eslabones de la red de transmisión, incluyendo a los hospedadores mamíferos no humanos. Estos reservorios se presentan en cada uno de los siete órdenes de mamíferos -Marsupialia, Cingulata, Pilosa, Rodentia, Primata, Carnivora y Chiroptera-, responsables de mantener las especies de *Leishmania* en la naturaleza (21).

El perro es el principal reservorio de la leishmaniosis humana producida por *Leishmania infantum* (*L. infantum*) en España. Son muchos los autores que han puesto en evidencia la existencia de otros animales que actúan como reservorios domésticos o selváticos (22-27) sin embargo, su participación en el mantenimiento del ciclo de transmisión para cada ecosistema no es del todo bien conocida (18).

En España, los vectores competentes en la transmisión de *L. infantum* son *Phlebotomus perniciosus* y *Phlebotomus ariasi*. La capacidad vectorial del flebotomo es el potencial específico que posee para transmitir las formas infectivas de *Leishmania*, y depende de los siguientes parámetros: el número de flebotomos por perro o reservorio principal, la tasa de supervivencia diaria del flebotomo hembra, la duración del ciclo biológico y la

INTRODUCCIÓN

frecuencia media de picadura de este díptero sobre un hospedador vertebrado (28). Por tanto, los factores que afecten a estos parámetros van a influir en la probabilidad de la transmisión de *Leishmania* (29). Por este motivo, es fundamental tener un buen control de los principales reservorios animales como es el caso del perro y disponer de técnicas diagnósticas estandarizadas y validadas, fiables para diagnosticar la infección por especies de *Leishmania*, que faciliten y aseguren el control de esta enfermedad y así contribuir de manera positiva a la mejora de la salud pública tanto a nivel nacional e internacional, ya que en la actualidad tanto especies animales mamíferas, especialmente perros, como de insectos, circulan con gran facilidad entre países y continentes exentos de estos parásitos hasta hace poco tiempo.

1.1. Taxonomía del Género *Leishmania*

Desde que fue descrita por primera vez en 1903 por Sir Ronald Ross (30), la taxonomía del género *Leishmania* ha sufrido revisiones y cambios frecuentes con el descubrimiento de nuevas especies. Desde la década de 1970 se han utilizado criterios inmunológicos, bioquímicos y genéticos para definir las especies de *Leishmania* (31). La última clasificación del género *Leishmania* ha sido propuesta por Akhoundi en el año 2016 (32):

Reino *Protista* (Haeckel, 1866)

Phylum Euglenozoa (Cavalier-Smith, 1981)

Clase *Kinetoplastea* (Honigberg, 1963 rectifica Vickerman, 1976)

Subclase *Metakinetoplastina* (Vickerman, 2004)

Orden *Trypanosomatida* (Kent, 1880)

Familia *Trypanosomatidae* (Döflein, 1901)

Subfamilia *Leishmaniinae* (Maslov y Lukes, 2001)

Género *Leishmania* (Ross, 1903)

El género *Leishmania* se compone de dos grupos (32,33).

- El primero, ***Euleishmania***, incluye 4 subgéneros o complejos: *Leishmania*, *Viannia*, *Sauroleishmania* y el complejo *Leishmania enrietti*.

INTRODUCCIÓN

- El segundo grupo, **Paraleishmania**, comprende las especies: *Leishmania hertigi*, *Leishmania deanei*, *Leishmania colombiensis*, *Leishmania equatorensis*, *Leishmania herreri* y *Endotrypanum*.

Actualmente se diferencian dos subgéneros dentro del género *Leishmania* en función de su localización y multiplicación en el insecto vector:

- Subgénero *Leishmania* (34)
- Subgénero *Viannia* (35)

Los distintos complejos y especies según las últimas modificaciones de (32) están representadas en la Figura 1:

INTRODUCCIÓN

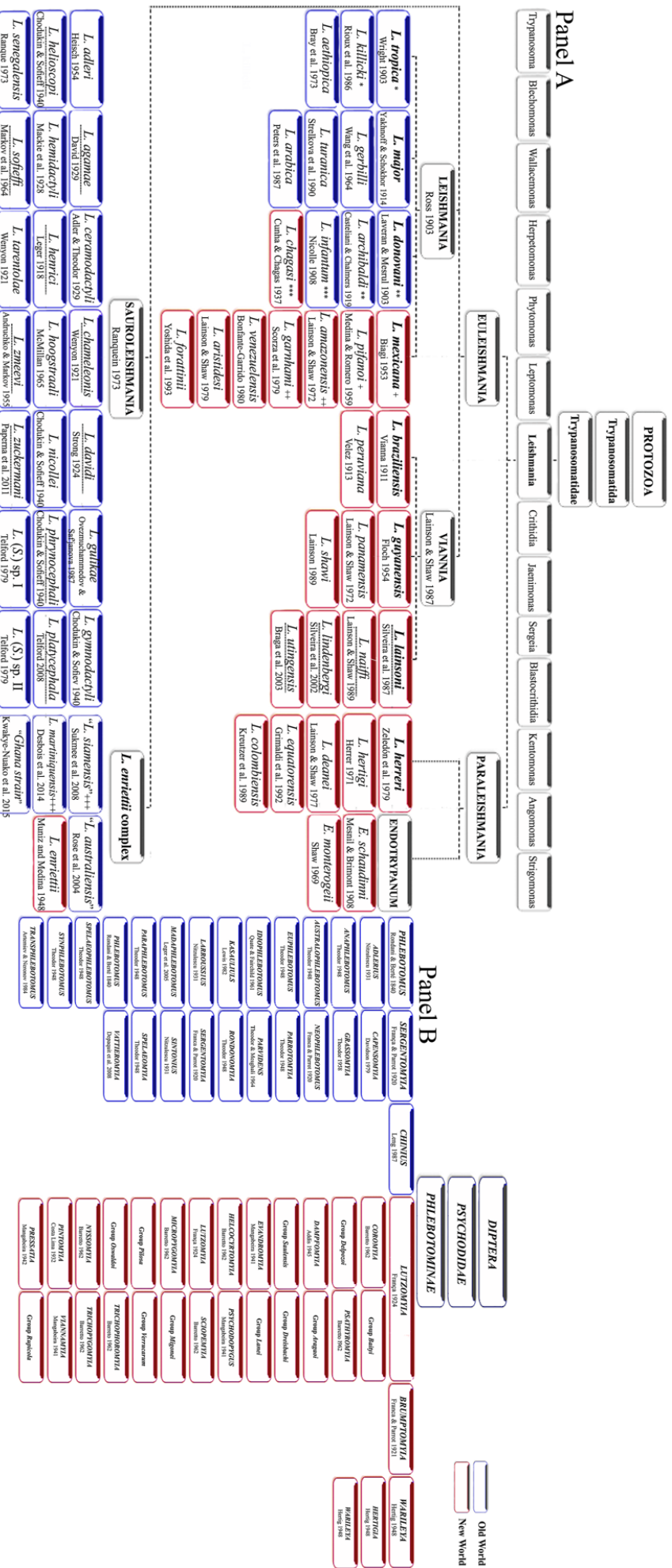


Figura 1: Clasificación de las especies de Leishmania (32).

INTRODUCCIÓN

1.2. Morfología y ciclo biológico de *Leishmania*

Leishmania es un protozoo parásito que presenta un ciclo de vida heteroxeno, por lo que precisa de dos hospedadores; un hospedador vertebrado que hace de reservorio y puede ser reptil o mamífero (36), y otro intermediario que es un insecto que a su vez hace de vector. El artrópodo vector es el flebotomo hembra de los géneros *Lutzomyia* en las Américas y *Phlebotomus* en el Viejo Mundo (37).

Son parásitos plesiomórficos por lo que presentan distinta morfología durante su ciclo biológico, existiendo dos tipos morfológicos que se diferencian principalmente en la presencia o ausencia de un flagelo libre y en la localización y estructura del kinetoplasto. Esta estructura fue observada por los primeros investigadores con microscopio de luz como gránulos basófilos ubicados cerca del cuerpo basal del flagelo (38,39). En los años 60 los primeros estudios con microscopio electrónico realizados por Vickerman y Steinert (40,41), verificaron que este orgánulo (kinetoplasto) representa una porción de una mitocondria ramificada simple de la célula que contiene una gran masa de ADN mitocondrial (1).

Existen formas intermedias de este protozoo parásito durante su evolución en el hospedador invertebrado (42):

- **Promastigote:** se localiza en el aparato digestivo del flebotomo hembra y tiene forma alargada y con flajelo que le proporciona movilidad y con un tamaño de 15- 20 μm (30). (Figura 2.A)
- **Amastigote:** es la morfología que adopta el parasito en su etapa intracelular dentro del hospedador vertebrado. Es redondeado, carece de flagelo y su tamaño oscila entre 3-5 μm (30). (Figura 2.B)

INTRODUCCIÓN

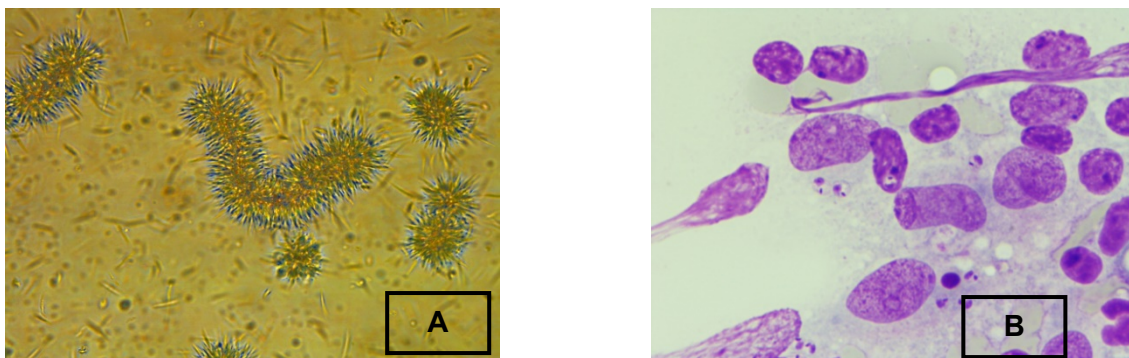


Figura 2: Formas promastigotes presentes en el flebotomo transmisor (A) y formas amastigotes presentes en los reservorios mamíferos (B). Fuente: Laboratorio LeishmanCeres. Universidad de Extremadura.

El ciclo de vida representado en la Figura 3, publicada por el Centro para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC) (43), comienza cuando una hembra de flebotomo se alimenta de sangre de un hospedador vertebrado que contiene macrófagos infectados con las formas amastigotes presentes en la piel. En el tracto digestivo del flebotomo, esos amastigotes se transforman en promastigotes procíclicos (24-48 horas), que no son infectivos, pero tienen gran capacidad de replicación por fisión binaria. En el lumen del intestino de las hembras phlebotominas se reproducen y son capaces de resistir la digestión hidrolítica, gracias a glucoconjugados de superficie que también les permiten su adhesión a su intestino. Posteriormente se produce la transformación a promastigotes metacíclicos, forma infectiva, pero sin capacidad de replicación, que se localizan en la región anterior del intestino (valva estomodeal), faringe y probóscide del vector (44).

En la siguiente etapa, el parásito en forma de promastigote flagelado y presente en la probóscide del flebotomo, pasa al hospedador vertebrado sano mediante la picadura de éste, inoculando entre 10 y 100 promastigotes infectivos. En ese momento, el sistema inmune del vertebrado puede llegar a eliminar hasta el 80% de los parásitos (45). El resto son fagocitados por células tales como neutrófilos, células dendríticas inmaduras y especialmente macrófagos, transformándose en la forma intracelular denominada amastigote que puede evitar los distintos mecanismos de defensa inmunitarios y multiplicarse de forma asexual por fisión binaria (46). Dependiente de la especie

INTRODUCCIÓN

parásita, su tropismo (dérmico, dermomucoso o visceral) y de factores dependientes del hospedador (genética, edad, inmunocompetencia, etc.) los amastigotes serán fagocitados por nuevas células de la piel, mucosas o la práctica totalidad del organismo, especialmente los pertenecientes al Sistema Mononuclear Fagocítico (SMF) como es el caso de la leishmaniosis visceral (LV). El ciclo se completa cuando una nueva hembra de flebotomo se alimenta de un nuevo hospedador infectado e ingiere macrófagos parasitados presentes en la piel (47).

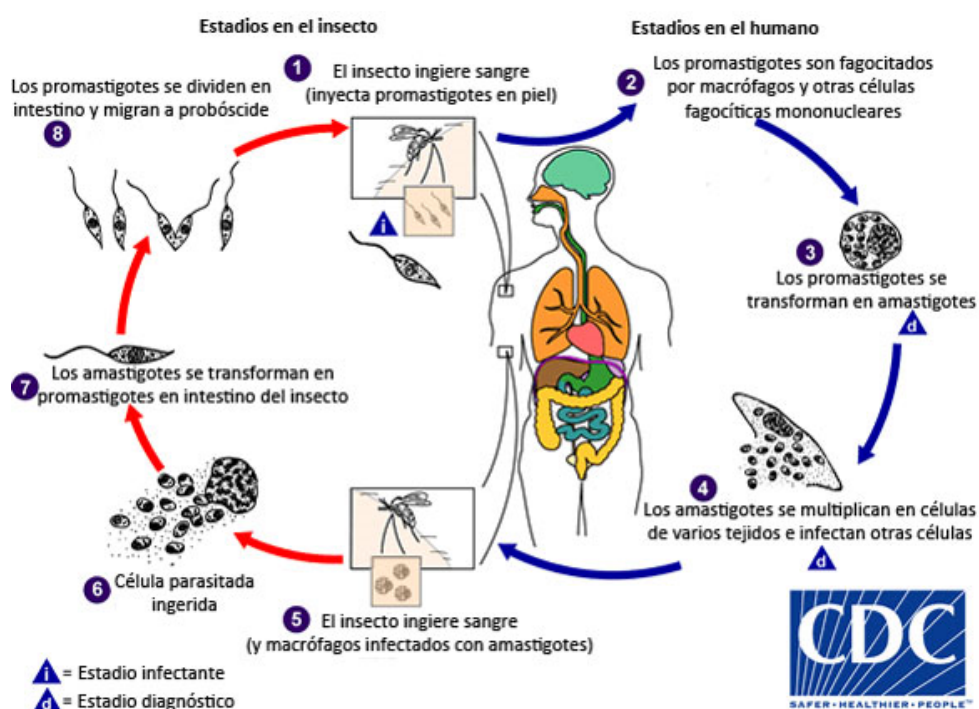


Figura 3: Ciclo biológico de *Leishmania* spp. (43)

1.3. Epidemiología de la leishmaniosis

La leishmaniosis sigue siendo un problema de salud ecoepidemiológico en 5 regiones del mundo: América, África Este, África del Norte, Asia Occidental y Asia Sudoriental (48). Aproximadamente se han descrito 53 especies de *Leishmania*, de las que 31 parasitan mamíferos y 20 son patógenas para el ser humano (49).

En función de la fuente de infección para la especie humana, las leishmaniosis se pueden clasificar en dos grandes categorías: zoonóticas, cuyos hospedadores

INTRODUCCIÓN

reservorios son animales salvajes o animales domésticos, y antroponóticas, cuyo hospedador reservorio es el propio ser humano como es el caso del Kala-azar producido por la especie *L. donovani* endémica especialmente en la India (18).

1.3.1. Leishmaniosis humanas: incidencia en España

Según los últimos datos reportados por la Organización Mundial de la Salud (OMS), la leishmaniosis fue considerada endémica en 98 países en el año 2018, estimándose una incidencia mundial anual de entre 700.000 y un millón de nuevos casos y entre 26.000 y 65.000 defunciones (50).

Existen 4 formas clínicas diferentes dependientes de la especie de *Leishmania* causante de la enfermedad y de la respuesta inmune del hospedador: leishmaniosis visceral (LV, también conocida como kala-azar), leishmaniosis dérmica post-kala-azar (PKDL), leishmaniosis cutánea (CL) y leishmaniosis mucocutánea (LMC) (48). Tal y como se muestra en la Tabla 1, las características clínicas y epidemiológicas de las principales especies de *Leishmania* varían entre sí.

De forma general, las infecciones cutáneas primarias de LC muchas veces se resuelven sin tratamiento, aunque también la infección puede diseminarse y producir lesiones secundarias en la piel bajo el nombre de leishmaniosis cutánea difusa (LCD) y LMC. Las leishmaniosis viscerales (LV) causadas por las especies *L. donovani* y *L. infantum* (sin. *L. chagasi*) tienden a diseminarse e infectar la práctica totalidad del organismo, especialmente aquellos órganos del SMF tales como bazo, médula ósea, hígado y la propia piel. Estas últimas tienen una tasa de letalidad alrededor del 100% a los dos años si no se administra tratamiento (18). Finalmente, una forma singular de la infección por *L. donovani* es la leishmaniosis dérmica post Kala-azar o LDPKA en las que las recidivas tienden a colonizar la piel con altas cargas parasitarias (18,51).

Respecto a la LV, son especialmente características la aparición de fiebre, hepatoesplenomegalia y síndrome anémico con tendencia a la pancitopenia y especialmente disproteinemia con hipergammaglobulinemia policlonal, hipoalbuminemia y alteraciones de factores de coagulación con tendencia a las

INTRODUCCIÓN

hemorragias. Durante el transcurso de la infección, la pérdida de peso progresiva, la predisposición a infecciones concurrentes junto con insuficiencia hepática y especialmente renal conduce a la muerte de los pacientes si no son tratados a tiempo (52-54).

INTRODUCCIÓN

	Sub género	Forma clínica	Características clínicas.	Progresión natural	Grupos de riesgo	Reservorio principal	Países o regiones de alta carga
<i>Leishmania donovani</i> *		LV LDPK	Fiebre persistente, esplenomegalia, pérdida de peso y anemia en la LV Lesiones maculares, papulares o nodulares indoloras múltiples en LDPK.	LV es fatal dentro de 2 años. Las lesiones de LDPK se curan solas, 85% de los casos en África), rara vez en Asia.	Adolescentes y adultos jóvenes para LV. Niños pequeños en Sudán No hay factores de riesgo para LDPK.	Humanos	India Bangladesh Etiopia Sudán
<i>Leishmania tropica</i> *		LC LR LV	Ulceración de lesiones secas, indoloras y frecuentemente múltiples.	Las lesiones LC a menudo se curan solas en 1 año.	No hay grupos de riesgo bien definidos.	Humanos Focos zoonóticos.	Mediterráneo oriental, Oriente Medio, Noreste y sur de África
<i>Leishmania aethiopia</i> *		LC LCD LCDs	Lesiones nodulares cutáneas localizadas; ocasionalmente oronasal; raramente se ulcera.	Autocuración, excepto para LCD, dentro de 2 a 5 años.	Pruebas limitadas; adolescentes.	Hyraxes	Etiopia y Kenia
<i>Leishmania major</i> *	<i>Leishmania</i>	LC	Necrosis rápida, múltiples llagas húmedas e inflamación severa.	Autocuración en > 50% de los casos en 2 a 8 meses; Lesiones múltiples tardan en curarse y cicatrización severa.	No hay grupos de riesgo bien definidos.	Roedores	Irán, Arabia Saudita, África del norte y occidental, Oriente Medio, Asia central.
<i>Leishmania infantum</i> *		LV LC	Fiebre persistente y esplenomegalia en la LV. Nódulos solitarios e inflamación mínima en la LC.	LV es fatal dentro de 2 años. Las lesiones de LC se curan solas en 1 año y confieren inmunidad individual.	LV: niños menores de 5 años y adultos inmunocomprometidos por. LC: niños mayores y adultos jóvenes.	Perros Liebres Humanos.	China, sur de Europa, Brasil y Sudamérica para LV y LC, América Central para LC
<i>Leishmania mexicana</i> †		LC LCD LCDs	Lesiones ulcerantes, simples o múltiples.	A menudo se autocura en 3 a 4 meses.	No hay grupos de riesgo bien definidos.	Roedores Marsupiales	Sudamérica
<i>Leishmania amazonensis</i> †		LC LCD LCDs	Lesiones ulcerantes, simples o múltiples.	No bien descrito.	No hay grupos de riesgo bien definidos.	Oposum Roedores	Sudamérica
<i>Leishmania braziliensis</i> †	<i>Viannia</i>	LC LMC LCD LR	Las lesiones ulcerantes pueden progresar a la forma mucocutánea. Ganglios linfáticos locales palpables antes que el inicio de las lesiones.	Puede auto curarse dentro de 6 meses. 2-5% de los casos avanzan a LMC.	No hay grupos de riesgo bien definidos.	Perros Humanos Roedores Caballos	Sudamérica
<i>Leishmania guyanensis</i> †		LC LCDs LMC	Lesiones ulcerantes, únicas o múltiples que pueden progresar a la forma LMC. Ganglios linfáticos palpables.	Puede auto curarse en 6 meses	No hay grupos de riesgo bien definidos.	Pícaros Perezosos Osos hormigueros	Sudamérica

Tabla 1: Características clínicas y epidemiológicas de las principales especies de Leishmania (55).

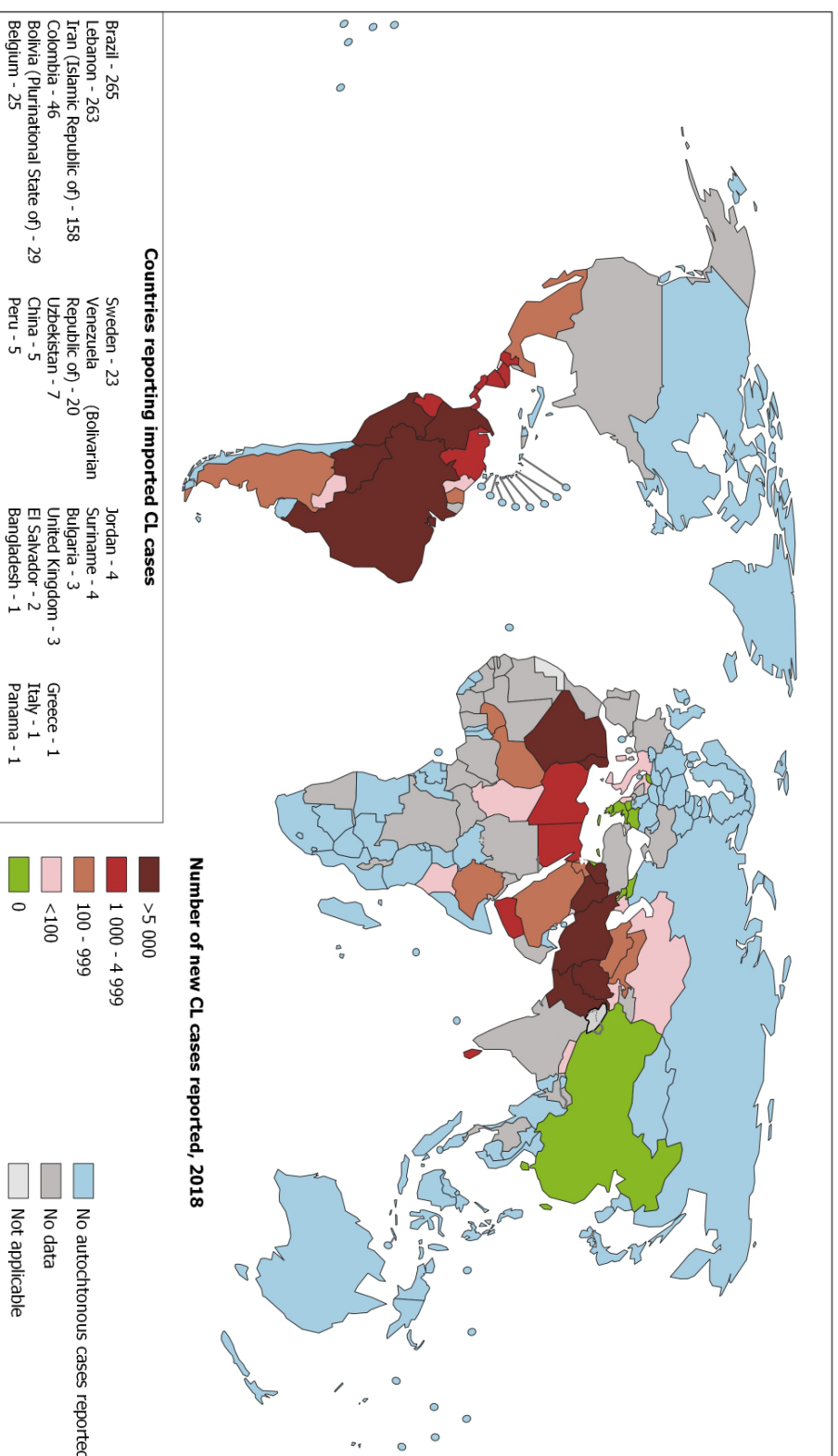
LV = leishmaniosis visceral. LDPK = leishmaniosis dérmica post-kala-azar. LC = leishmaniosis cutánea. RL = recidiva de leishmaniosis. LCD = leishmaniosis cutánea difusa. LCDs= leishmaniosis cutánea diseminada. LMC = leishmaniosis mucocutánea.

* Leishmaniosis del viejo mundo. † = Leishmaniosis del Nuevo Mundo.

INTRODUCCIÓN

De acuerdo con la resolución WHA60.13 sobre el control de la leishmaniosis (17), la OMS desarrolló herramientas simples y estandarizadas para recopilar anualmente un conjunto mínimo de indicadores de todos los Estados miembros para crear conciencia sobre la carga mundial de leishmaniosis y para monitorizar los avances en su control (48). Del conjunto mínimo de indicadores, seis se publican a través del Observatorio de Salud Global (50): (i) estado de endemidad de LC; (ii) número de casos de LC informado; (iii) estado de endemidad de LV; (iv) número de casos de LV notificados; (v) número de casos importados e informados de LC y (vi) número de importados e informados de LC.

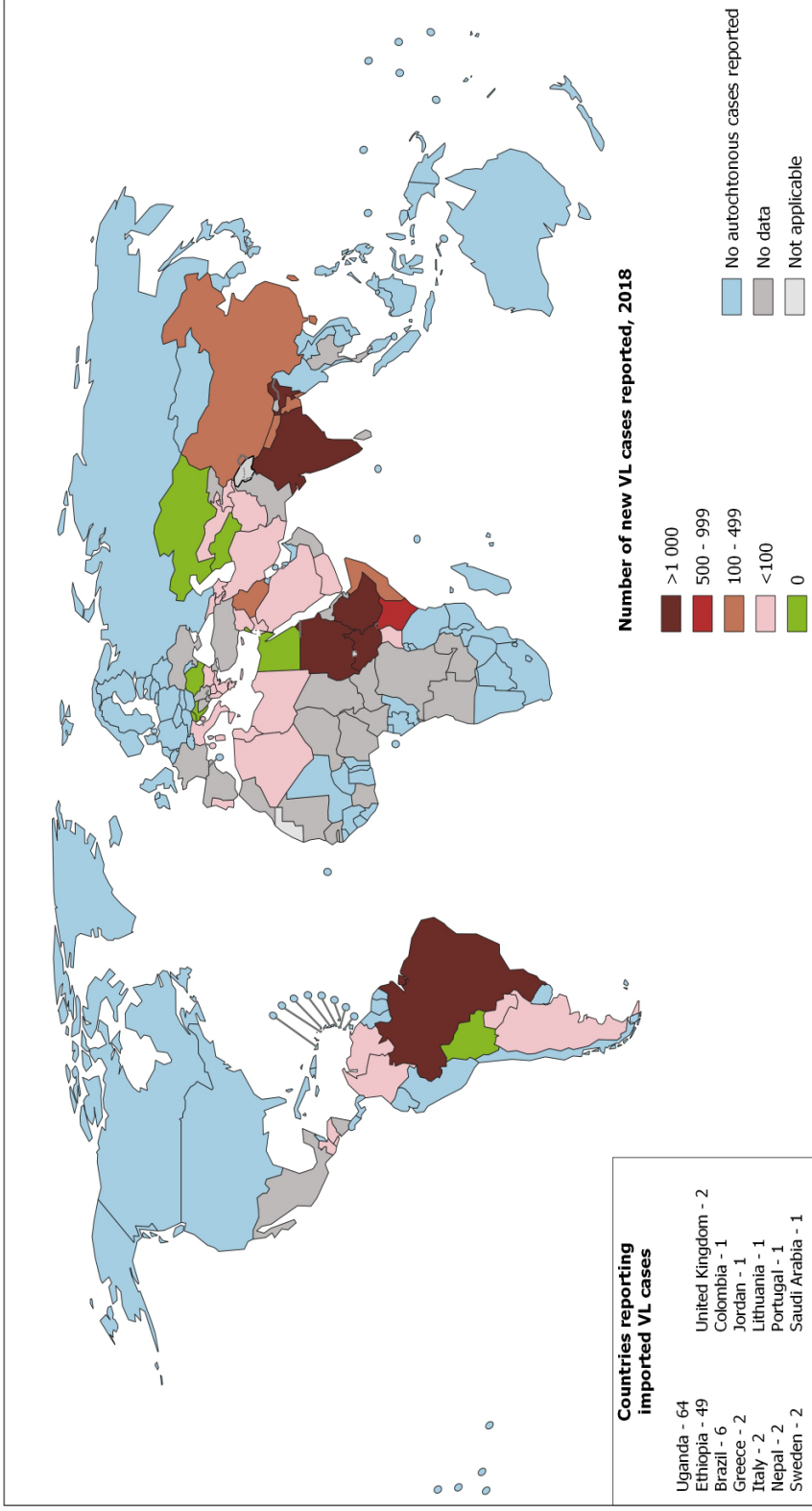
Según la OMS, en el año 2018 (48), de los 200 países y territorios que notificaron a la OMS, 97 (49%) se consideraron endémicos y 4 habían notificado previamente casos de leishmaniasis. De esos 200, 88 (44%) se consideraron endémicos para CL, 3 (2%) habían notificado previamente casos de CL, 78 (39%) se consideraron endémicos para LV y 6 (3%) habían notificado previamente casos de LV. De los 200, 69 (35%) eran endémicos tanto para CL como para LV. En cifras absolutas, los países y territorios endémicos estaban bien distribuidos entre 6 regiones como se representa en las siguientes Figuras 4 y 5.



The boundaries and names shown and the designations used on this map do not imply the expression of any opinion whatsoever on the part of the World Health Organization concerning the legal status of any country, territory, city or area or of its authorities, or concerning the delimitation of its frontiers or boundaries. Dotted lines on maps represent approximate border lines for which there may not yet be full agreement. © WHO 2019. All rights reserved

Figura 4: Estado de la endemividad de la leishmaniosis cutánea en todo el mundo en 2018. (48)

INTRODUCCIÓN



The boundaries and names shown and the designations used on this map do not imply the expression of any opinion whatsoever on the part of the World Health Organization concerning the legal status of any country, territory, city or area or of its authorities, or concerning the delimitation of its frontiers or boundaries. Dotted lines on maps represent approximate border lines for which there may not yet be full agreement. © WHO 2019. All rights reserved

Data Source: World Health Organization
Map Production: Control of Neglected Tropical Diseases (NTD)
World Health Organization



Figura 5: Estado de la endemidad de la leishmaniosis visceral en todo el mundo en 2018 (48).

INTRODUCCIÓN

Según estos mismos datos, más del 90% de los casos de LV mundiales se notificaron en siete países: Brasil, Etiopía, India, Kenia, Somalia, Sudán del Sur y Sudán. Diez países notificaron más de 5.000 casos de LC: Afganistán, Argelia, Bolivia, Brasil, Colombia, la República Islámica de Irán, Irak, Pakistán, Perú, la República Árabe Siria y Túnez, que en conjunto representan el 85% de los reportados a nivel mundial. Incidencia de CL. Se notificaron 1.039 casos importados de LC a nivel mundial (sin datos disponibles de Turquía, que notificó solo 1.089 casos importados de LC en 2016). Comparativamente, el número de casos importados de LV fue menor, con un total de 140 casos importados notificados a nivel mundial en 2018 (48).

En la Unión Europea hay 2 ciclos endémicos de transmisión: la forma zoonótica cutánea y visceral de leishmaniosis producida por *L. infantum* en toda la región Mediterránea y la forma antroponótica cutánea de leishmania causada por *L. tropica*, que se distribuye esporádicamente en Grecia y probablemente en países vecinos (50,56).

En España, la leishmaniosis es una zoonosis endémica presente en la mayor parte de la península e Islas Baleares. Se han observado fluctuaciones en la incidencia de la enfermedad atribuibles a cambios medioambientales, aspectos climáticos o desplazamientos de la población. *L. infantum* es la especie responsable tanto de las formas viscerales como cutáneas, siendo el principal reservorio, hasta el momento, el perro (29). Tal y como se representa en la Figura 6, las dos especies de flebótomos que se han mostrado competentes en el país son *Phlebotomus perniciosus* y *Phlebotomus ariasi*. Ambos se encuentran distribuidos por todo el territorio peninsular, por lo que el riesgo de transmisión puede presentarse en cualquier área geográfica en la que se den las condiciones apropiadas para que circule este parásito. Por otro lado, se han detectado *Phlebotomus papatasi* y *Phlebotomus sergenti* en los cinturones termomediterráneo y mesomediterráneo, zonas con cierta aridez y temperaturas cálidas que favorecen su desarrollo (57).

INTRODUCCIÓN

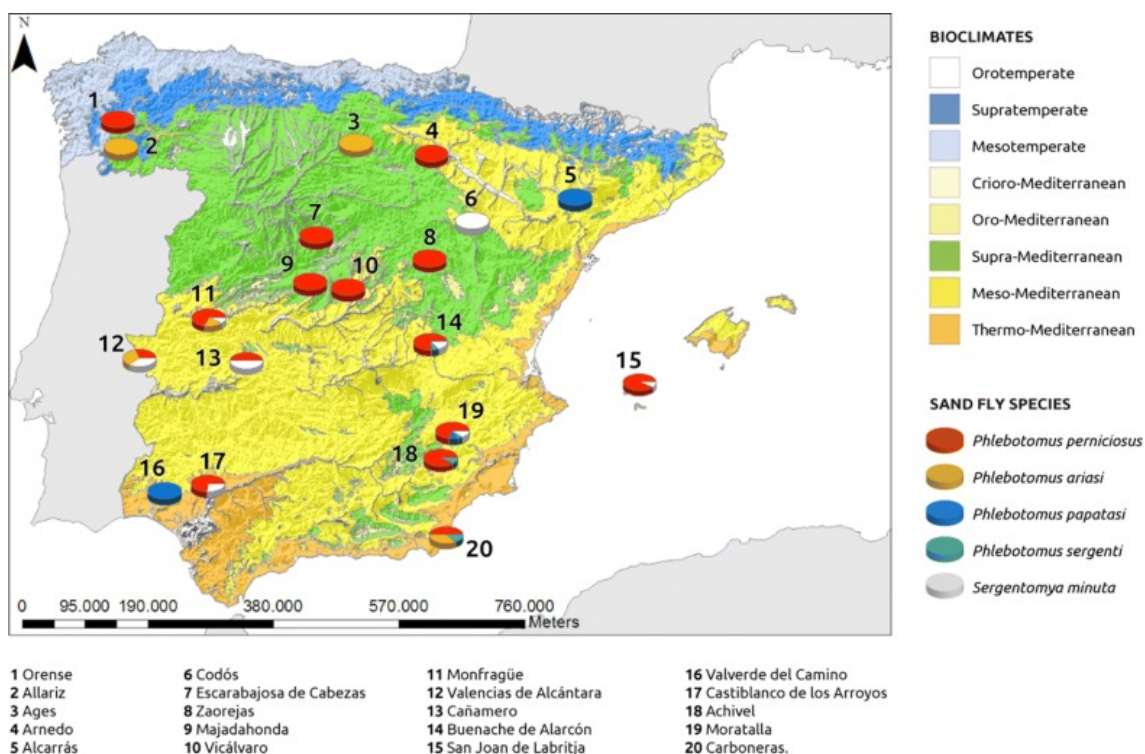


Figura 6: Moscas de arena en la Península Ibérica y las Islas Baleares mostrados en un mapa de zona bioclimática (57).

En 1982 comienza la vigilancia epidemiológica de esta enfermedad debido a que entra a formar parte del listado de Enfermedades de Declaración Obligatoria (EDO) (56). Durante esta década se contabilizaban aproximadamente 90 casos/año (tasa 0.3/100.000 habitantes) (58).

Posteriormente, con la entrada en vigor del R.D. 2210/1995, por el que se crea la Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica (RENAVE), la leishmaniosis se clasifica como una enfermedad endémica de ámbito regional y deja de ser de notificación obligatoria en aquellas Comunidades Autónomas (CCAA) en donde la enfermedad no sea endémica. Así, en las últimas notificaciones anuales, las CCAA que han hecho declaración de casos son: Andalucía, Aragón, Baleares, Cantabria, Castilla-León, Cataluña, Comunidad Valenciana, Extremadura, Madrid, Murcia, Navarra y La Rioja. Los datos desde el año 1996 hasta el 2011, muestran una incidencia media anual notificada de alrededor de 0,45/100.000 habitantes (29).

INTRODUCCIÓN

Los casos de leishmaniosis humana ocurridos en España se pueden consultar en la base de datos de la RENAVE y en el Registro de Altas Hospitalarias llamado Conjunto Mínimo de Datos Básicos (CMBD) (59).

Resultados publicados recientemente han puesto de manifiesto la diferencia en los casos registrados en cada una de estas bases de datos. Mientras que RENAVE registró 1.755 casos durante los años 1996-2011 notificados por las CCAA consideradas endémicas, el CMBD notificó 3.442 casos durante el período 1997-2011 en el que se incluían notificaciones de todas las CCAA (60). Estas diferencias ponen de manifiesto una subnotificación de casos en RENAVE, debido a que los casos no se notificaban en todas las CCAA. Este hecho, junto con uno de los brotes más conocidos que comienzan en el año 2009 hasta el año 2012, en el sudoeste de la CCAA de Madrid, afectando a cuatro localidades geográficamente cercanas y rodeadas de extensas zonas de parques (Fuenlabrada, Leganés, Getafe y Humanes de Madrid) (61), llevó a considerar a España como zona endémica de leishmaniosis (29) y en el año 2015 incluirse en la RENAVE como EDO a nivel nacional (62). Las tasas de incidencia en los años previos al brote en estos municipios eran inferiores a 1 caso por cada 100.000 habitantes. Sin embargo, desde el año 2009 aumentaron estas tasas hasta alcanzar cifras de 31 casos por cada 100.000 habitantes en el municipio de Fuenlabrada y 27 casos por cada 100.000 habitantes en el municipio de Leganés en la temporada epidemiológica de 2011-2012. El municipio de Getafe avanzó más lentamente, alcanzando un máximo de 22 casos por cada 100.000 habitantes en la temporada 2014-2015. De forma global, el periodo de mayor número de casos del brote epidémico está entre 2011 y 2013 (61,63). Además, se sugiere que puede existir una asociación entre este brote y el aumento de casos en los últimos años en zonas rurales colindantes (64). Estos cambios epidemiológicos se han asociado a alteraciones medioambientales, cambios en el uso del suelo y al elevado número de lepóridos que se identificaron como reservorios principales (65,66), lo que parece indicar que los perros no juegan un papel importante en el mantenimiento del ciclo de transmisión de *L. infantum* en la zona del foco de Madrid (67). Teniendo en

INTRODUCCIÓN

cuenta estos hallazgos es importante mantener una especial vigilancia epidemiológica y ambiental en esta y otras zonas colindantes al brote para conocer la distribución y evolución de la enfermedad, de los vectores y reservorios, y de esta forma, poder intensificar las medidas de control en caso necesario y evitar la extensión de la enfermedad (64).

1.3.2. Leishmaniosis canina (LCan): prevalencia en España

En España, la LCan es una enfermedad endémica y dinámica con una seroprevalencia general y un riesgo de transmisión que varía según las condiciones ambientales y climáticas locales (57,68). Como se ha descrito anteriormente, el perro es el principal reservorio peridoméstico del parásito *L. infantum* en la cuenca Mediterránea, estimándose que cerca de 2,5 millones de perros están infectados (69). Es por esto por lo que el perro juega un papel fundamental en el mantenimiento y transmisión de la enfermedad al ser humano. Las evidencias de casos de leishmaniosis humanas en zonas que previamente no eran endémicas y que son posteriores a la identificación de vectores competentes y casos de LCan, hace plantearse la importancia del control efectivo de la LCan para contribuir al control de la infección en el ser humano (67,70,71). Existen estudios que tratan de averiguar la prevalencia de la LCan en España, sin embargo, se pone de manifiesto que la técnica de diagnóstico utilizada tiene una influencia considerable en el valor obtenido de prevalencia (72) y que además muestra un amplio rango que varía según la zona geográfica (57). Las provincias del norte de la Península Ibérica tienen muy baja prevalencia, por lo que son consideradas como no endémicas (73), sin embargo, no se distribuye uniformemente y tiende a ser mayor en las zonas rurales y periurbanas y menor en los entornos urbanos.

Esta distribución variable puede ser debida tanto a factores climáticos y ambientales provocados por las actividades humanas (74) como al tamaño de la muestra utilizada en cada estudio y en especial por las técnicas de diagnóstico empleadas. Como se representa en las Figuras 7 y 8, extraídas de una revisión reciente (57) y centrándonos en la provincia de Cáceres, Nieto y Col., 1992 (75) y Rosado y col., 1995 (76),

INTRODUCCIÓN

determinan una prevalencia que oscila entre el 14% y 34,2% utilizando las técnicas de IFI (Inmunofluorescencia indirecta) y ELISA (Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas) respectivamente. También se observan provincias con alto endemismo como Baleares (57,1%), Ourense (35,6%), Málaga (34,6%) y Cáceres (34,2%), seguidas de Gerona (24,6%), Córdoba (23,7%), Granada (19,3%) y Alicante (19,1%) y las provincias con menor seroprevalencia que son Vizcaya (0%), Cantabria (2%) y Álava (3,3%).

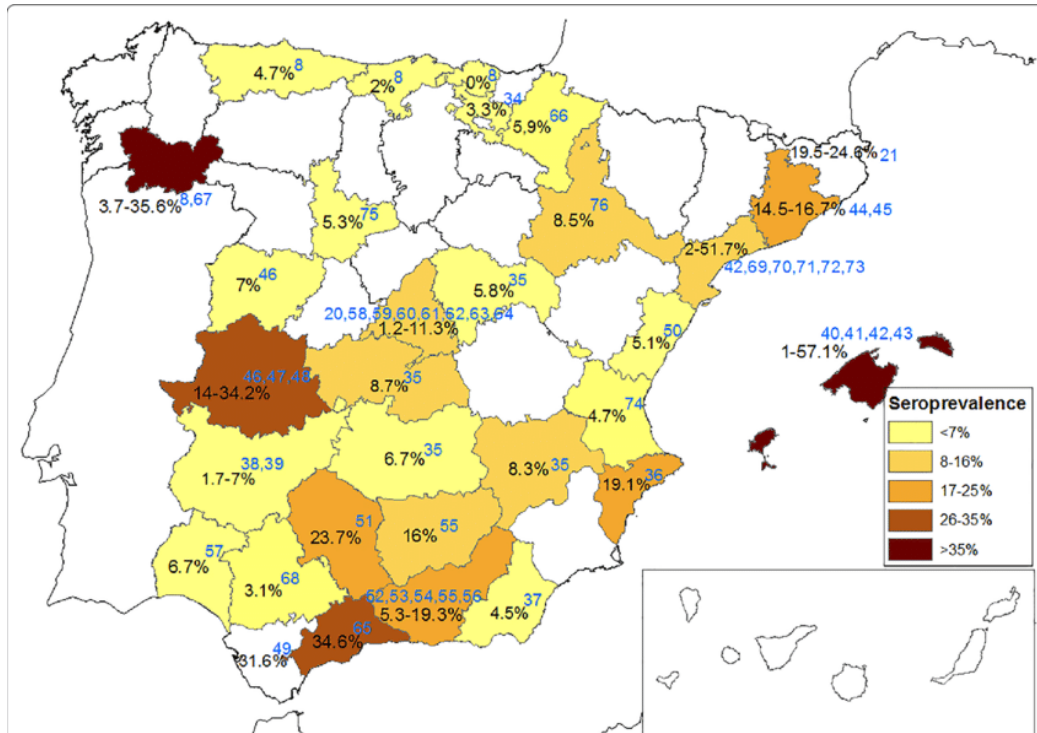


Figura 7: Seroprevalencia de la infección canina por *L. infantum* en España por provincias a partir de una revisión de la literatura publicada entre 1985 y 2019 (57).

INTRODUCCIÓN

Province	Seroprevalence (%)				Seroprevalence range (%)	n	Reference
	IFAT	ELISA	IFAT & ELISA	Commercial kit			
Álava	3.3	-	-	-	3.3	na	Sáez de Santamaría et al. [34]
Albacete	-	-	8.3	-	8.3	232	Benito et al. [35]
Alicante	-	19.1	-	-	19.1	807	Alonso et al. [36]
Almería	4.5	-	-	-	4.5	286	Sanchís Marín et al. [37]
Asturias	4.7	-	-	-	4.7	171	Miro et al. [8]
Badajoz	-	7.0	-	-	1.7–7.0	na	Rosado et al. [38]
	-	-	-	1.7		na	Asencio et al. [39]
Balearic Is.	-	1.0	-	-	1.0–57.1	813	Seguí [40]
	35.2	38.4	-	-		353	Pujol et al. [41]
			29.3	-		300	Solano-Gallego et al. [42]
	57.1	35.7	-	52.4		121	Alcover et al. [43]
Barcelona	14.5	-	-	-	14.5–16.7	617	Botet et al. [44]
	16.7	-	-	-		466	Corachan et al. [45]
Cáceres	15.0	-	-	-	14.0–34.2	433	Encinas Grandes et al. [46]
	14.0	-	-	-		381	Nieto et al. [47]
	-	34.2	-	-		240	Rosado et al. [48]
Cádiz	31.6	-	-	-	31.6	98	Morales-Yuste et al. [49]
Cantabria	2.0	-	-	-	2.0	100	Miró et al. [8]
Castellón	5.1	-	-	-	5.1	118	Arnedo Pena et al. [50]
Ciudad Real	6.7	-	-	-	6.7	232	Benito et al. [35]
Córdoba	-	-	23.7	-	23.7	540	Martínez-Cruz et al. [51]
Granada	8.8	-	-	-	5.3–19.3	1503	Reyes Magaña et al. [52]
	19.3	-	-	-		na	Reyes Magaña et al. [53]
	5.3	-	-	-		615	Acedo-Sánchez et al. [54]
	16.1	-	-	-		1374	Acedo-Sánchez et al. [55]
	13.0	-	-	-		439	Martín-Sánchez et al. [56]
Girona	-	19.5–24.6	-	-	19.5–24.6	168	Vélez et al. [21]
Guadalajara	-	-	5.8	-	5.8	232	Benito et al. [35]
Huelva	6.7	-	-	-	6.7	702	Lepe et al. [57]
Jaén	16.0	-	-	-	16.1	1374	Acedo-Sánchez et al. [55]
Madrid	4.7	-	-	-	1.2–11.3	473	Celaya [58]
	5.2	-	-	-		591	Amela et al. [59]
	4.7	-	-	-		235	Castañeda et al. [60]
	11.3	-	-	-		278	Castañeda et al. [61]
	8.6	-	-	-		775	García Nieto et al. [62]
	7.8	-	-	-		1803	Miró et al. [63]
	8.1	-	-	-		1076	Gálvez et al. [20]
	1.2	-	-	-		1372	Miró et al. [64]
Málaga	34.6	-	-	-	34.6	344	Morillas et al. [65]
Navarra	5.9	-	-	-	5.9	653	Sesma et al. [66]
Ourense	3.7	-	-	-	3.7–35.6	479	Amusátegui et al. [67]
	35.6	-	-	-		101	Miró et al. [8]
Salamanca	7.0	-	-	-	7.0	433	Encinas Grandes et al. [46]
Sevilla	3.1	-	-	-	3.1	1000	Ariza-Astolfi et al. [68]
Tarragona	2.0	-	-	-	2.0–51.7	895	Portús et al. [69]
	15.0	-	-	-		104	Fisa et al. [70]
	10.2	-	-	-		902	Fisa et al. [71]
	-	-	10.2	-		107	Fisa et al. [72]
	-	-	5.7	-		2110	Fisa et al. [73]
			51.7	-		116	Solano-Gallego et al. [42]
Toledo	8.7	-	-	-	8.7	232	Benito et al. [35]
Valencia	-	-	4.7	-	4.7	215	Benito-Hernández et al. [74]
Valladolid	-	-	-	5.3	5.3	131	Couto et al. [75]
Vicaya	0	-	-	-	0	47	Miro et al. [8]
Zaragoza	8.5	-	-	-	8.5	1572	Castillo Hernández et al. [76]

Figura 8: Seroprevalencia de la infección canina por *L. infantum* en España por provincias a partir de una revisión de la literatura publicada entre 1985 y 2019 (57). Abreviatuas: n, número de perros; na, no aplica.

INTRODUCCIÓN

1.3.3. Leishmaniosis en los reservorios animales

El reservorio de una infección se define como el sistema ecológico en el que un agente infeccioso sobrevive de forma persistente. Para las infecciones transmitidas por vectores, el sistema comprende uno o más vectores y uno o más hospedadores mamíferos (77). Estos reservorios mamíferos responsables del mantenimiento a largo plazo de una población de agentes infecciosos es lo que se conoce con el nombre de reservorios u hospedadores reservorios primarios, siendo el perro el único reservorio primario confirmado para la leishmaniosis (26).

Además de los primarios o principales, también pueden existir reservorios accidentales, que en ocasiones pueden ser responsables de alguna transmisión y pueden convertirse en reservorios secundarios, pudiendo tener una localización geográfica distinta al reservorio principal, pero que, sin embargo, son irrelevantes en la persistencia a largo plazo de la infección, debido a que no pueden mantener al parásito en ausencia del reservorio principal (77). La presencia de infección en una especie de mamíferos, aunque sea en numerosos individuos, no indica necesariamente que sea un hospedador reservorio. Para ser incriminado formalmente un reservorio es necesario demostrar que la población de parásitos depende de ese mamífero, en particular para su mantenimiento a largo plazo. Así, según la fuente de infección, las leishmaniosis se pueden agrupar en dos grandes categorías: las leishmaniosis zoonóticas, en las que los reservorios hospedadores son animales salvajes, comensales o animales domésticos, y las leishmaniosis antroponóticas, en las que el hospedador reservorio es el ser humano (18).

Aunque los cánidos en general se consideran el principal reservorio de la infección por *L. infantum* en áreas endémicas de Europa, puesto que cumplen los atributos requeridos para ser reservorios eficientes (78), la existencia de otros reservorios en vertebrados silvestres se ha propuesto como una posible causa de la falta de éxito de las medidas de control (79,80). Es conocida la presencia de infección por *L. infantum* en la vida silvestre europea en carnívoros, lagomorfos y roedores. El zorro rojo (*Vulpes vulpes*)

INTRODUCCIÓN

recibió la mayor atención, probablemente debido a su relación taxonómica con el perro y porque es el carnívoro silvestre más abundante en Europa (80,81). Los zorros y otros carnívoros salvajes a menudo muestran altas prevalencias de infección y son los responsables en parte del mantenimiento del ciclo selvático (27,82,83).

En España, diferentes estudios realizados en Cataluña, Cantabria o Centro Peninsular (25,84) determinan prevalencias variables, oscilando desde el 2,7% al 22,5%, en mamíferos salvajes y domésticos. Hay que tener en cuenta que existen investigaciones que revelan la existencia en España de reservorios para *Leishmania*, que hasta ahora han sido considerados hospedadores accidentales, como los gatos (85,86), los conejos silvestres y las liebres ibéricas (*Lepus granatensis*), entre los que, actualmente, se ha encontrado una alta incidencia (65,66,81,87). En el caso de la CCAA de Extremadura, se ha identificado la presencia de *L. infantum* mediante técnicas moleculares de reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR) en diversas especies animales silvestres, entre las que se encuentran el zorro, erizo, garduña y lagomorfos (27).

Además, la rata negra (*Rattus rattus*) resulta infecciosa para los flebótomos mediante métodos de xenodiagnóstico, lo que junto con su abundancia relativa, altas tasas de infección y el hecho de que se han encontrado ratas infectadas en una isla mediterránea donde los perros no están presentes, hace que las ratas sean buenas candidatas para ser reservorios de *L. infantum* (81).

En el futuro, la comparación de aislados de parásitos de humanos, perros y animales de vida silvestre, estudios de xenodiagnóstico en carnívoros salvajes y el estudio de otros grupos taxonómicos de vertebrados, ayudarán a determinar el papel actual de animales de vida silvestre europeos en la epidemiología de la leishmaniosis (81).

1.4. Relación Parásito-Hospedador

Para el desarrollo de nuevos fármacos y procedimientos de diagnóstico menos invasivos de la leishmaniosis es necesario comprender mejor la interacción parásito-hospedador y los factores que pueden afectar a la gravedad y al control de la enfermedad (88). Las

INTRODUCCIÓN

infecciones por parásitos pertenecientes al género *Leishmania* en las distintas especies de mamíferos animales son, quizá, una de las relaciones más complicadas en su comprensión. Esto es debido a que existen extremadas diferencias entre y dentro de las diferentes especies hospedadoras del parásito, entre las propias especies parásitas y los numerosos factores secundarios que pueden influir en la competencia inmunológica del propio hospedador, derivando en multitud de expresiones clínicolesionales y sus consecuencias.

Así, entre los factores dependientes del parásito destacan, en primer lugar, la especie, seguido de la dosis infectante y de las variedades moleculares de cada una. Con relación a los factores dependientes del hospedador, destacan la propia especie del mamífero infectado (constitución genética) y su estado inmunitario, que condiciona su capacidad defensiva desde la primoinfección y el control o no de la diseminación tisular (cutánea, mucocutánea y visceral) para cada una de las especies de *Leishmania* (89-90).

La infección experimental con parásitos del género *Leishmania* ha contribuido significativamente a la comprensión de la etiología, la transmisión, la patogénesis y la inmunidad asociada a ella. Los primeros experimentos se realizaron con *Leishmania major* (*L. major*), utilizando modelos murinos (91,92). Con posterioridad y con el fin de esclarecer si el modelo murino se ajustaba también al resto de hospedadores, se realizaron estudios en otros modelos animales, como hamsters, perros o en la especie humana (93-98), lo que ha resultado esencial para el desarrollo de estudios de vacunas, tratamientos, diagnóstico, etc., (97,99,100).

1.4.1. Establecimiento de la infección

Tal y como se muestra en la Figura 9, el ciclo de *Leishmania* comienza cuando, mediante picadura, la hembra de flebótomo inocular en el mamífero hospedador promastigotes metacíclicos junto con contenidos gástricos y saliva de los insectos (101). En el caso de la especie canina, los lugares de más fácil acceso a los insectos son los desprovistos

INTRODUCCIÓN

de pelo, como la trufa, los párpados, la región perianal, etc., en los que la aparición del foco inflamatorio es mínima y pasa desapercibida (102).

En un principio los parásitos se tienen que enfrentar a moléculas del complemento, anticuerpos y células fagocíticas que serán capaces de destruir hasta el 80% de los promastigotes (45).

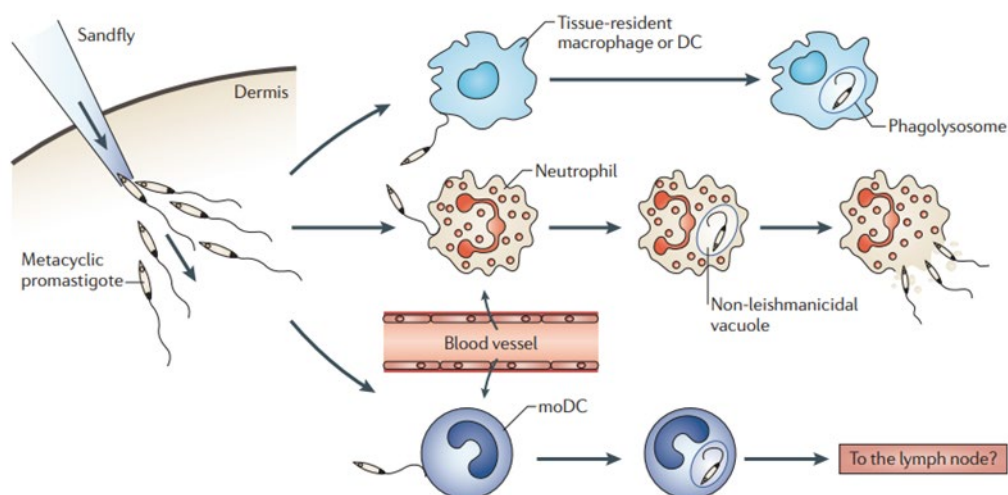


Figura 9: La absorción del parásito de *Leishmania spp.* mediada por las diferentes células. (103)

Sin embargo, esta respuesta primaria inespecífica no evita que un determinado número de parásitos evadan la lisis mediada por el complemento, al inactivar la forma C3b que al pasar a C3bi opsoniza parásitos para su fagocitosis, a través de los receptores del complemento CR3 y CR1 (Figura 10) (104).

Otro mecanismo de supervivencia está relacionado con la capacidad de aumentar la expresión de un lipofosfoglicano (LPG), que actúa de barrera frente a la inserción de los componentes del complemento en la superficie del parásito (105). También el aumento en la síntesis de proteína de superficie GP63 previene el depósito del complejo lítico C5b-C9, al ser inactivada la fracción C3b (106). Durante esta batalla por la supervivencia parasitaria, los promastigotes de *Leishmania* entran en contacto con células fagocíticas, macrófagos y células dendríticas, donde son reconocidos por varios receptores de membrana para ser fagocitados y destruidos (107).

INTRODUCCIÓN

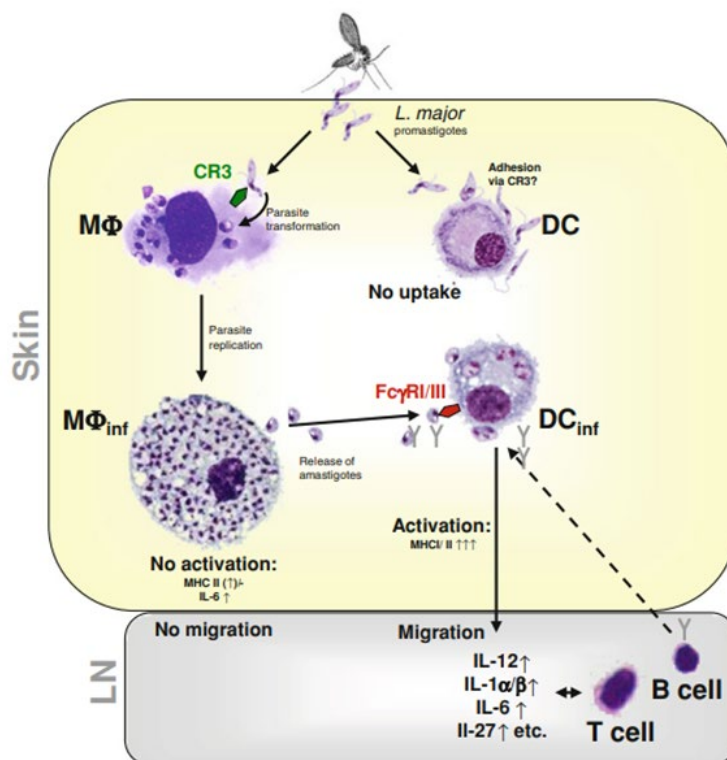


Figura 10: Papel de las células dendríticas y macrófagos en la infección por *Leishmania spp.* (108)

La supervivencia de *Leishmania* a los mecanismos destructivos de los macrófagos (enzimas lisosomales, radicales libres, óxido nítrico, etc.) está relacionada con su capacidad para inhibir y resistir el efecto de los mismos (109) a través de complejos mecanismos moleculares que condicionan los distintos grados de reproducción parasitaria, diseminación orgánica y consecuencias patológicas, interviniendo también la respuesta inmunitaria del hospedador, la cual participa decisivamente en el desarrollo de la enfermedad.

Cuando los amastigotes de *Leishmania* son fagocitados e incluidos en fagosomas, se fusionan con endosomas o lisosomas (110), provocando acidificación del pH y aumento de la actividad hidrolítica. Como mecanismo de resistencia, unidades repetidas de LPG en superficie inhiben transitoriamente la maduración del fagosoma, lo que permite la diferenciación a formas amastigote resistentes a hidrolasas (111). En este proceso de “escape” a la digestión celular (Figura 11) intervienen otros mecanismos desarrollados por *Leishmania*, como son, la expresión de glucoesfingolípidos frente a las enzimas

INTRODUCCIÓN

lisosomales o mediante la inhibición de la actividad de la Proteína Cinasa durante el estallido respiratorio (112).

Aunque el conocimiento de los mecanismos de interacción macrófago-*Leishmania* procedan, en su mayoría, de estudios en ratón es aceptado que mecanismos similares, pero con balances diferentes, estén también presentes en humanos o perros.

Finalmente, para poder sobrevivir y reproducirse en los macrófagos, los amastigotes modulan la producción de citocinas, disminuyen la capacidad de presentación de antígenos y bloquean las moléculas coestimuladoras necesarias para la activación de las células T antígeno específicas (113).

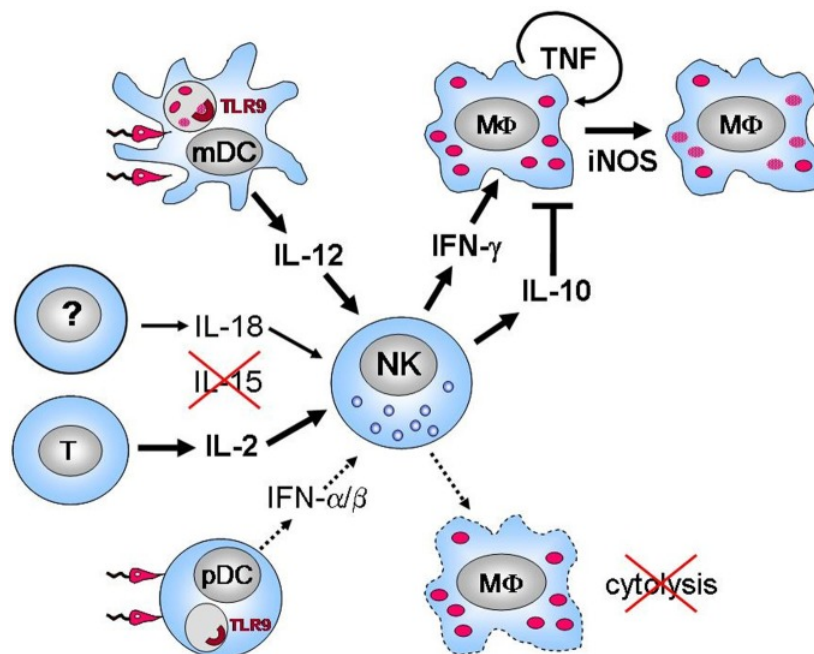


Figura 11: Interacción de las células NK en la infección por *Leishmania spp.* (113)

El fracaso total o parcial del control inmunológico de la infección resulta en la diseminación e invasión orgánica sistémica por parte del parásito y en particular en la invasión de tejidos linforeticulares como es el caso de las infecciones por especies viscerotropas (44).

1.4.2. Respuesta inmune en leishmaniosis

Desde el descubrimiento de la enfermedad son muchos los estudios que centran su atención en el conocimiento de la respuesta inmune frente al parásito (144). Como

INTRODUCCIÓN

ocurre con diferentes agentes infecciosos, la respuesta inmune desencadenada contra *Leishmania* tiene componentes de respuesta innata y adaptativa.

1.4.2.1. Respuesta inmune innata

La respuesta inmune innata se activa con la picadura del vector, momento en el que la introducción de las piezas bucales causa laceración de los vasos sanguíneos con la consecuente hemorragia. Durante la picadura el flebotomo también inyecta su saliva, que contiene sustancias vasodilatadoras como maxadilan (*Lutzomyia*) o adenosina (*Phlebotomus*), la enzima hialuronidasa, antiagregantes plaquetarios, apirasa y sustancias estimuladoras de la producción de prostaglandina E2 (PGE2), lo que facilita la alimentación del insecto junto con la transmisión del parásito (115).

Como muestra la Figura 12, para detener este proceso y destruir los promastigotes inoculados, el sistema inmune innato lucha mediante activación de la cascada del complemento. Una vez que activada esta vía, la C3b facilita el complejo de ataque de membrana (MAC) C5b-C9 en la superficie de *Leishmania* y lisa el parásito. Por el contrario, el factor de virulencia de *Leishmania* LPG inhibe la formación de complejos MAC en la superficie, mientras que GP63 inactiva C3b (iC3b) e inhibe el complejo MAC. La opsonización de *Leishmania* por C3b e iC3b facilita su absorción por los receptores CD11b y FcγR en neutrófilos y macrófagos (116).

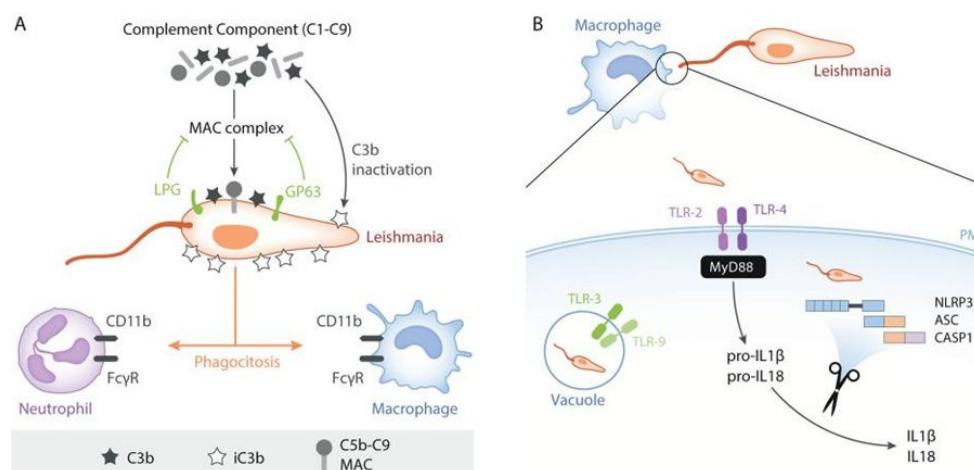


Figura 12: Respuestas inmunes innatas contra las infecciones por *Leishmania* (116).

INTRODUCCIÓN

Tal y como se muestra en la Figura 13, esta respuesta inflamatoria unida a la inoculación de parásitos atrae a células fagocíticas como macrófagos y células de Langerhans que van a actuar como células presentadoras de antígenos a los linfocitos T, actuando como inmunomoduladores de la respuesta inmune celular (117). Los estudios en modelos animales han revelado que los linfocitos T y las citocinas que producen, juegan un papel crucial en la determinación del resultado de la infección parasitaria en términos de inmunidad protectora e inmunopatología (118).

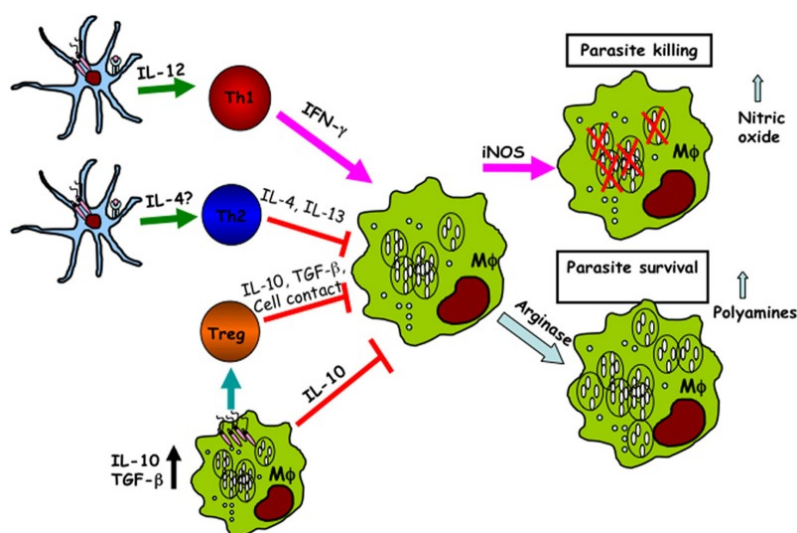


Figura 13: Los macrófagos como reguladores del resultado de la infección por *Leishmania*. (119)

1.4.2.2. Respuesta inmune adaptativa

Los mecanismos adaptativos de resistencia de *Leishmania spp.* para la supervivencia y multiplicación en las células fagocíticas, resultan de su adaptación en los diferentes hospedadores mamíferos, silvestres y domésticos, y capacidad de ser transmitidos mediante insectos específicos que logran completar su ciclo de vida para cada una de las especies del género, tanto las de tropismo cutáneo, mucocutáneo como visceral.

Su capacidad de supervivencia es consecuencia de complejos mecanismos de evasión inmunitaria, de resistencia a estos y en definitiva resistir a los mecanismos microbicidas tanto naturales como adquiridos de cada uno de sus hospedadores naturales, tanto silvestres como domésticos, y en los que el perro se muestra como uno de los más receptivos.

INTRODUCCIÓN

Los estudios realizados sobre los mecanismos implicados en su capacidad de supervivencia están basados en su mayoría en los modelos murinos y humanos tanto para las formas cutáneas como viscerales de las leishmaniosis.

En leishmaniosis cutánea especialmente por *L. major* y en el modelo ratón resistente (C57 BL-6), la lisis de parásitos está mediada por una respuesta inmune de linfocitos Th1 que producen IL-12 la cual induce la producción de IFN-gamma mediada por los linfocitos T CD4+ (120). Por el contrario, en los modelos de ratón susceptibles (Blab/c), el establecimiento y desarrollo de la enfermedad, depende especialmente de una respuesta inmune mediada por linfocitos Th-2 que promueve la secreción de citocinas antiinflamatorias (IL-4, IL-10, IL-13, TGF-B), que imposibilitan la activación de macrófagos y la muerte intracelular de *Leishmania sp.* (120-122).

Respecto a la leishmaniosis canina, existen igualmente distintas respuestas inmunes entre individuos que condicionan en gran medida su capacidad de resistencia o de susceptibilidad frente a la infección y sus consecuencias, especialmente por la especie *L. infantum*, la más extendida a nivel mundial (48). En este sentido, está descrito diferentes grados de susceptibilidad dependientes de factores genéticos como la raza de perros, de inmunocompromiso secundario, etc., así como por respuestas inmunes organodependientes (123), que determinan distintos balances en la secreción de citosinas mediadas por linfocitos T, Th1/Th-2, y que estas están íntimamente relacionadas con las cargas parasitarias y con la aparición de los signos de la enfermedad (124-127).

La LCan a menudo se asocia con una respuesta humoral marcada, que no es protectora y denota falta de control de la infección, con niveles de inmunoglobulinas específicas de *Leishmania* mayores en perros enfermos que en perros subclínicos (128) y observándose una asociación directa marcada entre estos niveles, la densidad del parásito tisular y el estado clínico del animal (129).

De tal forma se estiman dos tipos de respuesta inmune: una respuesta celular, basada en la producción de linfocitos Th1, que producen IFN- γ e IL-2, los cuales son potentes

INTRODUCCIÓN

activadores de macrófagos. Esta respuesta está presente en un bajo porcentaje de perros (<10%), en los que se detectan baja respuesta de anticuerpos y una respuesta proliferativa positiva de las células T frente a antígenos de *Leishmania*, siendo esta respuesta inmunitaria muy parecida a la de las personas inmunocompetentes frente a la infección por *L. infantum* (130,131).

La otra respuesta estimada es de tipo humoral, estando presente en la mayoría de los perros afectados (susceptibles) y se basa en la inducción de los linfocitos Th2 que actúan como supresores y productores de IL-4 e IL-10 y que dan lugar a la estimulación de los linfocitos B, provocando hipergammaglobulinemia inespecífica con producción masiva de anticuerpos anti-*Leishmania* no protectores. Se produce en consecuencia una reacción de hipersensibilidad de tipo III con formación de inmunocomplejos (ICs), responsables de parte de los síntomas más graves que acompañan a esta enfermedad (96,132-134). En estos casos se produce la diseminación del parásito, principalmente a los órganos hematopoyéticos (nódulos linfoides, bazo, medula ósea), donde continúa su replicación y diseminación al resto de órganos (piel, riñón, hígado, sistema nervioso, aparato digestivo, ojos, articulaciones, etc., (135,136).

Estos estados de especial susceptibilidad en la LCan son muy similares a los encontrados en el Kala-azar humano, producido tanto por *L. donovani* como *L. infantum*, causante esta última de la leishmaniosis visceral zoonótica. En estos casos se considera que la respuesta inmune humoral mediada por anticuerpos es un factor determinante para la progresión de la enfermedad (137-139). Esto es debido a una masiva respuesta de células B con la activación policlonal e hiperplasia linfoide que tiene como consecuencia la hipergammaglobulinemia tan característica de la LV con producción de anticuerpos, sobre todo IgG, específicos e inespecíficos frente a este parásito (140,141).

Aunque la importancia de la respuesta inmune celular mediada por Th1 es clara, la leishmaniosis se encuentra asociada con el desarrollo de la inmunidad humoral concurrente. Cabe destacar que es precisamente la naturaleza de esta respuesta

INTRODUCCIÓN

serológica, la que varía la susceptibilidad o la protección frente a la infección por *Leishmania* (142).

En la LCan los niveles elevados de anticuerpos IgG específicos se han asociado con trastornos fisiopatológicos y fases activas de la enfermedad (96,132,143), aunque la ausencia de estas inmunoglobulinas no nos puede llevar a descartar la infección por *Leishmania*.

Varios estudios han descrito los niveles de las subclases de IgG específicas anti-*Leishmania* (IgG1 e IgG2) en perros enfermos, asintomáticos y tratados. Dos estudios demostraron una correlación positiva directa entre la inducción de elevados niveles de anticuerpos IgG1 anti-*Leishmania* y la aparición de signos clínicos en perros infectados con *L. infantum*, mientras que la presencia exclusiva de los anticuerpos IgG2 fueron asociados con infecciones asintomáticas (144,145). Los resultados de algunos estudios indican que los perros recuperados (asintomáticos) mantienen elevados niveles de IgG2 y presentan una disminución en los niveles del isotipo IgG1. Los autores de estos estudios relacionan una elevada concentración de IgG2 con infecciones asintomáticas mientras que valores elevados de IgG1 con la enfermedad (144-147).

1.5. Diagnóstico de la leishmaniosis por *L. infantum*

El diagnóstico de la infección por *L. infantum* es complejo porque el espectro de signos clínicos y anomalías clínico-patológicas es amplio y, a menudo, inespecífico (148) debido a los mecanismos patogénicos de *Leishmania* y a la respuesta inmune variable de los individuos (149). Así, el diagnóstico se basa en una investigación exhaustiva que utiliza varias herramientas de forma integrada para la demostración directa y/o indirecta de la presencia del parásito en el mamífero infectado y todo ello en un determinado contexto clínico-epidemiológico (114,149-154).

Los principales métodos de diagnóstico de la LCan se clasifican en parasitológicos, dentro de los cuales incluimos las pruebas moleculares, y los serológicos o

INTRODUCCIÓN

inmunológicos. Las técnicas parasitológicas consisten, por un lado, en el examen microscópico de diferentes muestras (médula ósea, ganglios linfáticos, lesiones cutáneas, etc.) y de ensayos altamente especializados, por ejemplo, cultivo de parásitos o xenodiagnóstico, que generalmente no se utilizan en la práctica habitual (153); y por otro, los ensayos de diagnóstico molecular que son cada vez más relevantes y generalizados. Las técnicas moleculares incluyen la PCR convencional, la PCR anidada y la PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR) (155). Las técnicas serológicas o inmunológicas, incluida la prueba inmunocromatográfica, la prueba IFI (Inmunofluorescencia Indirecta) y ELISA, son los métodos más comunes para detectar perros infectados (149).

Un diagnóstico precoz es fundamental para garantizar la supervivencia y calidad de vida de animales y personas infectadas (256,257). En concreto, el diagnóstico precoz de la leishmaniosis en el perro, principal reservorio del parásito (69) y los análisis sistemáticos anuales realizados en animales que habitan en zonas de riesgo, garantizarían un control de la endemia canina y de la difusión de la enfermedad (67), consiguiendo además diagnósticos precoces vitales en los éxitos terapéuticos (158).

En base a la cronología de la infección por este parásito, desde los primeros estudios realizados por Lanotte y col., 1979 (159), hasta los más actuales, se ha demostrado que los periodos de prepatencia hasta la detección de la primoinfección son generalmente de varias semanas o meses (30-150 días) y que los periodos de incubación hasta la aparición de los primeros signos de enfermedad son también amplios y muy diferentes (meses o años), además todo ello condicionado por los estados de resistencia y susceptibilidad de cada individuo (97,145,160).

Así, resulta muy diferente en cuanto a los resultados obtenidos el uso de técnicas diagnósticas de detección de formas amastigotes, de su ADN y de los anticuerpos específicos según de la fase de enfermedad en la que se encuentre (149,161).

Por tales motivos, los diagnósticos basados en la sospecha clínica de los perros serán siempre tardíos y de mal pronóstico frente a aquellos realizados en las primeras fases

INTRODUCCIÓN

de la infección en los que la expresión clínica casi siempre estará ausente (97,145,159). En la actualidad, este hecho determina que numerosos perros sean calificados como “resistentes, asintomáticos o expuestos” cuando en realidad están aconteciendo primoinfecciones en fase de diseminación parasitaria sin expresión clínica y lesional.

1.5.1. Sospecha clínica

Como se comentó antes, los perros naturalmente resistentes a la infección con una moderada respuesta humoral y adecuada respuesta inmune de tipo celular pueden ser portadores de los parásitos toda su vida y no mostrar sintomatología (formas latentes asintomáticas) (159,162). Por el contrario, los animales predispuestos a desarrollar la infección (formas evolutivas patentes de cursos agudos, subagudos o crónicos) presentan una marcada respuesta inmune de tipo humoral junto con una escasa capacidad de linfoproliferación y de respuesta celular efectiva (95,132).

Como se muestra en la Tabla 2, existe un sistema de estadificación clínica para la LCan que clasifica a la enfermedad en cuatro estadios según los signos clínicos, las anomalías clínico-patológicas y la medición de anticuerpos anti-leishmania (95).

INTRODUCCIÓN

Etapas Clínicas	Serología	Signos Clínicos	Hallazgos de laboratorio	Tratamiento	Pronóstico
ETAPA I Enfermedad leve	Niveles de Ac negativos o bajos positivos	Signos clínicos leves como linfadenomegalia solitaria o dermatitis papular	Por lo general, no se observan anomalías clínico-patológicas. Perfil renal normal: creatinina <1,4 mg/dl; no proteinúrico: UPC <0,2	Descuido científico **/ seguimiento de la progresión de la enfermedad.	Bueno
ETAPA II Enfermedad moderada	Niveles de Ac positivos bajos a altos	Perros que además de los signos clínicos del estadio I, pueden presentar otros como: lesiones cutáneas difusas o simétricas como dermatitis exfoliativa/onicofrosis, ulceraciones (planum nasale, almohadillas, prominencias óseas, uniones mucocutáneas), linfadenomegalia generalizada, pérdida de apetito y adelgazamiento.	Anomalías clínico-patológicas como anemia leve no regenerativa, hipergammaglobulinemia, hipoalbuminemia, síndrome de hiperviscosidad sérica. Subestado - Perfil renal normal: creatinina < 1,4mg/dl; no proteinúrico: UPC <0,5 - Creatinina <1,4 mg/dl; UPC=0,5-1	Alopurinol + antimonioato de meglumina o miltefosina	Bueno para custodiar
Etapa III Enfermedad grave	Niveles de Ac positivos de medios a altos	Además de los signos clínicos de las etapas I y II, pueden presentar signos originados por lesiones por complejos inmunes (Uveítis y glomerulonefritis)	Anomalías clínico-patológicas enumeradas en el estadio II Enfermedad renal crónica (ERC) IRIS estadio I con UPC=1-5 o estadio II (creatinina 1,4-2 mg/dl)***	Alopurinol + antimonioato de meglumina o miltefosina Siga las pautas IRIS para ERC ****	Protegido a los pobres
Etapa IV Enfermedad muy grave	Niveles de Ac positivos de medios a altos	Con signos clínicos de la etapa III. Tromboembolismo pulmonar o síndrome nefrótico y enfermedad renal en etapa terminal.	Anomalías clínico-patológicas enumeradas en el estadio II CKD IRIS estadio III (creatinina 2,1-5 mg/dl) y estadio IV (creatinina > 5 mg/dl) *** o síndrome nefrótico: proteinuria marcada UPC >5	El tratamiento específico debe instaurarse individualmente. Siga las pautas de IRIS para ERC ****	Pobre

Tabla 2: Estadificación clínica de la LCan basada en el estado serológico, signos clínicos, hallazgos de laboratorio y tipo de terapia y pronóstico para cada etapa clínica. (163)

*Los perros con niveles de Ac negativos a medios positivos deben ser confirmados como infectados con otras técnicas de diagnóstico como citología, histología/inmunoquímica y PCR. Los niveles de anticuerpos son concluyentes de un diagnóstico de LCan y se definen como un aumento de 3 a 4 veces de un límite de referencia de laboratorio bien establecido.

**Es probable que los perros en estadio I (enfermedad leve) requieran un tratamiento menos prolongado con uno o dos fármacos combinados (alopurinol, domperidona, antimonioato de meglumina o miltefosina) o, alternativamente, monitorización sin tratamiento. Existe información limitada sobre perros en esta etapa y, por tanto, quedan por definir las opciones de tratamiento.

<http://iris-kidney.com/guidelines/staging.html>*<http://iris-kidney.com/guidelines/recommendations>.

INTRODUCCIÓN

Las manifestaciones clínicas de la LCan en animales susceptibles dependen de la fase en la que se encuentre la enfermedad. En las fases tempranas pueden observarse únicamente signos clínicos generales, como pérdida de peso, astenia, apatía y adenopatía (78,132,145).

A medida que la enfermedad progresa y se hace patente, puede manifestarse una gran variedad de signos clínicos además de los generales presentes al inicio. Uno de los más comunes es el aumento de tamaño y consistencia de los ganglios linfáticos o linfadenomegalia (78,164). Además, se ha demostrado que casi el 90% de los perros con leishmaniosis patente pueden desarrollar alteraciones cutáneas (165,166). Estas lesiones, raramente pruríticas (167), normalmente aparecen en la cabeza para acabar extendiéndose por todo el cuerpo del animal. Entre las más importantes destacan: alopecia, dermatitis exfoliativa o descamativa, úlceras, onicogriposis e hiperqueratosis (168-170). Además, un porcentaje importante de animales desarrolla alteraciones oculares, siendo las más comunes la queratoconjuntivitis y la uveítis (164,171).

Si la LCan no es diagnosticada y tratada a tiempo, los animales pueden manifestar un marcado deterioro del estado general, emaciación y finalmente caquexia (fase terminal), junto con daños en órganos internos tales como hígado, bazo o riñón, lo que conduce finalmente a la muerte del animal (162,163,172).

Debido a que existen numerosas enfermedades que pueden cursar con sintomatología similar a la producida por la LCan (173), es necesario realizar un diagnóstico diferencial con otras patologías, tales como hepatozoonosis, babesiosis, ehrlichiosis, sarna sarcóptica y demodécica y varios tipos de alergias o tumores (164), aunque es posible que debido al deterioro del sistema inmune del animal aparezcan estas enfermedades de forma concomitante (169,174).

En cuanto a los hallazgos biopatológicos más frecuentes, destaca la disproteinemia, con el aumento de las proteínas totales por hiperglobulinemia (especialmente las γ -globulinas debido a la elevada respuesta inmune humoral producida), e hipoalbuminemia junto con descenso de la ratio albúmina/globulina (97,151,175). En

INTRODUCCIÓN

cuanto a las alteraciones detectadas en los parámetros hematológicos, las observadas con más frecuencia son anemia, trombocitopenia y leucopenia (97,169,172). Por último y debido al posible daño de los órganos internos con el avance de la enfermedad, es necesario el estudio de parámetros hepáticos y renales, puesto que el aumento de enzimas hepáticas, urea y creatinina, así como la presencia de proteinuria podrían ser indicativas de la leishmaniosis (97,163,176).

Otros cambios pueden incluir parámetros bioquímicos tales como leves aumentos en la concentración sanguínea de alanina aminotransferasa, fosfatasa alcalina y gamma glutamiltransferasa, incrementos leves de bilirrubina total y ácidos biliares post-prandiales (indicativo de daño hepático), aumento de las actividades de la creatinina y lactato deshidrogenasa (sugestivo de miositis), aumento de la actividad de la amilasa, hipoglucemia leve, incrementos del colesterol y triglicéridos, hipocalcemia, hipercaliemia o hipocaliemia, disminución de hierro, aumento de la troponina I cardíaca y de las proteínas de fase aguda (proteína C-reactiva, proteína amiloide A y haptoglobina) (177-185). Aunque es importante para la estadificación de la LCan la información del hemograma completo, el perfil bioquímico y el análisis de orina, los resultados reportados pueden ser muy variables e inespecíficos (151-153,170).

1.5.2. Diagnóstico inmunológico

En LV, tanto canina como humana, el parásito genera una fuerte respuesta de anticuerpos (186) que puede detectarse mediante determinadas técnicas de inmunodiagnóstico que varían en sensibilidad y especificidad (187). Este tipo de diagnóstico constituye una valiosa herramienta y se basa en pruebas rápidas y fáciles de usar (188). Además, resulta muy fiable para esta enfermedad, ya que la respuesta inmunológica frente al parásito está prácticamente garantizada transcurridas varias semanas o meses desde que se produce la infección del perro (97,159,189). Esta medida preventiva posibilita una mayor efectividad terapéutica de los medicamentos empleados, los cuales resultarían poco válidos en fases avanzadas de la enfermedad.

INTRODUCCIÓN

Si un animal sospechoso resulta ser positivo, está infectado por *Leishmania*, independientemente de que manifieste o no la enfermedad. Este animal debe ser analizado en profundidad para determinar la existencia o no de daños orgánicos. El hecho de poder determinar los niveles de anticuerpos en sangre, además de brindar una detección precoz y segura de los perros positivos, también permite realizar un seguimiento de los animales tratados. La evidencia de la efectividad terapéutica con leishmanicidas (antimoniato de meglumina, mitelfosina, etc.) se refleja en un descenso de la cantidad de anticuerpos en sangre como consecuencia de la muerte de parásitos (146,190,191).

En la actualidad, la comercialización de vacunas contra la LCan ha suscitado preocupaciones sobre el uso y utilidad de las pruebas serológicas para el diagnóstico, debido a que la administración de una vacuna puede provocar la producción de anticuerpos que podrían detectarse mediante técnicas de diagnóstico serológico estándar y, por tanto, no diferenciar entre animales vacunados o infectados (148,192). El punto más delicado en la práctica clínica consiste en emitir un pronóstico de los perros seropositivos, debido a que un porcentaje indeterminado de animales podría considerarse como población resistente (encontrándose entre ellos formas latentes evolutivas y formas resolutivas o de autocuración) (132,159,193,194). Pese a estos inconvenientes, actualmente las técnicas inmunológicas IFI y ELISA se usan ampliamente como prueba de diagnóstico de primera línea (154,170,195) debido a que han resultado las más eficaces y fiables en estudios seroepidemiológicos, permitiendo conocer la distribución y prevalencia de esta parasitosis (57).

La técnica ELISA fue utilizada por primera vez por Hommel (1976) en la detección de anticuerpos frente a candidiasis y aspergilosis humana (196). Esta técnica permite el análisis de un gran número de muestras con altos niveles de sensibilidad, variando la especificidad en función del antígeno utilizado (187,197). Algunos antígenos han confirmado sus propiedades como una excelente herramienta para el serodiagnóstico de la LCan (145,198,199) como es el caso del antígeno SLA obtenido a partir de

INTRODUCCIÓN

promastigotes de *Leishmania*, que es el más comúnmente utilizado en ELISA, demostrando sensibilidades del 80 a 100% y especificidades del 85 a 95% (188). Sin embargo, debido a la necesidad de personal capacitado y equipo sofisticado, la técnica ELISA no se utiliza en las regiones endémicas para el diagnóstico de LV (187).

Uno de los métodos diagnósticos más antiguos para *Leishmania* es la IFI (200), que continúa siendo una técnica de referencia para el inmunodiagnóstico en la práctica epidemiológica y clínica, debido a su especificidad casi del 100% (no emitiendo falsos diagnósticos positivos) y su sensibilidad superior al 90% (149).

Este método se basa en la detección de anticuerpos, que aparecen en las primeras etapas de la infección y son indetectables de seis a nueve meses después de la curación. Después del tratamiento, niveles bajos de IgG específicas o su descenso (seroconversión negativa) indican el éxito de éste, por lo que esta técnica presenta cierto valor pronóstico en el estudio de los casos de leishmaniosis (187,201-204).

Por otra parte, en los últimos años se han desarrollado kits de diagnóstico rápido basados en técnicas inmunocromatográficas, como el que emplea el antígeno recombinante rK39 en medicina humana, el cual ha mostrado una sensibilidad y especificidad del 100% y 96% respectivamente. Estos kits rápidos tienen a favor la facilidad y rapidez de uso en campo, pero presentan la desventaja de no poder diferenciar entre animales con infección clínicamente activa, asintomáticos o aquéllos con resultado positivo tras la curación (187).

En cuanto al tipo de muestra necesario para los análisis, es conocido que muestras como la saliva pueden representar una alternativa a la sangre por ser fácil de recolectar, indolora y no invasiva en comparación con el suero. Sin embargo, siguen siendo necesarios futuros estudios que evalúen la capacidad de los ensayos inmunológicos para detectar perros con enfermedad subclínica o con bajos títulos de anticuerpos en suero y también para estudiar el comportamiento de los anticuerpos en la saliva durante el tratamiento de LCan (105,206).

INTRODUCCIÓN

1.5.3. Diagnóstico parasitológico

La observación microscópica directa de formas amastigote de *Leishmania* sigue siendo la técnica *gold standard* para confirmar la infección por *Leishmania*, pese a ser una técnica altamente invasiva. Idealmente, todos los casos de leishmaniosis deben confirmarse mediante detección directa de parásitos en preparaciones microscópicas teñidas de muestras de biopsias de piel, aspirados del bazo, médula ósea o ganglios linfáticos (188). De esta forma, se realiza una visualización directa del parásito, obteniendo así una alta especificidad, pero sensibilidad variable, es decir, es una técnica que puede arrojar falsos negativos en función de la muestra empleada, de la carga parasitaria, de la experiencia del citólogo o patólogo y la cantidad de tiempo dedicado a su evaluación (152,170,207,208). 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 técnica de la reacción en cadena PCR (209). Los parásitos del género *Leishmania* presentan un genoma que varía de 29 a 33 Mega bases (Mb) en tamaño, organizado en un número variable de cromosomas, que van de 34 a 36. A pesar de las diferencias biológicas entre las especies de *Leishmania*, incluida su asociación con diferentes manifestaciones clínicas, existe gran similitud entre su genoma (210). *Leishmania*, al igual que otros tripanosomátidos, posee un único orgánulo mitocondrial, el kinetoplasto, que contiene ADN (ADNk) organizado en una gran red de minicírculos concatenados (aproximadamente 1 Kilo bases (Kb) cada uno, con 5×10^3 a 5×10^4 por parásito) y maxicírculo (aproximadamente 23 Kb cada uno), con 20 a 50 moléculas por parásito (211-213). Hasta ahora, se han descrito varias dianas para el diagnóstico molecular de *Leishmania*, siendo el ADNk tanto para ensayos de PCR convencionales como en tiempo real, el más utilizado (173).

El establecimiento de la técnica de PCR como herramienta diagnóstica ha sido lento debido a la dificultad de estandarización, la posibilidad de aparición de falsos diagnósticos y el tipo de muestra empleada, además de los problemas derivados de su elevado coste y dificultad de uso (214). Hoy en día, los métodos moleculares son cada

INTRODUCCIÓN

vez más importantes, especialmente la PCR cuantitativa específica de *Leishmania* (qPCR), que se usa ampliamente debido a su alta sensibilidad (173,215-217).

En 2002, Nicolas y col. desarrollaron un método de PCR en tiempo real altamente sensible y específico que pudo detectar y cuantificar *Leishmania* en tejidos de ratón (208). En los últimos años, los ensayos de PCR en tiempo real para la detección de *Leishmania*, la cuantificación y la identificación de especies han mejorado el análisis de diagnóstico molecular, proporcionando ventajas como una mayor sensibilidad y especificidad y una estandarización más sencilla de los procedimientos de diagnóstico (173,215,219,220).

Muchos autores han publicado trabajos utilizando distintos tipos de muestras (sangre, biopsias de ganglio, bazo, médula ósea, piel, etc.) para el diagnóstico (170,215,217,221,222), incluso se han publicado trabajos en los cuales dicho diagnóstico se basa en la detección del ADN del parásito en muestras categorizadas como no invasivas, como el pelo (27,223-225), o hisopos conjuntivales, nasales u orales (222,226).

1.5.4. Utilidad del papel de filtro en el diagnóstico inmunológico y molecular de enfermedades

Las muestras de sangre recolectadas y absorbidas en papel de filtro tipo Whatman han sido utilizadas desde décadas para el diagnóstico de enfermedades tanto infectocontagiosas como de origen genético (227). Así mismo, este sistema de mantenimiento de muestras sanguíneas permite un gran ahorro de material, facilidad en su traslado a temperatura ambiente y de conservación en refrigeración a largo plazo ya que tanto proteínas (inmunoglobulinas) como ADN permanecen muy estables (228).

En infecciones por virus como Dengue y VIH en humana (229), así como en numerosas enfermedades infecciosas tropicales tanto víricas, bacterianas como parasitarias (227), la utilización de este soporte está muy extendido. En todos los estudios realizados este tipo de soporte para muestras biológicas, especialmente sangre, obtienen resultados

INTRODUCCIÓN

significativamente similares a los obtenidos cuando se utiliza suero en cuanto a sensibilidad, especificidad, valor predictivo e índices de concordancia (227).

Sin embargo, se han revelado problemas importantes con el uso del papel de filtro, el análisis estadístico inapropiado y la falta de metodología estandarizada. El papel de filtro tiene un gran potencial para empoderar a los trabajadores de la salud ya hacen más accesibles las pruebas de diagnóstico de laboratorio, aunque se necesita investigación adicional más rigurosa (227).

En el caso de las leishmaniosis, este sistema ha sido utilizado en LC (170,228,230,231), LMC y LV (232) aplicado para el diagnóstico tanto de casos clínicos como estudios epidemiológicos.

En la especie canina, el Laboratorio de Parasitología de la UEx (LeishmanCeres), lleva años utilizando este sistema de toma de muestras y recolectadas en papel Whatman, tanto en la clínica diaria en el Hospital Clínico Veterinario de la UEx como en estudios epidemiológicos. En este sentido, en la memoria de tesis doctoral presentamos un artículo científico publicado en la revista *Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports* y titulado **“Application of qPCR method to hair and cerumen samples for the diagnosis of canine leishmaniosis in Araçatuba, Brazil”**, el dossier del kit de diagnóstico MultiLeish 5D **“Sistema de diagnóstico múltiple para detección y seguimiento de perros infectados por *L. infantum*”**, basado en estos sistemas de diagnóstico con la utilización de estos soportes para muestras de obtención no invasiva y el artículo publicado en la revista Argos y titulado **“MultiLeish 5D: un novedoso sistema multidiagnóstico fiable de la leishmaniosis canina con valor pronóstico”**. Así, con el primer trabajo, demostramos la fiabilidad de este sistema sobre una población de perros infectados de forma natural por *L. chagasi* (sin. *L. infantum*) en Brasil. Su utilidad en cuanto al diagnóstico de la LCan es idéntica a la obtenida con sangre fresca y suero sanguíneo, tanto en el diagnóstico inmunológico para la detección de anticuerpos como en el molecular por qPCR para la detección del ADNk circulante de este parásito.

INTRODUCCIÓN

1.5.5. Validación de técnicas aplicadas al diagnóstico

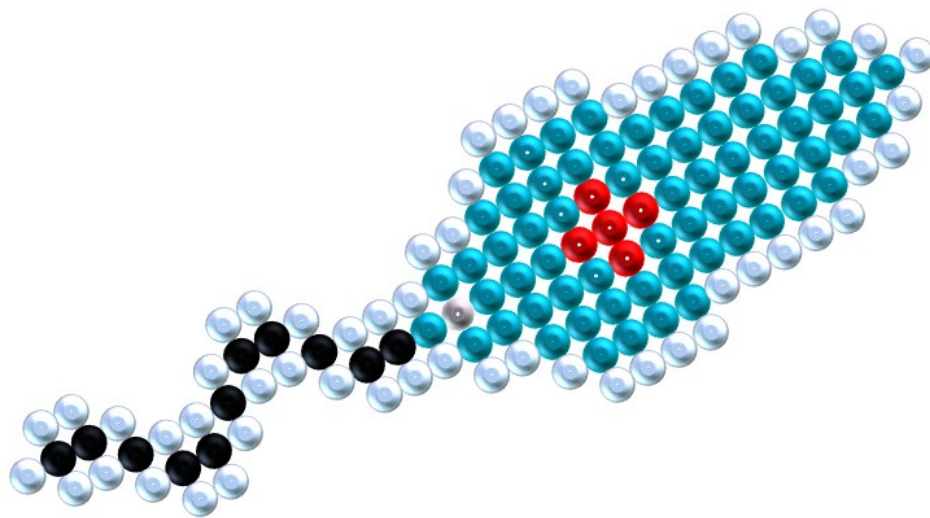
Finalmente, respecto a la validación de técnicas aplicadas al diagnóstico de la leishmaniosis, al igual que como para el de cualquier otro agente infectocontagioso, los resultados analíticos deben asegurar el máximo nivel posible de fiabilidad permitido por el desarrollo científico y técnico, con el fin de que los resultados puedan ser comparables entre laboratorios. En este sentido, el uso de métodos de referencia reconocidos y aceptados es la herramienta más eficaz para la consecución de estas garantías (233).

En el caso de la LCan, las técnicas de inmunodiagnóstico cuantitativo (IFI, ELISA) a partir de muestras de sangre y la detección parasitaria o de su ADN a partir de muestras de piel o de órganos linforreticulares como médula ósea y ganglio linfático son las más sensibles y permiten servir de patrones de referencia para el desarrollo de nuevos diagnósticos con diferentes muestras biológicas. Este es el caso de los artículos en los que también hemos participado (27,100,223,224,234) y en los que, utilizando estas técnicas y muestras de referencia validadas en la presente tesis doctoral, hemos conseguido controles fiables (positivos y negativos) de la LCan que puedan servir para el desarrollo de nuevos sistemas de diagnóstico usando tales muestras no invasivas, tales como pelo, hisopados dermomucosos, etc.

Debido al gran desarrollo y actualización de técnicas, equipos analíticos y al interés de los profesionales en garantizar la calidad de los procesos y los resultados, las actividades relacionadas con la verificación y la validación de métodos analíticos es hoy día de gran importancia (233). En el caso de la LCan, se deben usar ensayos simples y estándares para monitorizar perros en áreas endémicas o perros que visiten estas áreas para verificar si ha ocurrido una infección y se puede desarrollar una enfermedad clínica. Finalmente, se requiere investigación adicional para determinar cómo controlar a los perros bajo tratamiento y qué resultados de las pruebas indican una remisión estable y libre de enfermedad o la eliminación de la infección.

INTRODUCCIÓN

Utilizando estas técnicas estandarizadas y validadas, conseguimos unos certeros patrones de poblaciones positivas y negativas frente a *L. infantum* que sirvan para el desarrollo de nuevos sistemas de diagnóstico tales como son el uso de muestras no invasivas reflejadas en este trabajo.



OBJETIVOS

2. OBJETIVOS Y JUSTIFICACIÓN

El desarrollo de la presente tesis doctoral ha girado en torno a la consecución de dos objetivos generales con sus respectivos objetivos específicos y de acuerdo con los Procedimientos Normalizados de Trabajo disponibles en el Laboratorio LeishmanCeres y a las Buenas Prácticas de Laboratorio (BPL) definidas en:

- REAL DECRETO 1369/2000, de 19 de julio, por el que se modifica el Real Decreto 822/1993, de 28 de mayo, por el que se establecen los principios de buenas prácticas de laboratorio y su aplicación en la realización de estudios no clínicos sobre sustancias y productos químicos (235).
- Directiva 2004/10/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 11 de febrero de 2004, sobre la aproximación de las disposiciones legales, reglamentarias y administrativas relativas a la aplicación de los principios de buenas prácticas de laboratorio y al control de su aplicación para las pruebas sobre las sustancias químicas (236).

A continuación, se expone cada uno de los objetivos y se justifica la idoneidad y el aporte científico que se pretende conseguir.

El primer objetivo general planteado es **validar técnicas estandarizadas en el laboratorio, aplicadas al diagnóstico de la leishmaniosis canina**, incluyendo los métodos inmunológicos ELISA SLA IgG2 e inmunofluorescencia indirecta (IFI) y el método parasitológico molecular Real Time PCR o qPCR, considerando los siguientes objetivos específicos:

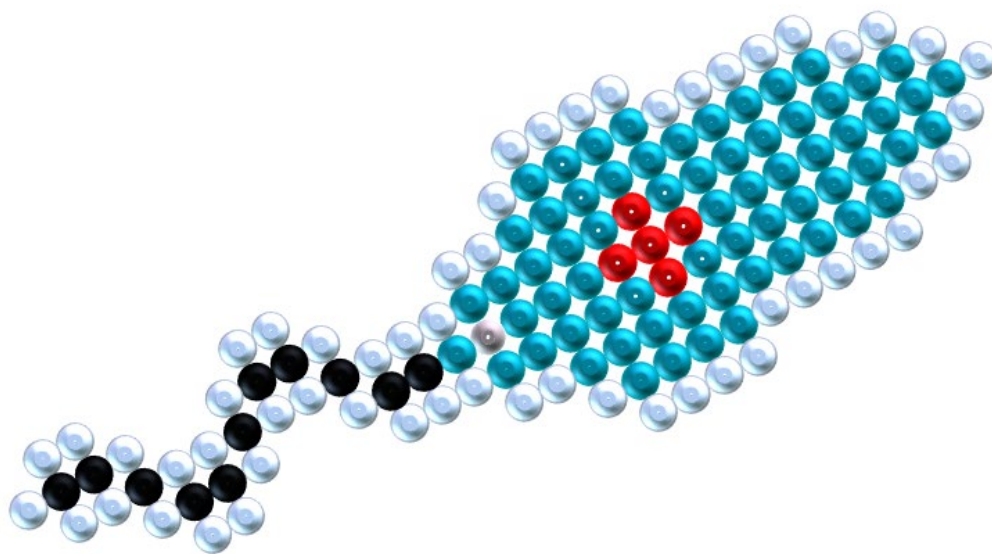
- Validar el método inmunoenzimático ELISA frente a antígeno total soluble (SLA) mediante la investigación de seis atributos: linealidad, especificidad, sensibilidad, precisión (precisión instrumental, repetibilidad y precisión intermedia), robustez y estabilidad, utilizando muestras de suero sanguíneo.

OBJETIVOS Y JUSTIFICACIÓN

- Validar el método IFI mediante la investigación de cinco atributos: especificidad, sensibilidad, precisión (repetibilidad y precisión intermedia), robustez y estabilidad, utilizando muestras de suero sanguíneo.
- Validar el método qPCR mediante la investigación de nueve atributos: linealidad, exactitud, especificidad, sensibilidad, precisión (precisión instrumental, repetibilidad y precisión intermedia), límite de detección, límite de cuantificación, robustez y estabilidad, utilizando muestras de médula ósea y ganglio linfático.

Gracias a la consecución de los objetivos específicos anteriormente descritos, y empleando estos estándares, como métodos de referencia, nos planteamos como segundo objetivo general **desarrollar un sistema de diagnóstico múltiple de la leishmaniosis canina**, utilizando otras muestras biológicas y soportes, para ofrecer al veterinario clínico una herramienta fiable que en su trabajo diario permita un diagnóstico precoz, facilite el seguimiento y monitorización tras el tratamiento y que, además, sirva como punto de partida para la profilaxis, permitiendo descartar con seguridad la presencia de parásitos en perros sanos. Para ello, se han planteado los siguientes objetivos específicos:

- Analizar muestras no invasivas de perros portadores de *Leishmania* como son el pelo, y las obtenidas mediante hisopado (cerumen, mucosas y piel) mediante la técnica qPCR para su uso en el diagnóstico de esta enfermedad.
- Desarrollar de un sistema de diagnóstico múltiple (MultiLeish 5D), de tipo inmunológico y molecular, mediante el uso de muestras de sangre seca adherida a papel *Whatman*, muestras de pelo y las obtenidas a través de hisopos.



MATERIAL Y MÉTODOS

3. MATERIAL Y MÉTODOS

A continuación, se describe el material y la metodología utilizada para dar respuesta a el primer objetivo general planteado “**validar técnicas aplicadas al diagnóstico de la leishmaniosis canina, incluyendo los métodos inmunológicos ELISA SLA IgG2 e IFI y el método parasitológico molecular Real Time PCR o qPCR**”, detallando las instalaciones en las que se ha llevado a cabo el estudio, los animales utilizados para la obtención de muestras y el procesado de estas, el material y reactivos necesarios para llevar a cabo los análisis de cada una de las técnicas aplicadas tratando detenidamente la metodología, el diseño del estudio, los criterios de aceptación y el análisis de los datos que se llevó a cabo.

3.1. Instalaciones

La Facultad de Veterinaria de la Universidad de Extremadura en Cáceres cuenta con el Laboratorio LeishmanCeres, un equipo científico dedicado desde hace años a la investigación y desarrollo de estudios sobre la LCan en diferentes campos del conocimiento, tales como epidemiología (reservorios y vectores), patología, biología celular y molecular, así como en el desarrollo de diferentes técnicas de diagnóstico.

Las instalaciones de LeishmanCeres, tanto el Laboratorio como del Bioterio de perros, tienen certificación de cumplimiento de las BPL, emitido por la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS), la cual permite que desde el año 2008 se lleven a cabo estudios de farmacodinamia, farmacología de seguridad y estudios de inmunogenicidad de medicamentos de acuerdo con el Artículo 2.2. de la Directiva 2004/9/CE del Parlamento Europeo y del Consejo de 11 de febrero de 2004 relativa a la inspección y verificación de las buenas prácticas de laboratorio (236).

MATERIAL Y MÉTODOS

3.1.1. Laboratorio

El laboratorio LeishmanCeres pertenece a la Unidad de Parasitología y Enfermedades Parasitarias del Departamento de Sanidad Animal de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Extremadura (PARUEX). Cuenta con diferentes salas en las que se ubican los aparatos y equipos necesarios para la realización de los análisis de validación de las técnicas ELISA SLA IgG2, IFI y qPCR, verificados y calibrados conforme a la normativa. Del mismo modo, el laboratorio cuenta con zonas de trabajo específicas para los distintos análisis biopatológicos, inmunológicos y parasitológicos.

3.1.2. Bioterio de perros

El Bioterio de perros experimentales utilizados en este estudio, es una instalación que se rige conforme a las directrices europeas (237) y nacionales (238,239) acerca del cuidado y uso de animales de experimentación, además de haber obtenido el certificado BPL.

Se encuentra situado en el Servicio de Animalario de la Universidad de Extremadura. Tiene un sistema de climatización que regula la temperatura, humedad, las renovaciones de aire necesarias y los ciclos de luz de forma óptima, y además cuenta con un sistema de seguridad a través de sensores de movimiento, cámaras de video vigilancia y un sistema codificado de alarma.

Está compuesto por un área de cuarentena y dos de aislamiento que permiten alojar perros de ambos sexos por separado. Cada área cuenta con 8 boxes y un patio de recreo interior que cumplen con la normativa de Bienestar Animal en cuanto a las medidas de este tipo de instalaciones, Real Decreto 53/2013, de 1 de febrero, por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia (239) y Directiva 2010/63/UE relativa a la protección de los animales utilizados para fines científicos (237). Además, cuenta con patios de recreo exteriores, una sala de

MATERIAL Y MÉTODOS

actuaciones clínicas, vestuario, aseo y almacenes, tanto para la comida de los animales, como para el material de limpieza y mantenimiento de las instalaciones.

Anualmente se solicitan los certificados de análisis del agua y del pienso que consumen los animales, debiendo reflejar todos ellos unos valores correctos.

3.2. Procedimientos y registros

Debido a que el Laboratorio funciona bajo la normativa BPL, éste cuenta con una serie de Procedimientos Normalizados de Trabajo (PNT) que describen con detalle los aspectos generales de dicho Laboratorio, así como las técnicas de análisis o las actuaciones clínicas, entre otros. Esta normativa, a su vez, exige un sistema completo de registro y archivo que refleje todas y cada una de las actividades llevadas a cabo, tanto en el Laboratorio como en el Bioterio.

3.3. Muestras empleadas

3.3.1. Obtención, procesado y almacenamiento

Todas las muestras biológicas empleadas (sangre, suero, y biopsias de ganglio linfático y médula ósea fueron debidamente obtenidas, identificadas, conservadas y almacenadas en el archivo histórico del Laboratorio LeishmanCeres bajo normativa BPL, para así permitir la continuidad de las investigaciones en el desarrollo de nuevas metodologías diagnósticas. A continuación, se describen los procedimientos para la toma de muestras utilizadas en el estudio de validación.

3.3.1.1. Suero sanguíneo

Como se muestra en la Figura 14, las extracciones de sangre se realizaron a través de la punción de la vena cefálica anterior, tras previa ingurgitación de esta y desinfección de la zona con gasa y etanol al 70%, obteniéndose aproximadamente 5 ml de volumen de sangre entera que se depositó en un tubo seco (sin anticoagulante) y se centrifugó a 2500 revoluciones por minuto (rpm) durante 10 minutos y a una temperatura de 4° C para la obtención de suero.

MATERIAL Y MÉTODOS



Figura 14: Obtención de muestras de sangre

Posteriormente las muestras de suero se almacenaron debidamente identificadas a -80°C en alícuotas de 100µl para emplearse en los análisis inmunológicos ELISA SLA IgG2 e IFI.

3.3.1.2. Médula ósea

Las muestras de médula ósea se obtuvieron por punción y aspiración esternal. El procedimiento se realiza con el perro en posición sentada, el pecho recto y con las patas delanteras abiertas y se localiza el mango del esternón, que queda bajo la línea de los codos, donde se llevará a cabo la punción (Figura 15). Se desinfecta la zona con gasa y etanol al 70% y se introduce una aguja (18G o 20G) realizando un movimiento circular para que el bisel de ésta atraviese el periostio. Una vez que la aguja quede fijada en el mango del esternón, se acopla a ella una jeringa de 5 ó 10 ml (en función del tamaño del perro) y se procede a aspirar muy suavemente. Una vez hecho esto, el conjunto aguja-jeringa se retira con un movimiento rápido y se desinfecta la zona de punción con alcohol al 70%.

Posteriormente, la muestra se introdujo en un tubo con anticoagulante ácido etilendiaminotetraacético k3 (EDTA k3), agitando suavemente y rotando el tubo para mezclar bien el contenido y evitar la formación de coágulos. Se identificó debidamente

MATERIAL Y MÉTODOS

dicho tubo y se introdujo en un recipiente isotermo con un bloque de refrigeración para su posterior procesado en el laboratorio.



Figura 15: Obtención de muestras de médula ósea.

El procesado de las biopsias de médula ósea se realizó en una cabina de descontaminación, dividiendo el contenido del tubo en alícuotas de 50 μ l cada una, que fue el volumen final empleado en cada extracción. Las alícuotas se guardaron en microtubos, correctamente identificadas, a -80°C hasta el momento de la extracción del ADN.

3.3.1.3. Ganglio linfático

Las muestras de ganglio linfático se obtuvieron mediante biopsia por aspiración con aguja fina (0,9x25mm). La idoneidad del ganglio para punción se determinó a través de exploración externa y palpación de los nódulos linfáticos superficiales y en función de su tamaño, dolor a la palpación, facilidad de acceso y fijación.

La zona de punción se desinfectó con alcohol al 70% para, una vez fijado el ganglio con la piel bien tensa, introducir la aguja en un acto rápido hasta el centro de la masa ganglionar. Con movimientos circulares se consigue la rotura parcial del tejido ganglionar y mediante aspiración se recogió el material linfático en la jeringa tal y como se muestra en la siguiente figura.



Figura 16: Obtención de biopsia de ganglio linfático.

A continuación, el contenido de la jeringa se resuspendió y homogeneizó en 1 ml de solución salina tampón de fosfato (PBS estéril) y se almacenó en alícuotas de 100 μ l debidamente identificadas a -80°C, que fue el volumen empleado en cada extracción. Este tipo de muestra no permitió normalizar la cuantificación de parásitos, debido a que no se conoce con exactitud la cantidad de muestra de partida.

3.3.2. Consideraciones éticas

Las muestras utilizadas en todos los ensayos de validación llevados a cabo en el presente trabajo procedían de proyectos de investigación previamente realizados por el Grupo LeishmanCeres, los cuales fueron presentados y aprobados por el correspondiente Comité de Bioética de Experimentación Animal de la Universidad de Extremadura.

Posteriormente, dicho Comité y conforme a las consideraciones éticas que se ajustan a la normativa vigente al efecto, evaluó positivamente el empleo de dichas muestras para el desarrollo del procedimiento experimental de la presente tesis doctoral.

MATERIAL Y MÉTODOS

3.4. Métodos analíticos validados

A continuación, se describe el material y la metodología empleada para dar respuesta a los objetivos específicos que plantearon el estudio de diferentes atributos para los métodos diagnósticos inmunológicos ELISA SLA IgG2 e IFI y el método parasitológico molecular Real Time PCR o qPCR.

Para ello se han seguido las recomendaciones propuestas por las siguientes entidades:

- **Ecole nationale de la santé publique (EHESP).**
**Guide de validation analytique (240).*
- **European Medicines Agency (EMA).** Comité de Medicamentos de Uso Humano (CHMP).
**ICH Topic Q2 (R1) Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology. (CPMP/ICH/381/95), 1995. (214)*
**ICH Topic Q2 (R1). Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology. (EMEA/CHMP/EWP/192217/200). 2005.*
Guideline on Bioanalytical Methods Validation. Guideline EMEA/CHMP/EWP/192217/200, 2005. (242)
- **Farmacopea de Estados Unidos (USP)**
**General Chapters <1225>: Validation of Compendial Methods (243).*
- **Department of Health and Human Services Food and Drug Administration (FDA).**
**Guidance for Industrie: Analytical Procedures and Methods Validation (244).*
- **Instituto Nacional de Tecnología Industrial (INTI)**
**Requerimientos sobre Validación de Métodos en el marco de la Acreditación de Laboratorios según la norma ISO 17025 (245).*
- **Thermo Fisher Scientific.**
**Cell lysis technical Handbook (246).*

MATERIAL Y MÉTODOS

3.4.1. ELISA SLA IgG2

3.4.1.1. Muestras empleadas

La validación de la técnica **ELISA SLA IgG2** se llevó a cabo utilizando muestras de **suero** procedentes de **116 animales** (Tabla 3). Los animales se agruparon según positividad o no a *L. infantum* confirmada mediante otra técnica inmunológica (IFI) y parasitológica (qPCR de médula ósea).

GRUPO	Características	Nº de animales	Codificación*	Criterios de inclusión
G1-SLA	(-) Experimentales	30	G1-1/30-SLA	Confirmados por IFI y qPCR
G2-SLA	(-) Naturales	30	G2-1/30-SLA	
G3-SLA	(-) Otras Patologías	10	G3-1/10-SLA	
G4-SLA	(+) Experimentales	20	G4-1/20-SLA	
G5-SLA	(+) Naturales	30	G5-1/30-SLA	
G6-SLA	(+) Naturales	4	G6-1-SLA G5-27-SLA	Confirmado por IFI y qPCR Alta reactividad (D.O. > 0,80)
			G6-2-SLA G5-28-SLA	Confirmado por IFI y qPCR Reactividad media (D.O. 0,61-0,80)
			G6-3-SLA	Confirmado por IFI y qPCR Baja reactividad (D.O. 0,41 - 0,60)
	(-) Naturales		G6-4-SLA G2-5-SLA	Confirmado por IFI y qPCR (D.O. hasta 0,4)
CONTROL GC-SLA	(+) Naturales	1	GC(+)-SLA	Alta respuesta de anticuerpos IgG2 anti SLA
	(-) Experimentales	1	GC(-)-SLA	Confirmado por IFI y qPCR

Tabla 3: Clasificación y codificación de los animales y muestras utilizadas para la validación de la técnica ELISA SLA.

(-) **Experimentales:** perros de raza Beagle sanos, mantenidos en condiciones experimentales

(-) **Naturales:** perros sanos de cualquier raza, sexo y edad procedentes de propietarios particulares y protectoras.

(-) **Otras Patologías:** perros de cualquier raza, sexo y edades procedentes de propietarios particulares con resultado negativo a *L. infantum*, y que padecían otras patologías.

(+) **Experimentales:** perros de raza Beagle mantenidos en condiciones experimentales, confirmados como positivos a *L. infantum*.

(+) **Naturales:** perros de cualquier raza, sexo y edades procedentes de propietarios particulares con resultado positivo a *L. infantum*.

* Codificación de las muestras: grupo al que pertenece-nºanimal-técnica validada.

MATERIAL Y MÉTODOS

3.4.1.2. Material y reactivos

Los materiales empleados en la validación del método ELISA SLA IgG2 fueron: Placas de 96 pocillos de alta afinidad (Costar, ref.: 2592), microtubos de 1,5 ml para diluciones (Deltalab, ref.: 200400P) y puntas de pipetas (Deltalab, ref.:200012 y ref.: 301-11n1 y Eppendorf, ref.: 0030000897).

Los reactivos y soluciones se describen de forma más detallada a continuación:

Reactivos empleados para el tapizado de placas:

- *Antígeno SLA* para tapizado (cultivo propio), obtenido según el Procedimiento de Trabajo PT. IAg.01 del Laboratorio LeishmanCeres.
- *Solución diluyente/lavado tamponada*: PBS 1X (0.01M, pH 7,2-7,4), obtenido mediante la dilución 1:10 con agua destilada PBS 10X compuesto por:
 - NaCl (Panreac, ref.: 141659) 174g
 - Na₂HPO₄ 2H₂O (Panreac, ref.: 142507) 32,28g
 - Na H₂PO₄ 1H₂O (Panreac ref.: 141965) 6g
 - Agua destilada (Adesco) 2000ml
- *Solución bloqueante* al 5% constituida por:
 - PBS1X +Tween 20 (Panreac, ref.: 162312) al 0.05% 95%
 - Leche en polvo desnatada comercial (Sveltesse NESTLÉ) 5%

Reactivos empleados para el desarrollo del método

- *Solución diluyente/lavado tamponada* PBS 1X (0,001 M, Ph 7,2) + Tween 20 al 0.05% (v/v).
- *Anticuerpo secundario (conjugado)*: Sheep anti-Dog IgG2-PO (Bethyl Lab, ref.: A40-121P)
- *Solución cromatógena o sustrato*:
 - X mg de OPD en tabletas (diclorhidrato de o-fenilendiamina) (Sigma, ref.:P1063-100TAB).

MATERIAL Y MÉTODOS

- X/2 ml de Tampón Citrato- Fosfato de PH 4,90-5,20, conservado a 4°C de elaboración propia a partir de:
 - Ácido cítrico 1H₂O (Panreac, ref.: P1063-100TAB) 5,85g
 - Na₂HPO₄ 2H₂O (Panreac ref.: 152507) 11,07g
 - Agua destilada (Adesco) 1000ml
- X/2 µL (aproximadamente siempre se añaden 10-12 µl más para que la reacción colorimétrica se produzca con mayor rapidez) de H₂O₂ de 10 volúmenes, que se añade justo en el momento de su utilización.
- *Solución de parada*: Ácido Sulfúrico 3N, elaborado con:
 - H₂SO₄ 95-98% (Panreac, ref.: 141058.1211) 80ml
 - Agua destilada (Adesco) 420ml

3.4.1.3. Aparatos y equipos

Los análisis inmunológicos mediante la técnica ELISA SLA IgG2 fueron llevados a cabo con los equipos que se muestran en la siguiente Tabla.

NOMBRE DEL EQUIPO	CÓDIGO DE IDENTIFICACIÓN	NÚMERO DE SERIE
Agitador Magnético FB15001	212-AM (II)	169017
Agitador Orbital Shaker 4518	212-AO	16505-562
Agitador Vortex ZX3 VELP Scientifica	212-AV	102282
Balanza Electrónica Nahita 5022	212-BA	A58390
PH-Metro Cole Parmer AB15 Plus	212-PH	AB92327157
Juego de Pipetas 1	212-P ₁₀	2996826
	212-P ₁₀₀	331806
	212-P ₂₀₀	2846716
	212-P ₁₀₀₀	2057996
	212-P _{MC}	2940956
Juego de Pipetas 2	212-P _{10(II)}	3285041
	212-P _{100(II)}	4173728
	212-P _{200(II)}	4180158
	212-P _{1000(II)}	4365361
	212-P _{MC(III)}	1357333
Lavador Placas ELISA 96 PW-TECAN	212-LAE	906003601
Lector de Placas ELISA Sunrise (TECAN)	212-LEE	901004966

Tabla 4: Equipos utilizados para la Validación de la técnica ELISA SLA IgG2.

MATERIAL Y MÉTODOS

3.4.1.4. Desarrollo del método ELISA SLA IgG2

Este método estándar del laboratorio en el diagnóstico inmunológico de la leishmaniosis en perros está basado en la detección de anticuerpos IgG2 frente al antígeno total soluble (SLA) de *Leishmania infantum* en muestras de suero caninas.

Antes de describir el método utilizado, es importante destacar que la **obtención del antígeno SLA** para el **tapizado de placas** se realizó según el Procedimiento Normalizado de Trabajo (PNT) PT. IAg.01 del Laboratorio LeishmanCeres, partiendo de promastigotes (MCAN/ES/1996/BCN150, zymodema MON-1), procedentes de cultivos propios. Los promastigotes se sometieron a varios procesos de lavado y el pellet celular obtenido se sometió a ciclos alternos de sonicación directa hasta obtener la lisis completa. El contenido proteico de la solución se determinó mediante el método de Bradford, siguiendo el proceso descrito en el PT. IAg.05 y finalmente, las placas de alta afinidad se tapizaron con el antígeno SLA obtenido, a una concentración de 8µg/ml y guardadas a -80°C hasta su uso.

A continuación, se describe el método utilizado para el **tapizado de las placas**, que consistió en:

- Placas ELISA de 96 pocillos, se incubaron durante 3 horas a 37°C y 75rpm 100µl de PBS con una concentración de 8µl/ml de antígeno SLA.
- Se lavaron las placas utilizando la solución de lavado en el equipo 212-LAE.
- Posteriormente se añadieron 200µl de solución de bloqueo a cada pocillo.
- Se incubó de nuevo durante 35 minutos a 37°C y 75 rpm para posteriormente lavar como se ha descrito anteriormente.
- Por último, las placas se guardaron a -80°C hasta su uso, identificándolas previamente con el antígeno y concentración de tapizado y fecha de esta.

A continuación, se describe el **método utilizado para el análisis de muestras y controles de suero** mediante la técnica ELISA SLA IgG2, reflejado en el PNT con código PT.IH.01 del Laboratorio LeishmanCeres.

MATERIAL Y MÉTODOS

- Se descongela a temperatura ambiente las placas tapizadas con SLA necesarias para la prueba.
- Se completa el esquema de distribución de la placa según indica la Tabla 5, de acuerdo con la cantidad de muestras a analizar y teniendo en cuenta que:

*Para cada muestra de ensayo se realizan dos replicados y por tanto se utilizan dos pocillos.

*Para verificar que todos los pasos del método se han llevado a cabo correctamente, es necesario incluir en el ensayo:

- **Un blanco (control de reactivos o control de conjugado)** que ocupará una columna de 8 pocillos. En este caso se dispensa PBS 1x en lugar de añadir muestra.
- **Un control positivo con referencia GC(+) SLA**, que consiste en suero procedente de un perro naturalmente infectado por *Leishmania infantum* con alta respuesta de anticuerpos IgG2 anti SLA, que se dispensa en 4 pocillos.
- **Un control negativo con referencia GC(-)SLA**, que consiste en suero de un *pool* de muestras de perros Beagle sanos no infectados por *Leishmania infantum*, procedentes de ensayos experimentales, y que también se dispensa en otros 4 pocillos.

Se utilizaron los mismos durante todo un estudio para garantizar el funcionamiento del método y la reproducibilidad de la técnica.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Muestra 1										GC(+)SLA	Blanco
B	Muestra 2										GC(+)SLA	Blanco
C											GC(+)SLA	Blanco
D											GC(+)SLA	Blanco
E											GC(-)SLA	Blanco
F											GC(-)SLA	Blanco
G											GC(-)SLA	Blanco
H									Muestra 40		GC(-)SLA	Blanco

Tabla 5: Esquema de distribución de las muestras en la placa ELISA.

MATERIAL Y MÉTODOS

- Se colocan en una gradilla los microtubos necesarios para la distribución de las muestras de suero y diluirlas en PBS1X - 0.05% de Tween 20. Se emplea una concentración de 1/200, dispensando 5µl de muestra en 995µl de diluyente.
- Se dispensa en cada pocillo 100 µl de la dilución correspondiente de muestra, siguiendo el esquema de distribución representado en la Tabla 5.
- Se incuban las placas a 37°C y 75 rpm durante 35 minutos en el agitador orbital.
- Se lavan las placas con la solución de lavado, usando el equipo automático 212-LAE que realiza tres lavados consecutivos. Para asegurar que todos los pocillos están completamente secos al final de lavado, agitar vigorosamente las placas contra un papel de filtro colocado encima de la mesa de trabajo.
- Se añade a cada pocillo 100 µl de conjugado.
- Se incubar nuevamente durante 35 minutos a 37°C y 76 rpm y lavar como ya se ha descrito previamente.
- Se preparar la solución cromatógena o sustrato inmediatamente antes de usarlo y añadir 100 µl a cada pocillo. En presencia de la peroxidasa que contiene la solución cromatógena, los pocillos positivos se colorean de amarillo con una intensidad proporcional a la cantidad de anticuerpos unidos al antígeno.
- La placa se examina periódicamente y se detiene la reacción añadiendo 50 µl de solución de parada a cada pocillo cuando la Densidad Óptica (D.O.) de los controles sea aproximadamente 1. Para poder detener la reacción en ese momento debe leerse la placa previamente a una longitud de onda de 450nm y verificar que la media de los GC(+)/SLA están entre 0.3-0.4 y que la D.O. de los GC(-)/SLA no es mayor que 0.150. Cuando se para la reacción los pocillos tornan a un color anaranjado, con una intensidad proporcional a la cantidad de anticuerpos fijados al antígeno.
- La lectura de los resultados con espectrofotómetro se realiza a una longitud de onda de 492nm y se anotan los aparatos y equipos utilizados en su correspondiente libro de registro y la prueba inmunológica en el libro de registro de resultados.

MATERIAL Y MÉTODOS

- Se guarda la tabla de identificación de las muestras junto con el documento y los datos primarios de D.O. impresos por el espectrofotómetro.
- Por último, los resultados se revisan por una segunda persona para aprobar o invalidar los resultados dependiendo del cumplimiento de los criterios de aceptación.

Criterios de aceptación de placa

Para que un ensayo de ELISA SLA IgG2 sea aceptado como válido, la placa leída a una longitud de onda de 492 nm debe ajustarse a los siguientes criterios de aceptación:

- *Media de los Controles Positivos:* D.O. ≥ 0.8
- *Media de los Controles Negativos:* D.O. $\leq 33\%$ de la media de los controles positivos.
- *Media de los Controles de Conjugado (blancos):* D.O. ≤ 0.2

Para aceptar los resultados de cada una de las muestras problema, sus duplicados deben ser similares, calculando la diferencia como porcentaje a partir de la siguiente ecuación:

$$\text{Diferencia} = [X1 - X2] / [(X1 + X2) / 2] \times 100$$

Para aceptar el resultado la diferencia debe ser:

- $\leq 35\%$ para D.O. $> 0,6$
- $\leq 40\%$ para $0,3 < \text{D.O.} \leq 0,6$
- $\leq 45\%$ para D.O. ≤ 0.3

Expresión de resultados

Todos los resultados de D.O. obtenidos mediante esta técnica son expresados y como valores normalizados, es decir, reactividad de cada muestra respecto al control positivo.

La normalización de cada uno de los valores se realiza mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Valor normalizado} = \frac{\text{Media de la D.O. de los duplicados de la muestra}}{\text{Media de los valores de D.O. de los controles positivos}}$$

MATERIAL Y MÉTODOS

Clasificación de las muestras

Para clasificar las muestras fue necesario definir un punto de corte o *cut-off*.

- En el caso en el que la técnica se emplee en algún estudio como método diagnóstico, el *cut-off* se establece a partir de la densidad óptica media de la población de estudio al inicio de este (día 0). Las muestras cuyo resultado es superior al *cut-off* se clasifican como positivas y las muestras con resultado igual o inferior al *cut-off* se clasifican como negativas.
- En el caso de que la técnica se emplee para el diagnóstico de casos individuales que no pertenecen a estudios, se establece como *cut-off* el valor de la media de los controles negativos de la placa más tres veces su desviación estándar (DE). Las muestras cuyo resultado es superior al *cut-off* se clasifican como positivas y las muestras con resultado igual o inferior al *cut-off* como negativas. De esta forma, y según las propiedades de la distribución normal, estamos aplicando un nivel de confianza mayor o igual al 99% a la hora de realizar la clasificación.

3.4.1.5. Diseño del protocolo de validación

A continuación, se describe el procedimiento experimental que se llevó a cabo para determinar cada uno de los parámetros estudiados en la validación de la técnica ELISA SLA IgG2. En la Tabla 6 se reflejan los parámetros analizados y las muestras empleadas para cada uno de los ensayos.

MATERIAL Y MÉTODOS

GRUPO DE ANIMALES	Características	Linealidad Rango	Especificidad	Sensibilidad	Precisión	Robustez	Estabilidad
					Instrumental Repetibilidad Intermedia		
G1-SLA	(-) Experimentales		X				
G2-SLA	(-) Naturales		X				
G3-SLA	(-) Otras Patologías		X				
G4-SLA	(+) Experimentales			X			
G5-SLA	(+) Naturales			X			
G6-SLA	(+) Naturales				X	X	X
		X 6-2-SLA			X	X	X
					X	X	X
	(-) Naturales				X	X	X
CONTROLES (GC-SLA)	(+) Naturales	X	X	X	X		
	(-) Experimentales	X			X		

Tabla 6: Parámetros analizados y grupos de animales utilizados para la validación del método ELISA SLA.

(-) **Experimentales:** perros de raza Beagle sanos, mantenidos en condiciones experimentales

(-) **Naturales:** perros sanos de cualquier raza, sexo y edad procedentes de propietarios particulares y protectoras.

(-) **Otras Patologías:** perros de cualquier raza, sexo, edades procedentes de propietarios particulares con resultado negativo a *L. infantum*, y que padecían otras patologías.

(+) **Experimentales:** perros de raza Beagle mantenidos en condiciones experimentales, confirmados como positivos a *L. infantum*.

(+) **Naturales:** perros de cualquier raza, sexo, edades procedentes de propietarios particulares con resultado positivo a *L. infantum*.

* Codificación de las muestras: grupo al que pertenece-nº animal-técnica validada.

A. Linealidad y Rango

Este parámetro determina el rango dentro del cual existe una **relación lineal entre la concentración de anticuerpos del suero y la D.O. obtenida**, para así asegurar que, dentro de ese rango lineal, los resultados obtenidos son proporcionales a la concentración de IgG2 de las muestras. La estimación de este parámetro se realiza a

MATERIAL Y MÉTODOS

partir del análisis de resultados obtenidos a partir de un número determinado de diluciones seriadas (242).

El **procedimiento experimental** llevado a cabo para la realización de las 16 diluciones seriadas de suero para una de las muestras consideradas (Tabla 6): 1/25, 1/50, 1/100, 1/200, 1/400, 1/800, 1/1.600, 1/3.200, 1/6.400, 1/12.800, 1/25.600, 1/51.200, 1/102.400, 1/204.800, 1/409.600, 1/819.200 para lo cual se realiza lo siguiente:

- Se Dispensa, en los correspondientes pocillos de la placa, para la primera dilución 1/25, 192µl de solución de lavado (PBS1X + Tween), a los que se leañaden 8µl de suero, para obtener un volumen total de 200µl.
- En los restantes pocillos, se dispensa 100µl de solución de lavado (PBS 1X + Tween).
- Se homogeiniza con la pipeta multicanal los pocillos de la primera dilución (1/25) y se aspiran 100µl. Estos 100µl se homogeinizan con los pocillos siguientes para hacer una dilución doble, y así sucesivamente hasta llegar a la última (1/819.200), en la que los últimos 100µl que quedan en la pipeta se desechan.

Para la realización de este ensayo se utilizaron las siguientes muestras:

- **Suero control positivo GC(+)-SLA:** muestra de un perro infectado naturalmente por *L. infantum* con alta reactividad.
- **Suero control negativo GC(-)-SLA:** muestra procedente de un *pool* de sueros de perros Beagle experimentales de un perro sanos, no infectado por *L. infantum*.
- **Suero positivo con una reactividad intermedia baja 6-2-SLA:** muestra de un perro infectado experimentalmente por *L. infantum*.

Para cada uno de los niveles o diluciones se realizan 5 replicados y cada uno de ellos serán analizados de acuerdo con el método descrito anteriormente en el apartado de “*método utilizado para el análisis de muestras y controles de suero*” (página 89).

En el **análisis de datos** se realizaron los siguientes cálculos:

- Representación gráfica semilogarítmica de D.O. frente al factor de dilución.

MATERIAL Y MÉTODOS

- Cálculo del coeficiente de variación (CV) de los replicados de cada nivel de dilución, el cual debía cumplir los siguientes criterios:
 - < 10 % para D.O. $\geq 0,7$
 - < 25% para $0,15 \leq D.O. < 0,7$
 - < 35 % para D.O. $< 0,15$
- Ajuste de los datos D.O. frente al factor de dilución empleando el modelo sigmoidal de 4 parámetros y representación gráfica.
- Ajuste lineal para el que se consideraron los niveles que se encontraban en la zona lineal en la representación sigmoidal.

El intervalo lineal debía cumplir los siguientes **criterios de aceptación**:

- El coeficiente de determinación R^2 , debía ser $\geq 0,95$.
- El error debido al ajuste para cada de los puntos, calculado con la fórmula siguiente, debía ser < 20%

$$\text{Error de ajuste} = \left[\frac{D.O. \text{ recalculada} - DO \text{ experimental}}{D.O. \text{ recalculada}} \right] \times 100$$

B. Especificidad

Evalúa como el porcentaje de muestras **correctamente diagnosticadas como negativas** al antígeno SLA de *L. infantum* para la subclase de anticuerpos IgG2.

Para este estudio de validación los valores de corte o **cut-off** se establecieron de la siguiente manera:

- **Población Natural:** a partir del valor medio de D.O. de una población de len condiciones naturales (no infectados por *L. infantum* y confirmados como negativos mediante IFI y qPCR), pertenecientes al G2-SLA, más tres veces la desviación estándar ($\bar{X} + 3DE$).
- **Población Experimental:** a partir de la D.O. media de 30 Beagle sanos (no infectados por *L. infantum* y confirmados como negativos mediante IFI y qPCR),

MATERIAL Y MÉTODOS

pertenecientes al grupo G1-SLA, más tres veces la desviación estándar (X+3DE).

Para llevar a cabo el **procedimiento experimental** se utilizó un total de 80 **muestras de suero** procedentes de: 30 perros Beagle experimentales sanos (**G1-SLA**), 30 perros negativos de cualquier raza, edad, etc. (**G2-SLA**) y 10 perros negativos de cualquier procedencia, pero con otras patologías como dermatitis, otitis crónica, etc. (**G3-SLA**), (Tabla 6). Estas muestras se analizaron de acuerdo con el método descrito en el apartado “*método utilizado para el análisis de muestras y controles de suero*” (página 89).

El **análisis de datos** realizado a partir de los valores de D.O. obtenidos, permitió clasificar las muestras en positivas o negativas según si la D.O. estuvo por encima o por debajo del *cut-off* calculado según lo definido anteriormente.

Posteriormente se calculó la especificidad del método aplicando la siguiente fórmula:

$$\text{Especificidad} = \left[\frac{\text{Verdaderos negativos}}{\text{Verdaderos negativos} + \text{Falsos positivos}} \right] \times 100$$

Los **criterios de aceptación** se basaron en el porcentaje de muestras negativas con resultado correcto, teniendo en cuenta el *cut-off* establecido para cada grupo de animales y debiendo cumplir las siguientes condiciones:

- Para perros experimentales la especificidad debía ser **≥ 90%**.
- Para perros infectados en condiciones naturales (con más probabilidad de presentar reacción cruzada con otros patógenos), la especificidad debía ser **≥ 80%**.

C. Sensibilidad

Este parámetro evalúa el porcentaje de muestras **correctamente diagnosticadas como positivas** frente al antígeno SLA de *Leishmania infantum* para la subclase de anticuerpos IgG2.

MATERIAL Y MÉTODOS

En este estudio de validación los valores de **cut-off** fueron los mismos que para la especificidad, descrito anteriormente.

Para la realización del **procedimiento experimental** se analizaron 50 muestras de suero: 20 sueros de perros Beagle infectados por *L. infantum* pertenecientes al grupo **G4-SLA** y 30 sueros de perros de cualquier raza, sexo, etc., con resultado positivo a *L. infantum* ya confirmado por otros métodos, pertenecientes al grupo **G5-SLA** (Tabla 6).

Al igual que en la especificidad, el **análisis de datos** realizado a partir de los valores de D.O. obtenidos en las muestras, sirvió para clasificarlas en positivas o negativas según la D.O. esté por encima o por debajo del **cut-off** calculado según lo definido anteriormente.

Posteriormente se calculó la sensibilidad del método aplicando la siguiente fórmula:

$$\text{Sensibilidad} = \left[\frac{\text{Verdaderos positivos}}{\text{Verdaderos positivos} + \text{Falsos negativos}} \right] \times 100$$

Los **criterios de aceptación** se basaron en el porcentaje de muestras positivas con resultado correcto, teniendo en cuenta el **cut-off** establecido para los perros naturales o experimentales infectados.

- Para los perros infectados experimentalmente, la sensibilidad debía ser $\geq 70\%$.
- Para los perros infectados naturalmente debía ser $\geq 90\%$.

D. Precisión

Este parámetro evalúa la **concordancia entre múltiples análisis de la misma muestra** (Tabla 6) en unas condiciones determinadas. Se realizaron los ensayos que se muestran a continuación para determinar la **Precisión Instrumental**, **Repetibilidad** y **Precisión Intermedia del método** ELISA SLA IgG2:

Mediante la Precisión Instrumental se analizó la precisión media de los equipos empleados. El **procedimiento experimental** empleado fue la lectura de una misma placa ELISA, la misma que para el análisis de repetibilidad, 10 veces consecutivas una vez parada la reacción. El **análisis de los datos** consistió en el cálculo del coeficiente

MATERIAL Y MÉTODOS

de variación de los 10 resultados obtenidos en cada una de las muestras (Tabla 6). El valor de este coeficiente debía ser **< a 3%**. Las muestras utilizadas en este procedimiento fueron:

- **GC(+)-SLA:** muestra de un perro infectado naturalmente por *L. infantum* con alta reactividad.
- **G6-2-SLA:** suero de un perro naturalmente infectado por *L. infantum* con reactividad media.
- **GC(-)-SLA:** muestra procedente de un *pool* de sueros de perros Beagle experimentales sanos, no infectados por *L. infantum*.
- **Blanco:** control de reactivos o control de conjugado que ocupará una columna de 8 pocillos. En este caso se utiliza PBS 1X en lugar de añadir muestra.

Mediante la Repetibilidad se calculó la variabilidad predecible cuando el método se lleva a cabo por el mismo operador, bajo las mismas condiciones de análisis y equipos y en un corto período de tiempo. El **procedimiento experimental** se llevó a cabo con todas las muestras del **G6-SLA** (Tabla 6), las cuales se analizaron 10 veces, es decir, utilizando 20 pocillos de la placa para cada una y siguiendo el método ELISA SLA IgG2 ya descrito.

- **G6-1-SLA:** suero de perro naturalmente infectado por *L. infantum* con una reactividad alta.
- **G6-2-SLA:** suero de perro naturalmente infectado por *L. infantum* con reactividad media.
- **G6-3-SLA:** suero de perro naturalmente infectado por *L. infantum* con reactividad baja.
- **G6-4-SLA:** suero de perro sano, no infectado por *L. infantum*.

El **análisis de los datos** consistió en calcular el coeficiente de variación de los 10 resultados obtenidos para cada muestra y teniendo en cuenta los siguientes **criterios de aceptación**:

MATERIAL Y MÉTODOS

- Los resultados de las diferentes repeticiones de las muestras debían ser homogéneos.
- El valor obtenido para el coeficiente de variación debía ser:
 - < 10% para muestras de alta reactividad.
 - < 25% para muestras de reactividad media.
 - < 35% para muestras de reactividad baja o nula.

Al contrario que ocurre con la Repetibilidad, la Precisión Intermedia expresa la variabilidad predecible entre las distintas mediciones cuando se realiza en días, analistas, equipos o reactivos diferentes. El **procedimiento experimental** y los parámetros analizados se representan en la siguiente Tabla, utilizando las muestras pertenecientes al **G6_SLA** (Tabla 6), al igual que en los ensayos de Repetibilidad.

Ensayo	Día	Operador	Set Pipetas	Lote de reactivos		
				Tapizado placa	Tampón PBS 10X	Tampón Citrato
1	1	1	I	B	X	x
2	2		II			
3	3		I			
4	4		II			
5	5		I	A	Y	y
6	1	2	II	B	X	x
7	2		I			
8	3		II			
9	4		I			
10	5		II	A	Y	y

Tabla 7: Resumen de los ensayos para valorar la Precisión Intermedia del método ELISA SLA IgG2.

El **análisis de los datos** consistió en calcular el coeficiente de variación de los 10 resultados obtenidos para cada muestra y teniendo en cuenta los siguientes **criterios de aceptación**:

- Los resultados de diferentes repeticiones de las muestras debían ser homogéneos.
- El coeficiente de variación debía ser:
 - < 20% para muestras de alta reactividad.

MATERIAL Y MÉTODOS

- < 30% para muestras de reactividad media.
- < 40% para muestras de reactividad baja o nula.

E. Robustez

Se determinó el efecto de la variación de los parámetros **tiempo, temperatura de incubación y lote de antígeno empleado**.

Para medir el efecto del tiempo de incubación el **procedimiento experimental** se desarrolló en el mismo día, por el mismo operador y con los mismos reactivos, variando únicamente el tiempo de incubación.

Se modificó el diseño experimental introduciendo variaciones de ± 5 minutos en los tiempos de incubación 1 (después de añadir la muestra al pocillo) y 2 (después de añadir el conjugado al pocillo), como se muestra en la Tabla 8. Las muestras utilizadas para la determinación de la robustez fueron todas las del **G6-SLA** (G6-1-SLA, G 6-2-SLA, G6-3-SLA), pertenecientes a perros positivos naturalmente infectados por *L. infantum* con alta, media y baja reactividad respectivamente y G6-4-SLA, procedente de un perro sano no infectado (Tabla 6), se analizaron 5 veces cada una de ellas (10 pocillos).

Ensayo	Tiempo de incubación	
	1	2
1 (Estándar)	35 minutos	35 minutos
2	30 minutos	35 minutos
3	35 minutos	30 minutos
4	40 minutos	35 minutos
5	35 minutos	40 minutos

Tabla 8: Resumen de los ensayos para valorar el efecto del tiempo de incubación.

El **análisis de los datos** consistió en la realización de la prueba de análisis de la varianza (ANOVA) de las medias de D.O. obtenidas de cada muestra en cada uno de los 5 ensayos, comprobando si son o no estadísticamente diferente entre sí.

MATERIAL Y MÉTODOS

Como **criterios de aceptación** se estableció que no debía haber diferencias significativas entre las medias de D.O. obtenidas para cada ensayo ($p > 0,05$). En caso de encontrar diferencias significativas, se investigó que casos son diferentes.

Para medir el efecto de la temperatura de incubación el **procedimiento experimental** se desarrolló en un único día, por un operador y utilizando los mismos reactivos, únicamente haciendo variaciones de $\pm 2^\circ \text{C}$ en la temperatura de incubación 1 y 2, es decir, después de añadir la muestra al pocillo y después de añadir el conjugado respectivamente (Tabla 9). Las muestras utilizadas fueron las mismas que para el ensayo de tiempo de incubación, **G6-SLA** (Tabla 6), y se realizaron 5 repeticiones de duplicados de cada una ellas.

Ensayo	Temperatura de incubación	
	1	2
1 (Estándar)	37°C	37°C
2	35°C	37°C
3	37°C	35°C
4	39°C	37°C
5	37°C	39°C

Tabla 9: Resumen de los ensayos para valorar el efecto de la temperatura de incubación.

El **análisis de resultados** se realizó comparando, mediante un análisis de la varianza, las medias de D.O. obtenidas en los 5 ensayos realizados.

Como **criterios de aceptación** se estableció que no debía haber diferencias significativas entre las medias de D.O. obtenidas para cada ensayo ($p > 0,05$). En caso de encontrar diferencias significativas, se investigó que casos son diferentes.

El **procedimiento experimental** para medir el efecto del lote de antígeno consistió en el análisis en el mismo día y por el mismo operador de las mismas muestras (**G6-SLA**) y las mismas repeticiones que en los dos análisis anteriores, en dos placas ELISA diferentes, cada una tapizada con un lote de antígeno diferente, pero con el resto de los reactivos en común.

MATERIAL Y MÉTODOS

El **análisis de los datos** se realizó mediante una prueba t-student para cada ensayo, con el fin de comprobar si las diferencias en las medias de D.O. obtenidas con cada lote de antígeno eran estadísticamente significativas o no.

Igual que en los casos anteriores, el criterio de aceptación consistió en un grado de confianza estadística del 95% ($p > 0.05$).

F. Estabilidad

La capacidad para mantener sus propiedades iniciales de las muestras de suero del **G6_SLA** (G6-1-SLA, G6-2-SLA, G6-3-SLA), pertenecientes a perros positivos naturalmente infectados por *L. infantum* con alta, media y baja reactividad respectivamente y G6-4-SLA, procedente de un perro sano no infectado (Tabla 6) se comprobó teniendo en cuenta las siguientes condiciones:

- **Almacenamiento prolongado a -80°C** considerando los tiempos de análisis los 15 días tras la toma de muestra y primera congelación, 6, 12, 18 y 24 meses. En cada uno de estos tiempos las muestras se analizaron 5 veces (10 pocillos) de acuerdo con el método descrito en el apartado epígrafe “3.4.1.4. Desarrollo del método ELISA SLA IgG2”.
- **Tres procesos de congelación-descongelación**, considerando que en cada ciclo de congelación las muestras estarán en ese estado mínimamente 12 horas y el proceso de descongelación se realizó introduciendo las muestras en refrigeración (2-8°C) y una vez descongeladas, se analizaron 5 veces cada muestra (10 pocillos) de acuerdo con el método descrito en el epígrafe “3.4.1.4. Desarrollo del método ELISA SLA IgG2”.
- **Manteniendo las muestras en refrigeración (2-8°C)**, considerando unos tiempos de muestreo de 24 y 48 horas antes. A cada uno de estos tiempos las muestras consideradas se analizaron 5 veces (10 pocillos) de acuerdo con el método descrito en el epígrafe “3.4.1.4. Desarrollo del método ELISA SLA IgG2”.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se estableció el resultado a tiempo 0 (t=0) el obtenido a partir de la muestra “fresca”, sin haber sido congelada, es decir, sólo mantenida en refrigeración un máximo de 12 horas desde su obtención.

El **análisis de los datos** consistió en calcular en porcentaje de variación de los resultados de D.O. normalizada de los diferentes tipos de muestras consideradas respecto al t=0, utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{Porcentaje de variación (\%)} = \left[1 - \frac{D.O. (t = x)}{D.O. (t = 0)} \right] \times 100$$

D.O. (t=x): Densidad óptica normalizada media a t=x

D.O. (t=0): Densidad óptica normalizada media a t=0

Los **criterios de aceptación** establecidos fueron los siguientes:

- < 20% para las muestras de alta reactividad.
- < 30% en caso de las muestras de reactividad media.
- <40% para muestras de baja reactividad y negativas.

MATERIAL Y MÉTODOS

3.4.2. Inmunofluorescencia indirecta (IFI)

3.4.2.1. Muestras empleadas

La validación de la técnica **IFI** se llevó a cabo con muestras de **suero** procedentes de **96 animales**, agrupadas según su positividad o no a *L. infantum* confirmada mediante otra técnica inmunológica (ELISA SLA IgG2) y parasitológica (qPCR de médula ósea).

GRUPO	Características	Nº de animales	Codificación*	Criterios de inclusión
G1-IFI	(-) Experimentales	20	G1-1/20-IFI	Confirmados por ELISA y qPCR
G2-IFI	(-) Naturales	20	G2-1/20-IFI	
G3-IFI	(-) Otras Patologías	10	G3-1/10-IFI	
G4-IFI	(+) Experimentales	20	G4-1/20-IFI	
G5-IFI	(+) Naturales	20	G5-1/20-IFI	
G6-IFI	(+) Naturales	4	G6-1-IFI	Confirmado por ELISA y qPCR Título de Anticuerpos (1/640).
			G6-2-IFI	Confirmados por ELISA y qPCR Título de anticuerpos (1/320).
			G6-3-IFI	Confirmados por ELISA y qPCR Título de anticuerpos (1/80).
	(-) Naturales		G6-4-IFI	Confirmado por ELISA y qPCR
CONTROL (GC-IFI)	(+) Naturales	1	GC(+) IFI	Confirmados por ELISA y qPCR Título de anticuerpos $\geq 1/640$.
	(-) Experimentales	1	GC(-) IFI	Confirmados por ELISA y qPCR Título de anticuerpos $< 1/80$.

Tabla 10: Clasificación y codificación de los animales utilizados para la validación de la técnica IFI.

(-) **Experimentales:** perros de raza Beagle sanos, mantenidos en condiciones experimentales

(-) **Naturales:** perros sanos de cualquier raza, sexo y edad procedentes de propietarios particulares y protectoras.

(-) **Otras Patologías:** perros de cualquier raza, sexo o edad, procedentes de propietarios particulares con resultado negativo a *L. infantum*, y que padecían otras patologías.

(+) **Experimentales:** perros de raza Beagle mantenidos en condiciones experimentales, confirmados como positivos a *L. infantum*.

(+) **Naturales:** perros de cualquier raza, sexo, o edad, procedentes de propietarios particulares con resultado positivo a *L. infantum*.

* Codificación de las muestras: grupo al que pertenece-nºanimal-técnica validada.

MATERIAL Y MÉTODOS

3.4.2.2. Material y reactivos

Los materiales necesarios para la validación del método IFI fueron: portaobjetos de bordes romos y banda superior esmerilada (SuperFrost® de Menzel-Glaser®), cubreobjetos de 34x60mm (Menzel-Glaser®), placas de 96 pocillos (Deltalab ref.: 1-83.1835) para hacer las diluciones del suero y puntas de pipetas (Eppendorf ref.: 0030000987, Deltalab ref.: 301-11, Deltalab ref.: 200012).

Los reactivos y soluciones empleados se describen a continuación:

Para la preparación del antígeno y el tapizado de portaobjetos

- Promastigotes de *Leishmania infantum* (MCAN/ES/1996/BCN150, zymodema MON-1), procedente de cultivo propio.
- Formalina tamponada al 2% (PH 7,2-7,4).
- Formaldehído 3,7-4% tamponado pH 7 (Panreac ref.: 252931.12.14)
- PBS1X de elaboración propia preparado según el procedimiento ya descrito y autoclavado.
- Metanol al 96% (Panreac ref.: 141091.1214)
- Acetona al 99.5%. (Panreac ref.: 141007.12.14)

Para el desarrollo del método

- *Solución diluyente/lavado tamponada*: PBS 1X (0.01M, PH 7.2) obtenido y compuesto igual que para el método ELISA SLA IgG2, es decir:
 - NaCl (Panreac, ref.: 141659) 174g
 - Na₂HPO₄ 2H₂O (Panreac, ref.: 142507) 32,28g
 - Na H₂PO₄ 1H₂O (Panreac ref.: 141965) 6g
 - Agua destilada (Adesco) 2000ml
- *Anticuerpo secundario (conjugado)*: Rabbit-fluorescein anti-doglgG [RAD/IgG(H+L)/FITC] de Nordic.
- *Líquido de montaje*: PBS 1X + Glicerina preparada en el momento del uso y compuesta por:

MATERIAL Y MÉTODOS

- Glicerina (Panreac ref.: 151339.12.11) 400ml
- PBS1X de elaboración propia preparado según el procedimiento ya descrito
..... 1600ml

3.4.2.3. Aparatos y equipos

Los análisis inmunológicos mediante la técnica IFI se llevaron a cabo con los equipos que se muestran en la siguiente tabla.

NOMBRE DEL EQUIPO	CÓDIGO DE IDENTIFICACIÓN	NÚMERO DE SERIE
Agitador Magnético FB15001	212-AM (II)	169017
Agitador Orbital Shaker 4518	212-AO	102127-1335
Agitador Vortex ZX3 VELP Scientifica	212-AV	102282
Balanza Electrónica Nahita 5022	212-BA	A58390
PH-Metro Cole Parmer AB15 Plus	212-PH	AB92327157
Juego de Pipetas 1	212-P10	2996826
	212-P100	331806
	212-P200	2846716
	212-P1000	2057996
	212-PMC	2940956
Juego de Pipetas 2	212-P10(II)	3285041
	212-P100(II)	4173728
	212-P200(II)	4180158
	212-P1000(II)	4365361
	212-PMC(III)	1357333
Microscopio de Fluorescencia Leica DMLS 020-518.500	201-MF	501095/192520

Tabla 11: Equipos utilizados para la Validación de la técnica IFI.

MATERIAL Y MÉTODOS

3.4.2.4. Desarrollo del método

El método semi-cuantitativo ha sido desarrollado para llevar a cabo el diagnóstico inmunológico de la leishmaniosis en perros mediante la detección de anticuerpos IgG anti-*Leishmania infantum* en muestras de suero.

Antes de describir el método utilizado para el análisis de las muestras de suero, es importante destacar que la **obtención del antígeno** para el tapizado de portaobjetos se realizó según el Procedimientos Normalizados de Trabajo (PNT) con código PT. IAg.02 del Laboratorio LeishmanCeres, partiendo de promastigotes (MCAN/ES/1996/BCN150, zymodema MON-1) procedentes de cultivos masivos en “flask”. El contenido de varios “flask” se depositó en tubos de 50 ml, que se centrifugaron a 2500rpm (1190g) durante 5 minutos a 26°C para obtener los botones celulares. Una vez obtenidos los botones celulares, y resuspendidos en 50 ml de PBS 1X estéril se realizó un conteo del número total de promastigotes con la cámara de Neubauer y se calculó el número total de parásitos/ml aplicando la siguiente fórmula:

$$\text{Promastigotes/ml} = \text{Parásitos en 16 cuadrantes} \times 10.000 \times \text{factor de dilución}$$

El resto del volumen se volvió a centrifugar y se resuspendió en PBS 1X, hasta que el sobrenadante quedó transparente (tres lavados). El último lavado se realizó con PBS 1X + Formalina en proporción 1/1, para evitar la agregación celular y realizar la fijación de parásitos de forma progresiva.

Tras este último lavado, se desecha el sobrenadante quedándonos con el precipitado o botón celular formado en el mismo, el cual se resuspende y homogeniza en Formalina tamponada. Este tubo se cierra con parafilm, correctamente identificado en refrigeración a 2-8°C hasta su uso.

Para el **tapizado de los portaobjetos con el antígeno** (promastigotes de *L. infantum*) en primer lugar se comprobó el estado del antígeno almacenado en refrigeración verificando su integridad, morfología y concentración, dispensando una gota de la

MATERIAL Y MÉTODOS

suspensión en un portaobjetos, observándola al microscopio y ratificando que las formas celulares permanecían en óptimas condiciones.

Los portaobjetos se limpiaron y desengrasaron sumergiéndolos en metanol, secándolos posteriormente con papel secante. Una vez limpios y secos, se depositó la solución de parásitos en cada portaobjetos con un aplicador de gotas gruesas, a razón de 10 gotas en cada uno, según refleja la Figura 17, dejándolas secar a temperatura ambiente.

Una vez secos, los portaobjetos se introdujeron en una cuna y se sumergieron en una cubeta de lavado con acetona pura durante 10 minutos para fijar los promastigotes. Finalmente se dejaron secar y se empaquetaron en grupos, envolviéndolos primero en papel secante y después en papel de aluminio. El etiquetado se realizó indicando el lote, la fecha de elaboración y de caducidad la cual era la establecida a partir de los valores del control positivo, y se introdujeron en cajas isotermas y se almacenaron a -80°C hasta el momento de su uso.

A continuación, se describe **el método utilizado para el análisis de muestras** de suero mediante la técnica IFI, reflejado en el PNT con código PT. IH.02 del laboratorio LeishmanCeres.

- Se descongelan a temperatura ambiente los portaobjetos tapizados con el antígeno durante aproximadamente 15 minutos.
- Se identifican mediante números los portaobjetos necesarios, teniendo en cuenta que en cada uno caben las diluciones para dos muestras.
- Se delimitan las 10 gotas de antígeno de cada portaobjetos, dibujando 10 cuadrados con un rotulador negro indeleble, asegurando que cada gota de antígeno quede ubicada en el centro de cada cuadro como se indica en la Figura 17, para evitar que se mezclen las diferentes diluciones de los sueros.
- Se llevan a cabo 5 diluciones en PBS 1X de cada muestra y de los controles positivos y negativos en una placa de 96 pocillos: 1/40, 1/80, 1/160, 1/320 y 1/640.

MATERIAL Y MÉTODOS

- **Control positivo con referencia GC(+)-IFI.** Suero procedente de un perro naturalmente infectado por *L. infantum* con alta respuesta de anticuerpos IgGT (título $\geq 1/360$).
 - **Control negativo con referencia GC(-)-IFI.** Suero procedente de un *pool* de perros Beagle sanos no infectados por *L. infantum*, procedentes de ensayos experimentales, con título $< 1/80$.
- Se aplica la correspondiente dilución de la muestra a cada gota de antígeno, según la Figura 17.
- El control positivo y negativo se dispensan siempre en el portaobjetos nº1, en las ubicaciones "A" y "B", respectivamente como muestra la siguiente Figura 17.

Dilución	Nº de portaobjeto	
	Muestra A	Muestra B
1/40	○	○
1/80	○	○
1/160	○	○
1/320	○	○
1/640	○	○

Figura 17: Esquema de un portaobjetos con las 10 gotas de antígeno y las diluciones usadas.

- Se incuban los portaobjetos a temperatura ambiente y en oscuridad en una cámara cerrada para así evitar la evaporación.
- Se colocan los portaobjetos en una cuna con PBS 1X y se hacen 3 lavados de 5 minutos cada uno, en una cuna diferente cada vez y manteniéndolos en agitación a 75 rpm y 37°C en el agitador orbital y posteriormente se dejan secar a temperatura ambiente.

MATERIAL Y MÉTODOS

- Se hacer una dilución 1/80 del anticuerpo secundario anti-especie con isotiocianato de fluoresceína, con PBS 1X manteniendo en todo momento las máximas condiciones de oscuridad posible.
- Se añadir sobre cada gota del portaobjetos 20 µl de anticuerpo secundario diluido.
- Se vuelve a incubar los portaobjetos 35 minutos en las mismas condiciones que la incubación anterior.
- Se realizan 3 lavados con PBS 1X, bajo las mismas condiciones descritas anteriormente, y se dejan secar a temperatura ambiente.
- Se colocan unas gotas de líquido de montaje en la línea que separa las dos muestras del portaobjetos, y se pone un cubreobjetos.
- Se realizar la lectura mediante observación al microscopio de fluorescencia (40 aumentos), antes de que transcurran 36 horas. La determinación del título de anticuerpos de cada muestra corresponde a última dilución del suero que reaccione positivamente con el antígeno depositado en el portaobjetos, en la que prácticamente la totalidad de las formas de promastigotes captan el fluorocromo con gran intensidad.
- La observación e interpretación de cada muestra se realiza por dos analistas cualificados, comparando los resultados obtenidos. En caso de discrepancias, ambos analistas repiten la lectura y consensuarán el resultado.

Criterios de aceptación

Los resultados de cada experimento se aceptan si se cumplen los siguientes criterios:

- El título del control positivo debe ser $\geq 1/640$.
- El título del control negativo debe ser $< 1/80$

Expresión de resultados

Los resultados son expresados como títulos de anticuerpos que corresponden con la máxima dilución de la muestra en la cual prácticamente todos los promastigotes presentes en el campo emiten fluorescencia con la suficiente intensidad que permita distinguir correctamente la membrana y el flagelo.

MATERIAL Y MÉTODOS

Clasificación de las muestras

La positividad o negatividad de las muestras se determinó en base a su título de anticuerpos y de acuerdo con los siguientes criterios (247):

- Muestra negativa: título $<1/80$
- Muestra positiva con reactividad baja-intermedia: título $\geq 1/80$ y $\leq 1/320$
- Muestra positiva con alta reactividad: título $\geq 1/640$

3.4.2.5. Diseño del protocolo de validación

A continuación, se describe el procedimiento experimental de cada uno de los ensayos realizados para la determinación de cada parámetro estudiado en la validación de la técnica IFI. En la siguiente tabla están reflejados los parámetros analizados y las muestras empleadas para cada uno de estos análisis.

GRUPO DE ANIMALES	Características	Especificidad	Sensibilidad	Precisión	Robustez
				Repetibilidad Intermedia	
G1-IFI	(-) Experimentales	X			
G2-IFI	(-) Naturales	X			
G3-IFI	(-) Otras Patologías	X			
G4-IFI	(+) Experimentales		X		
G5-IFI	(+) Naturales		X		
G6-IFI	(+) Naturales			X	X
				X	
				X	
	(-) Naturales			X	
CONTROLES GC-(IFI)	(+) Naturales	X	X		
	(-) Experimentales				

Tabla 12: Parámetros analizados y grupos de animales utilizados para la validación del método IFI.

MATERIAL Y MÉTODOS

A. Especificidad

Evalúa el porcentaje de muestras **correctamente diagnosticadas como negativas** al antígeno. **El procedimiento experimental** se realizó analizando muestras de 50 sueros procedentes de; 20 perros Beagle experimentales sanos (G1-IFI), 20 perros negativos naturales (G2-IFI) y 10 perros negativos naturales, pero con otras patologías concomitantes (G3-IFI) (Tabla 10), confirmados como negativos a *L. infantum* por otro método inmunológico (ELISA SLA IgG2) y parasitológico (qPCR de médula ósea). Las muestras se analizaron de acuerdo con el método descrito anteriormente. El **análisis de datos** se realizó a partir del título de anticuerpos obtenido para cada muestra, teniendo en cuenta los criterios de clasificación descritos anteriormente.

La Especificidad del método IFI se calculó mediante la aplicación de la siguiente fórmula:

$$\text{Especificidad} = \left[\frac{\text{Verdaderos negativos}}{\text{Verdaderos negativos} + \text{Falsos positivos}} \right] \times 100$$

Criterios de aceptación

El criterio de aceptación establecido se basó en el % de muestras correctamente identificadas como negativas, que debe ser $\geq 95\%$ y el fallo el 5% restante, el cual sólo es aceptado si el título obtenido es de 1/80.

B. Sensibilidad

Se evalúa como el porcentaje de muestras de suero **correctamente diagnosticadas como positivas** frente a antígenos de *Leishmania*. Para la realización del **procedimiento experimental** se analizaron las 40 muestras que se detallan en la Tabla 10: 20 sueros de perros Beagle infectados (G4-IFI) y 20 sueros de perros en condiciones naturales, confirmados como positivos por otros métodos (G5-IFI).

El **análisis de datos** para determinar la sensibilidad del método IFI se realizará aplicando la siguiente fórmula:

$$\text{Sensibilidad} = \left[\frac{\text{Verdaderos positivos}}{\text{Verdaderos positivos} + \text{Falsos negativos}} \right] \times 100$$

MATERIAL Y MÉTODOS

Los **criterios de aceptación** se basan en el porcentaje de muestras positivas con resultado correcto, el cual debe ser $\geq 90\%$.

C. Precisión

Se evaluó la **concordancia entre múltiples análisis de la misma muestra** (Tabla 10) en unas condiciones determinadas. Se analizará la Repetibilidad y la Precisión Intermedia:

Mediante la Repetibilidad calculó la precisión inherente al método y al equipo, es decir, la variabilidad esperada cuando el método se desarrolla bajo las mismas condiciones de trabajo; un solo operador, con los mismos equipos y reactivos en un corto periodo de tiempo. El **procedimiento experimental** para evaluar la repetibilidad se llevó a cabo con las muestras indicadas en la Tabla 10, las cuales se analizaron 10 veces, es decir utilizando 20 pocillos de la placa para cada una y siguiendo el método IFI ya descrito. El **análisis de los datos** consistió en evaluar la homogeneidad de los resultados de los 10 títulos obtenidos para cada muestra. Para el factor de dilución, se calculará la proporción de resultados obtenidos. Como **criterios de aceptación para** la Repetibilidad del método IFI se estableció que debería al menos el 90% de iguales lecturas de los títulos. Evaluando la Precisión Intermedia se comprobó la variabilidad predecible entre las distintas mediciones en días, analistas, equipos y reactivos diferentes. El **procedimiento experimental** y los parámetros analizados se representan en la siguiente Tabla, junto con las mismas muestras utilizadas para la Repetibilidad (Tabla 10).

MATERIAL Y MÉTODOS

Ensayo	Día	Operador	Set Pipetas	Lote de reactivos		
				Tapizado portaobjetos	Tampón PBS 10X	
1*	1	1	I	B	X	
2	2		II			
3	3		I		Y	
4	4		II			
5	5		I	A	X	
6	1	2	II	B		
7	2		I			
8	3		II			Y
9	4		I			
10	5		II			A

Tabla 13: Resumen de los ensayos para valorar la Precisión Intermedia del método IFI.

*Para el ensayo 1, se utilizaron los resultados obtenidos en el replicado 1 del análisis de Repetibilidad.

El **análisis de los datos** consistió en evaluar la homogeneidad de los resultados de los 10 títulos obtenidos para cada muestra (10 repeticiones entre los dos operadores). Para el factor de dilución, se calculó la proporción de resultados obtenidos. Como **criterios de aceptación** la Repetibilidad del método IFI deberá tener para la frecuencia más abundante al menos el 90% de los títulos, aceptándose el restante 10% en las categorías inmediatamente superior e inferior.

D. Robustez

Se determinará el efecto de la variación tiempo incubación.

Para medir el efecto del tiempo de incubación el **procedimiento experimental** se desarrollará en el mismo día, por el mismo operador, con los mismos reactivos únicamente variando el tiempo de incubación. Se modificará el diseño experimental introduciendo variaciones de ± 5 minutos en los tiempos de incubación 1 (después de añadir la muestra) y 2 (después de añadir el conjugado) (Tabla 14). Las muestras utilizadas para la determinación de la robustez (Tabla 10) se analizarán mediante 4 replicados (2 portaobjetos) por muestra y ensayo.

MATERIAL Y MÉTODOS

Ensayo	Tiempo de incubación	
	1	2
1 (Estándar)	35 minutos	35 minutos
2	30 minutos	35 minutos
3	35 minutos	30 minutos
4	40 minutos	35 minutos
5	35 minutos	40 minutos

Tabla 14: Resumen de los ensayos para valorar el efecto del tiempo de incubación.

El **análisis de los datos** consistirá en evaluación de los títulos obtenidos en las diferentes condiciones de ensayo. Se realizará la comparación de proporciones entre diferentes ensayos con una prueba *Chi-cuadrado* para cada uno de los factores de dilución. Como **criterios de aceptación** se establece que no debe haber diferencias significativas entre las proporciones obtenidas para cada ensayo ($p \geq 0,05$).

E. Estabilidad

El parámetro de Estabilidad de las muestras de suero no se ha considerado necesario contemplarlo en la validación del método IFI debido a que la posible alteración de las muestras bajo distintas condiciones de almacenamiento (refrigeración, congelaciones y descongelaciones sucesivas, almacenamiento prolongado a -80°C) ya ha sido analizada en la validación de la técnica semi-cuantitativa de ELISA indirecto de dobles anticuerpos, que es un método mucho más sensible para detectar posibles variaciones en la reactividad.

MATERIAL Y MÉTODOS

3.4.3. PCR cuantitativa a tiempo real (qPCR)

3.4.3.1. Muestras empleadas

La validación de la técnica **qPCR** se llevó a cabo con muestras de médula ósea (**MO**) y ganglio linfático (**GL**) procedentes de **44** animales. Como se refleja en la siguiente Tabla, los animales se agruparon según positividad o no a *L. infantum*, confirmada mediante métodos inmunológicos ELISA SLA IgG2 e IFI.

GRUPO	Característica	Nº de animales	Codificación	Criterios de inclusión
G1-qPCR	MO (+)	20	G1-1/20-MO-qPCR	Confirmados por ELISA e IFI.
	GL (+)		G1-1/20-GL-qPCR	
G2-qPCR	MO (-)	20	G2-1/20-MO-qPCR	
	GL (-)		G2-1/20-GL-qPCR	
G3-qPCR	MO (+)		G3-1/3-MO-qPCR (G1-12/20-MO-qPCR)	(+) Confirmados por ELISA e IFI. Alta carga parasitaria >1000
			G3-2/3-MO-qPCR (G1-11/20-MO-qPCR)	(+) Confirmados por ELISA e IFI. Media carga parasitaria 101-1000
	MO (-)		G3-3/3-MO-qPCR (G2-14/20-MO-qPCR)	(-) Confirmados por ELISA e IFI.
	GL (+)		G3-1/2-GL-qPCR (G1-12/20-GL-qPCR)	(+) Confirmados por ELISA e IFI. Alta carga parasitaria >1000
			G3-2/2-GL-qPCR (G1-11/20-GL-qPCR)	(+) Confirmados por ELISA e IFI. Media carga parasitaria 101-1000
	GL (-)		G3-3/3-GL-qPCR (G2-14/20-GL-qPCR)	
CONTROL GC-qPCR	MO (+)	1	GC(+)MO-qPCR	Confirmados por ELISA e IFI.
	GL (+)	1	GC(+)GL-qPCR	
	MO (-)	1	GC(-)MO-qPCR	
	GL (-)	1	GC(-)GL-qPCR	

Tabla 15: Clasificación y codificación de los animales y muestras utilizadas para la validación de la técnica qPCR.

M.O. (+): médula ósea de perros confirmados como positivos a *L. infantum*. **GL (+):** ganglio linfático de perros confirmados como positivos a *L. infantum*. **M.O. (-):** médula ósea de perros confirmados como negativos a *L. infantum*. **GL (-):** ganglio linfático de perros confirmados como negativos a *L. infantum*. * Grupo al que pertenece-nº animal-matriz analizada-técnica validada.

3.4.3.2. Material y reactivos

Los materiales empleados en la validación del método q-PCR fueron los siguientes: placas de 96 pocillos MicroAmp™ FastOptical (Applied Biosystems ref.: 4346906), film

MATERIAL Y MÉTODOS

adhesivo transparente para placa MicroAmp™ Optical Adhesive Film (Applied Biosystems ref.: 4311971), puntas de pipetas con filtro Multiguard barrier tips de 0,1-10 µl (Sorenson, ref.: 28200), de 1-100 µl (Sorenson, ref.: 14220), de 100-1000 µl (Sorenson, ref.: 14200) y puntas de pipetas sin filtro de 10-100 µl (Fisher, ref.: 0030000897).

Los reactivos y soluciones utilizados se describen a continuación:

- Kit de extracción de ADN UltraClean BloodSpin kit (MoBio, ref.: 12200-250).
- iTaq Universal Probes Supermix (Bio-Rad, ref.: 172-5131).
- Sonda TaqMan (Applied Biosystems, ref.:4316033).
- Cebador (Primer) Leish-1 (Stab-Vida, ref.: 00165607_1).
- Cebador (Primer) Leish-2 (Stab-Vida, ref.: 00165607_2).
- Agua MilliQ suministrada por la Unidad de Genética.
- PBS 1X estéril (0.01M, pH 7,2-7,4), obtenido a partir de una solución autoclavada de PBS 10X con agua destilada (1:10), compuesto por:
 - NaCl (Panreac, ref.: 141659) 174g
 - Na₂HPO₄ 2H₂O (Panreac, ref.: 142507) 32,28g
 - Na H₂PO₄ 1H₂O (Panreac ref.: 141965) 6g
 - Agua destilada (Adesco) 2000ml

3.4.3.3. Aparatos y equipos

El desarrollo de la validación de la técnica qPCR se llevó a cabo en la Sala 208, 213 y en la Unidad de Genética de la Facultad de Veterinaria con los equipos que se muestran en la siguiente tabla.

MATERIAL Y MÉTODOS

NOMBRE DEL EQUIPO	CÓDIGO DE IDENTIFICACIÓN	NÚMERO DE SERIE
Analizador genético Step one Real Time PCR. Applied Biosystems	GEN-AG	271001356
Baño térmico EcoLine e100. Lauda	GEN-BT	B06076
Microcentrífuga 5415D. Eppendorf	GEN-CM	5425 39993
Sistema de purificación de agua Wasserlab ultramatic type 1 ultrapure reagent grade water.	N/A*	211071
Agitador (Vortex) Heidolph 'REAX TOP. '	N/A*	070109148
Centrífuga de placas 5430. Eppendorf	N/A*	5427YH708586
Pipetas de Extracción	208 _{PCR} -P ₁₀	4094385
	208 _{PCR} -P _{20(II)}	4876476
	208 _{PCR} -P _{200(II)}	4895466
	208 _{PCR} -P _{1000(II)}	4858866
	208 _{PCR} -P _{1000(III)}	4183798
Pipetas Mix	208 _{PCR} -P _{10(II)}	4176488
	208 _{PCR} -P ₂₀	4711216
	208 _{PCR} -P ₂₀₀	4851846
	208 _{PCR} -P ₁₀₀₀	4027126
Pipetas Extracción II	213-P ₁₀	2995056
	213-P ₁₀₀	2004216
	213-P ₁₀₀₀	2057186
	213-P _{1000(II)}	4183768

Tabla16: Equipos utilizados para la Validación de la técnica qPCR.

*Equipos que no se encuentran regulados por la normativa BPL.

MATERIAL Y MÉTODOS

3.4.3.4. Desarrollo del método

El propósito del método PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR) es detectar y cuantificar la presencia de ADN del kinetoplasto (ADNk) de *Leishmania infantum* en ADN extraído de muestras caninas de ganglio linfático y médula ósea. El método, desarrollado para realizar el diagnóstico parasitológico con una alta precisión, se detalla en el procedimiento normalizado de trabajo PT.P.04 del Laboratorio LeishmanCeres.

Para realizar la **extracción** del ADN de las muestras se utilizó el kit UltraClean BloodSpin (MoBio, Carlsbad, CA, EEUU). El procedimiento de extracción se realizó teniendo en cuenta las instrucciones del fabricante y el PT.P.04:

- Se añaden 10 µl de Proteinasa K a cada muestra y se agita suavemente con el vortex.
- Se añaden 200 µl de Solución B1 a cada muestra y se agita en el vortex durante 15 segundos.
- Las muestras se incuban en el baño térmico a 65°C durante 10 minutos y posteriormente se da un pulso de centrifugación (13.000g unos segundos).
- Se añaden 200µl de Solución B2 y se agita en vortex 15 segundos y se da un pulso de centrifugación (13.000g durante unos segundos).
- Se transfiere todo el contenido al eppendorf con filtro y se centrifuga 1 minuto a 13.00g.
- Mediante pinzas esterilizadas, se transfiere cada filtro a un nuevo tubo y se añaden 500 µl de la Solución B3 a cada uno y se centrifuga 30 segundos a 13.000g.
- Se saca el filtro mediante pinzas esterilizadas, se tira el contenido de cada tubo, se vuelve a colocar el filtro en el mismo tubo, se añaden 500 µl de Solución B4 y se centrifuga 30 segundos a 13.000g.
- Se vuelve a sacar el filtro, se tirar el contenido del tubo, se coloca nuevamente el filtro en el mismo tubo y se centrifuga 1 minuto a 13.000g.
- Se saca el filtro y se lleva a un nuevo tubo utilizando pinzas esterilizadas, evitando en todo momento la contaminación de las muestras.

MATERIAL Y MÉTODOS

- Se añaden 100 µl de Solución B5 a se incuba 5 minutos en el baño térmico a 65°C y posteriormente se centrifuga 1 minuto a 13.000g.
- Se quitar y desecha el filtro, se cierra el tubo y se identificar la muestra de ADN extraído listo para amplificar.

Siempre que sea posible, la amplificación se realiza el mismo día que la extracción del ADN. En el caso que no sea posible, el ADN extraído se almacena a -80°C hasta su uso.

La **recta patrón** para la cuantificación se obtiene a partir de 6 diluciones (DIL1-DIL6) con los siguientes números de parásitos: 50.000, 5.000, 500, 50, 5 y 0,5. Cada una de estas diluciones patrón se analizó por triplicado de acuerdo con el método descrito anteriormente.

Esta recta se prepara a partir de 1 vial de 75 µl con 10⁶ parásitos al que se le añaden 425 µl de agua MilliQ, obteniendo un volumen final de 500 µl. Este volumen se divide en 4 alícuotas de 125 µl y se somete al mismo proceso de extracción que las muestras problema, siguiendo las instrucciones del fabricante del kit UltraClean BloodSpin. El ADN diluido en solución B5 de cada uno de los viales de 100 µl se mezcla en uno solo y tras su homegenización se vuelve a dividir en 4 alícuotas de 100 µl. De éstas, tres son almacenadas a -80°C hasta el momento de su uso y la otra se emplea para obtener la Dilución 1 (50.000pp) añadiéndole 400 µl de solución B5. A partir de la Dilución 1 se obtienen el resto de los puntos de la recta, realizando diluciones 1:10 como se indica en la Tabla 17 y la Figura 18.

MATERIAL Y MÉTODOS

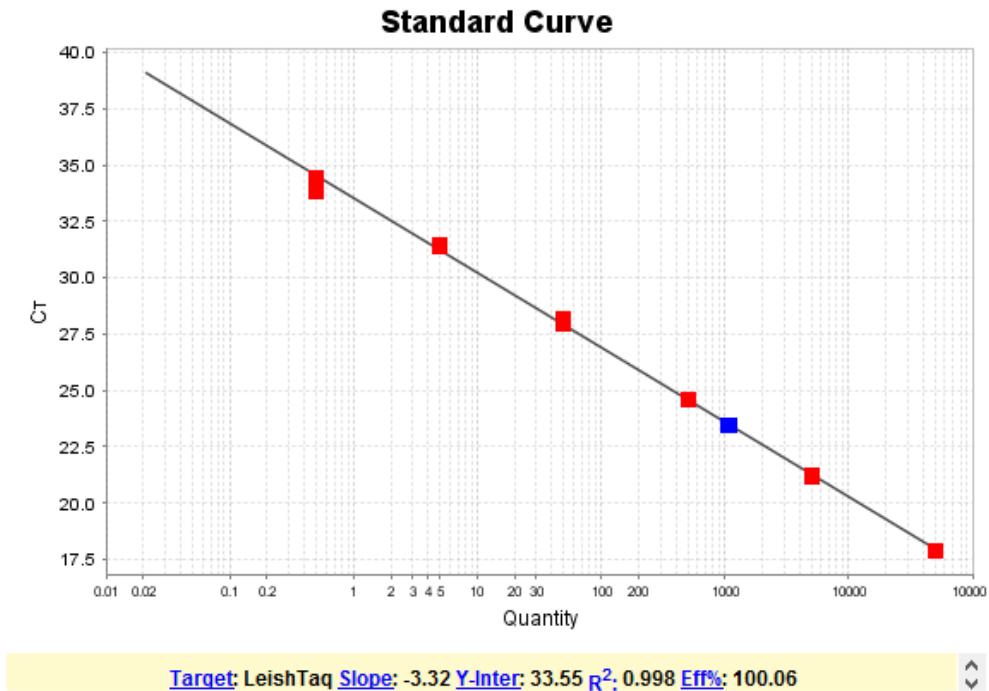


Figura 18: Ejemplo Recta patrón de los ensayos.

El volumen final obtenido para cada punto de la recta se dividió en 24 alícuotas de 15 μl . Cada vez que se analizó una placa se descongeló una alícuota de cada punto de la recta patrón. A la hora de definir la recta patrón en el equipo de análisis, a cada solución patrón le asociamos el valor correspondiente a la cantidad de parásitos.

Nombre	Dilución	Volumen final	Nº de alícuotas
DIL1 (50.000 <i>pp</i>)	500 μl	450 μl	24
DIL2 (5.000 <i>pp</i>)	50 μl DIL 1+450 μl Solución B5	370 μl *	24
DIL3 (500 <i>pp</i>)	50 μl DIL 2+450 μl Solución B5	450 μl	24
DIL4 (50 <i>pp</i>)	50 μl DIL 3+450 μl Solución B5	450 μl	24
DIL5 (50 <i>pp</i>)	50 μl DIL 4+450 μl Solución B5	450 μl	24
DIL6 (0,5 <i>pp</i>)	50 μl DIL 5+450 μl Solución B5	500 μl	24

Tabla 17: Obtención de los puntos de la recta patrón.

*A partir de la DIL2 se obtiene el Control Positivo de 1.000*pp*.

Los **controles** que se utilizaron en cada ensayo fueron los siguientes:

MATERIAL Y MÉTODOS

- **Control negativo y positivo de muestra:** muestras de médula ósea y ganglio linfático negativas y positivas pertenecientes el grupo control (GC-qPCR), que se sometieron al mismo proceso de extracción que el resto de las muestras.
- **Control negativo de placa:** se utilizó la solución B5, la misma que se utiliza para diluir las muestras.
- **Control positivo de placa:** se obtiene al partir de la DIL 2 de la recta patrón. Para ello se tomaron 80µl de esta solución a la cual se le añadieron 320µl de agua MilliQ, obteniendo un volumen final de 400µl que se dividieron en alícuotas de 15µl para ser almacenadas a -80°C y utilizadas durante todo el proceso de validación.

Se utilizó la **mezcla *Leish Taq***, que contiene los “primers” (cebadores) necesarios para conseguir amplificar el ADNk de *Leishmania* presente en las muestras, a una concentración de 20µM, y una sonda (probe) TaqMan diseñada para emitir fluorescencia cuando se una a una región conservada del kinetoplasto de *Leishmania*, a una concentración de 10µM.

Las secuencias son las siguientes:

- Primer forward (Leish-1): 5´-AACTTTTCTGGTCCTCCGGGTAG-3´
- Primer reverse (Leish-2): 5´-ACCCCCAGTTTCCCGCC-3´
- Sonda Taq Man: 6-FAM-5´-AAAAATGGGTGCAGAAAT-3´-MGB

La composición de la mezcla LeishTaq necesaria para 1 pocillo es la siguiente:

- Master Mix iTaq Universal Probes Supermix 10µl
- Sonda TaqMan 0,4µl
- Leish-1 0,3µl
- Leish-2 0,3µl
- Agua MilliQ 5µl

La preparación de esta mezcla se realizó en microtubos estériles que contenían la cantidad necesaria para 50 pocillos justo antes de realizar el análisis de qPCR. Para ello

MATERIAL Y MÉTODOS

se descongelaron los reactivos necesarios (que se encontraban almacenados a -20°C) depositándolos en refrigeración (2-8°C) un mínimo de 15 minutos, siendo necesario que todos los componentes estuvieran depositados sobre hielo picado durante su preparación. La **distribución de las muestras en la placa** de 96 pocillos se hará de acuerdo con el esquema representado en la siguiente tabla, teniendo en cuenta que cada muestra se ensaya por triplicado.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	DIL1			DIL2			DIL3			DIL4		
B	DIL5			DIL6			MUESTRA 1					
C												
D												
E												
F												
G										MUESTRA 22		
H	C + (Muestra)			C - (Muestra)			C + (Placa)			C - (Placa)		

Tabla 18: Esquema de distribución de placa utilizado en los ensayos qPCR.

Durante el **proceso de preparación de la placa** permaneció refrigerada depositándola sobre un soporte con hielo y se siguen los siguientes pasos:

- Se añaden 16 µl de la mezcla LeishTaq en cada pocillo.
- Posteriormente, se añaden 4 µl de ADN en cada pocillo.
- Una vez rellena, se tapa con *film* transparente, para evitar que el contenido se evapore durante la amplificación.
- Se centrifuga la placa 2 minutos a 1250 rpm en la centrifuga Eppendorf 5430.

Para la **amplificación del ADNk**, se introdujo la placa en el equipo GEN-AG y se estableció en el software StepOne v.2.3. la distribución de las muestras y las siguientes condiciones de amplificación:

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

MATERIAL Y MÉTODOS

Criterios de aceptación

- Los **controles positivos (C+)** deben cumplir los criterios definidos para las muestras de prueba positivas (explicadas a continuación). Además, la cantidad estimada de parásitos (Q) obtenidos para el control positivo de la placa debe ser 1000 ± 250 .
- Los **controles negativos (C-)** deben cumplir los criterios definidos para las muestras de prueba negativas (explicadas a continuación)
- La **recta patrón** debe cumplir los siguientes criterios:
 - Las diluciones de la recta patrón deben cumplir que la media de los Cts obtenidos para las diluciones (DIL1-DIL6), sea <35 .
 - El coeficiente de correlación R^2 obtenido en la regresión debe ser $\geq 0,98$.
 - El valor de la pendiente pendiente de la recta debe situarse entre $-3,58$ y $-3,10$.
 - La eficiencia de la reacción debe situarse entre 90-110%.

Criterios de clasificación de las muestras

- Una muestra se considera **positiva** cuando se detecta amplificación en los tres pocillos y el valor medio del Ct es \leq al valor de Y-intercept (cantidad de ADN correspondiente a un parásito).
- Una muestra se considera **negativa** cuando no se detecta amplificación en ninguno de los tres pocillos o la media de los Ct de estos es \geq al valor del Y-intercept.
- La muestra se considera **dudosa** cuando la media de los Ct de la amplificación del triplicado se encuentre localizada entre el valor del Y-intercept + 0,1 y el Ciclo 34,99. En este caso se repetirá el análisis.

3.4.3.5. Diseño del protocolo de validación

A continuación, se describe el procedimiento experimental para cada uno de los parámetros estudiados en la validación del método qPCR. En la Tabla 19 están reflejados los parámetros analizados y las muestras que se emplearon para cada uno de estos análisis.

MATERIAL Y MÉTODOS

GRUPO	Linealidad y rango*	Exactitud	Especificidad	Sensibilidad	Precisión		Límite de detección**	Límite de cuantificación**	Robustez	Estabilidad***
					Instrumental	Repetibilidad Intermedia				
G1-qPCR	MO (+)			X		G1-12-MO-qPCR			G1-7-MO-qPCR G1-13-MO-qPCR	G1-13-MO-qPCR
	GL(+)			X		G1-12-GL-qPCR			G1-7-GL-qPCR G1-13-GL-qPCR	G1-13-GL-qPCR
G2-qPCR	MO(-)		G2-7-MO-Qpct G2-8-MO-qPCR	X		G2-7-MO-qPCR			G2-12-MO-qPCR G2-10-MO-qPCR	
	GL(-)		G2-7-GL-qPCR G2-8-MO-qPCR	X		G2-7-GL-qPCR			G2-12-GL-qPCR G2-10-GL-qPCR	
	MO				X					
G3-qPCR	GL				X					
	MO(+)								X	X
CONTROLES GC-qPCR	GL(+)								X	X
	MO(-)		X			X			X	X
	GL(-)		X			X			X	X

Tabla 19: Parámetros analizados y grupos de animales utilizados para la validación de PCR Cuantitativa a Tiempo Real.

*Se analizó cada una de las rectas patrón utilizadas a lo largo de la validación. **Se recopilaron los valores de Ct obtenidos durante todos los ensayos de validación para el último punto de la recta patrón, solución DIL6. Se realizó una estimación del límite de cuantificación a partir de los resultados obtenidos para el Límite de Detección, Precisión y Exactitud. ***Las muestras de MO y GL con codificación L/1/16 (no incluida en la tabla) se utilizó para los análisis de estabilidad del ADN de Leishmania extraído.

MATERIAL Y MÉTODOS

A. Linealidad y Rango

Se determinó el rango en el que existe una **relación lineal entre la cantidad estimada de parásitos y el ciclo umbral (Ct)** obtenido para cada muestra. El **procedimiento experimental** para el estudio de la linealidad se llevó a cabo analizando cada una de las rectas patrón utilizadas durante el periodo de validación. La recta de regresión ($y=mx+b$) obtenida de forma automática en cada ensayo qPCR contiene los **datos** que se muestran en la siguiente Tabla.

y	Ct
x	Log10 (cantidad de parásitos)
m	Pendiente
b	Ordenada de origen: indica el Ct esperado para una muestra con una cantidad de parásitos igual a 1.
R ²	Coefficiente de regresión calculado a partir de la recta patrón. Se define como la covarianza de las variables (x e y) dividida por su desviación estándar.
Cm	$Cm = [1-(Sm/m)]$; donde Sm= error estándar de la pendiente

Tabla 20: Datos de la recta de regresión obtenidos en los ensayos qPCR.

Se recopilan los valores del coeficiente de linealidad (Cm) y del coeficiente de determinación (R²), obtenidos durante todo el ensayo de validación.

El intervalo lineal debe cumplir los siguientes **criterios de aceptación**:

- El valor del coeficiente de determinación R² debe ser $\geq 0,98$.
- El valor del coeficiente de linealidad Cm de ser $\geq 95\%$.

B. Exactitud

La exactitud del método qPCR para muestras de médula ósea y ganglio linfático se evaluó a tres niveles de carga parasitaria (10.000, 1.000 y 10 parásitos estimados) considerando dos parámetros:

- El **factor de recuperación** obtenido para muestras con carga parasitaria conocida.
- Verificación de la **ausencia de contaminación durante la extracción**.

El **procedimiento experimental** para evaluar el factor de recuperación, se realizó el análisis de muestras con carga parasitaria conocida, utilizamos cantidades conocidas

MATERIAL Y MÉTODOS

de promastigotes de *L. infantum* (MCAN/ES/1996/BCN 150, zymodeme MON-1): 10.000, 1.000 y 10, se agregaron a 2 muestras negativas G2-17-MO-qPCR y G2-17-GL-qPCR, obteniendo:

- 3 muestras de médula ósea: 10.000 MO, 1.000 MO, 10 MO
- 3 muestras de ganglio linfático: 10.000 GL, 1.000 GL, 1.0 GL

La preparación de la curva estándar y las cantidades de parásito para realizar esta prueba comenzaron juntas:

- Utilizamos dos viales de 75 µl con 10⁶ parásitos. A cada uno se le agregaron 425 µl de agua MilliQ, obteniendo un volumen final de 500 µl.
- Estos dos viales se homogeneizaron por separado y se mezclaron en un solo vial, que se homogeneizó nuevamente y se dividió en dos alícuotas de 500 µl.
- Uno de estos viales se utilizó para obtener la curva de calibración y el otro para obtener los parásitos que utilizamos para evaluar el factor de recuperación en las matrices de ganglios linfáticos y médula ósea.

Para ello se realizo los siguientes pasos:

- Se agregaron 500 µl de agua MilliQ, obteniendo 1.000 µl con una concentración de 1.000 parásitos/µl. De esta solución se tomaron 105 µl más 945 µl de agua MilliQ, obteniendo 1.050 µl con una concentración final de 100 parásitos/µl. Agregamos 100 µl de esta solución a cada una de las muestras para contaminarlas con un total de **10.000 parásitos**.
- Para obtener el siguiente punto, se tomaron 105 µl de la solución anterior (1,000 parásitos/µl) y se agregaron 945 µl de agua MilliQ, obteniendo 1.050 µl con una concentración de 10 parásitos/µl. Agregamos 100 µl de esta solución a cada una de las muestras para contaminarlas con un total de **1.000 parásitos**.
- Finalmente, se tomaron 105 µl de la solución anterior (10 parásitos/µl) y se agregaron 945 µl de agua MilliQ, obteniendo la solución final con una concentración de 1 parásito/µl. Agregamos 10 µl de esta solución a cada una de las muestras para contaminarlas con un total de **10 parásitos**.

MATERIAL Y MÉTODOS

Para cada muestra y nivel de parásitos se realizaron 3 análisis, de acuerdo con el método descrito anteriormente.

Se calculó el porcentaje de recuperación a partir de la cantidad de parásitos obtenida, utilizando la siguiente fórmula:

El **análisis de los datos** consistió en calcular el porcentaje de recuperación a partir de la cantidad de parásitos obtenida, mediante la siguiente fórmula:

$$\% \textit{recuperación} = (n^{\circ} \textit{ de parásitos obtenidos} / n^{\circ} \textit{ real de parásitos}) \times 100$$

Para cada uno de los tres niveles de carga parasitaria, se calculó:

- El valor medio del porcentaje de recuperación.
- Su desviación estándar.

Para que el ensayo sea válido debe cumplir los siguientes **criterios de aceptación** respecto al porcentaje de recuperación:

- $\geq 75\%$ si la cantidad de parásitos es 10.000 ó 1.000.
- $\geq 60\%$ si la cantidad de parásitos es 10.

El **procedimiento experimental** para verificar la ausencia de contaminación durante la extracción consistió en incluir un control negativo de placa en cada ensayo de validación; este control fue una muestra de solución B5, el cual se sometió al mismo proceso de extracción que el resto de las muestras. Se recopilaron todos **valores del control negativo de placa** de cada uno de los ensayos de la validación del método qPCR, y los resultados obtenidos deben cumplir los **criterios de negatividad** reflejados en el apartado de “Criterios de clasificación de las muestras”.

C. Especificidad

Se calculó a partir del porcentaje de muestras **correctamente asignadas como negativas** a la presencia de ADNk de *L. infantum*. Para llevar a cabo el **procedimiento experimental** se analizaron las muestras pertenecientes al grupo **G2-qPCR** (Tabla 19) un total de 40 muestras, 20 negativas de ganglio y 20 negativas de médula ósea

MATERIAL Y MÉTODOS

procedentes de perros confirmados como negativos por los métodos inmunológicos ELISA SLA IgG2 e IFI. Las muestras se analizaron de acuerdo con el método descrito anteriormente en el apartado 3.4.3.4. El **análisis de datos** se realizó a partir de los resultados obtenidos para cada muestra, teniendo en cuenta los criterios de clasificación descritos anteriormente. La Especificidad del método qPCR se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Especificidad} = \left[\frac{\text{Verdaderos negativos}}{\text{Verdaderos negativos} + \text{Falsos positivos}} \right] \times 100$$

El **criterio de aceptación** definido se basa en el % de muestras correctamente identificadas como negativas, que debe ser $\geq 95\%$ para ambas matrices (médula ósea y ganglio linfático).

D. Sensibilidad

Se evaluó a partir del porcentaje de muestras de médula y ganglio **correctamente asignadas como positivas** a la presencia de ADNk de *L. infantum*. Para la realización del **procedimiento experimental** se analizaron las 40 muestras pertenecientes al grupo **G1-qPCR**, 20 muestras positivas de ganglio y 20 positivas de médula procedentes de perros confirmados como positivos por los métodos inmunológicos ELISA SLA IgG2 e IFI (Tabla 19): de acuerdo con el método descrito. El **análisis de datos** se realizó a partir de los resultados obtenidos para cada muestra, teniendo en cuenta los criterios de clasificación descritos. La sensibilidad del método qPCR se calculó aplicando la siguiente fórmula:

$$\text{Sensibilidad} = \left[\frac{\text{Verdaderos positivos}}{\text{Verdaderos positivos} + \text{Falsos negativos}} \right] \times 100$$

El **criterio de aceptación** definido se basa en el % de muestras correctamente identificadas como positivas que debe ser $\geq 95\%$ para ambas matrices.

MATERIAL Y MÉTODOS

E. Precisión

Se evaluó la **concordancia entre múltiples análisis de la misma muestra** en unas condiciones determinadas, analizando la Precisión Instrumental, Repetibilidad y Precisión Intermedia.

Mediante la Precisión Instrumental se comprobó que el equipo GEN-AG realiza lecturas de forma precisa y homogénea en cualquier zona de la placa. El **procedimiento experimental** empleado fue la lectura de 10 pocillos con ADN de la misma muestra, situados en áreas diferentes de una placa y bajo las mismas condiciones de análisis.

Las muestras utilizadas fueron las siguientes:

- **G1-12-MO-qPCR** y **G1-12-GL-qPCR**: muestras de médula ósea y ganglio positivas utilizadas, también utilizada para el análisis de sensibilidad.
- **G2-7-MO-qPCR** y **G2-7-GL-qPCR**: muestra de médula ósea y ganglio negativas también utilizadas para el análisis de especificidad.

El **análisis de los datos** consistió en la valoración de la homogeneidad de los siguientes parámetros:

- Para las muestras positivas: CV de los Ct.
- Para las muestras negativas: homogeneidad de los resultados.

Los **criterios de aceptación** definidos son los siguientes:

- Los resultados de todas las repeticiones de una muestra negativa deben ser negativos.
- Los resultados de todas las repeticiones de una muestra positiva deben ser positivos.
- El CV de las muestras positivas debe ser (Ct) <3%.

Mediante la Repetibilidad conoceremos la variabilidad prevista cuando el método se realiza bajo las mismas condiciones de análisis, mismo analista, en un solo equipo y en un corto periodo de tiempo. El **procedimiento experimental** para evaluar la Repetibilidad se llevó a cabo con las muestras del **G3-qPCR** (Tabla 19):

MATERIAL Y MÉTODOS

- **G3-1-MO-qPCR:** ADN extraído de una muestra de médula ósea positiva a *L. infantum* con alta carga parasitaria. Esta misma muestra fue una de las utilizadas para el análisis de la sensibilidad, por lo que su codificación en ese parámetro fue G1-12-MO-qPCR.
- **G3-2-MO-qPCR:** ADN extraído de una muestra de médula ósea positiva a *L. infantum* con carga parasitaria media. Esta muestra junto con las demás del grupo 1_qPCR para el análisis de sensibilidad con el código G1-11-MO-qPCR.
- **G3-3-MO-qPCR:** ADN extraído de una muestra de médula ósea negativa a *L. infantum*. Esta muestra junto con las demás del grupo G2-qPCR para el análisis de especificidad por lo que su codificación para el análisis de este parámetro también fue G2-14-MO-qPCR.
- **G3-1-GL-qPCR:** ADN extraído de una muestra de ganglio positiva a *L. infantum* con alta carga parasitaria. Esta misma muestra fue una de las utilizadas para el análisis de la sensibilidad, por lo que su codificación en ese parámetro fue G1-12-GL-qPCR.
- **G3-2-GL-qPCR:** ADN extraído de una muestra de ganglio positiva a *L. infantum* con carga parasitaria media. Esta muestra junto con las demás del grupo G1-qPCR para el análisis de sensibilidad con el código G1-11-GL-qPCR.
- **G3-3-GL-qPCR:** ADN extraído de una muestra de médula ósea negativa a *L. infantum*. Esta muestra junto con las demás del grupo G2-qPCR para el análisis de especificidad por lo que su codificación para el análisis de este parámetro también fue G2-14-MO-qPCR.

Cada una de las muestras anteriormente descritas se analizó 6 veces, es decir, utilizando 18 pocillos de la placa para cada una y siguiendo el método qPCR ya descrito. Teniendo en cuenta que para cada repetición el equipo obtiene el ciclo umbral (Ct), el **análisis de los datos** para calcular la variabilidad del parámetro consistió en:

- **Muestras positivas:** Calcular el coeficiente de variación de los 6 valores de Ct obtenidos para cada tipo de muestra.

MATERIAL Y MÉTODOS

- **Muestras negativas:** Valorar la homogeneidad de los resultados.

Los **criterios de aceptación** para la validación de la Repetibilidad del método qPCR fueron:

- Los resultados de todas las repeticiones de una misma muestra positiva deben ser positivos y el CV (Ct) <8%.
- Los resultados de todas las repeticiones de una misma muestra negativa deben ser negativos.

Para evaluar la Precisión Intermedia o la variabilidad prevista entre distintas mediciones cuando se someten a diferentes condiciones de análisis, se consideraron los siguientes parámetros: **fecha de análisis, operador, set de pipetas y lote del kit de extracción de ADN.**

El **procedimiento experimental** consistió en el análisis de las muestras del **G3-qPCR** utilizadas para la evaluación de la Repetibilidad (Tabla 19), las cuales se analizaron 7 veces, es decir, utilizando 21 pocillos de la placa para cada una y siguiendo el método qPCR ya descrito. La primera placa utilizada para evaluación de la Repetibilidad fue también considerada como el primer análisis de la evaluación de la Precisión Intermedia; los 6 análisis restantes se realizaron en placas diferentes, incluyendo las variaciones indicadas.

El **análisis de los datos** consistió en calcular el coeficiente de variación para las muestras positivas y la homogeneidad de los resultados para las negativas de los 7 valores de Ct obtenidos para cada muestra.

Los **criterios de aceptación** para la validación de la Precisión Intermedia del método qPCR fueron:

- Los resultados de todas las repeticiones de una misma muestra positiva deben ser positivos y el CV (Ct) <15%.
- Los resultados de todas las repeticiones de una misma muestra negativa deben ser negativos.

MATERIAL Y MÉTODOS

F. Límite de detección

El límite de detección se define como la cantidad o concentración mínima de una sustancia (ADNk) que se puede detectar con precisión mediante un método analítico.

Los valores de Ct superiores a 35 rozan los límites de sensibilidad del equipo GEN-AG (248). Teniendo en cuenta que las muestras del estudio se clasifican en función de la situación respecto al valor de Ct medio y del Y-intercept (cantidad de ADN correspondiente a un parásito), y de acuerdo con las recomendaciones ISO 17025 (245), el límite de detección será calculado a partir del valor medio del Y-intercept obtenido a lo largo del estudio menos tres desviaciones estándar ($X-3DE$).

G. Límite de cuantificación

El límite de cuantificación Límite de Cuantificación se define como la última dilución en la que una muestra es lineal. Su determinación se utiliza para decidir si la concentración de un analito se puede determinar o no. Currie sugirió que el Límite de Cuantificación se estableciera a una concentración con una desviación estándar pequeña suficiente para permitir la cuantificación precisa (se sugirió una desviación estándar relativa de -10) (149).

No fue necesario realizar un **procedimiento experimental** la evaluación de Límite de Cuantificación. Su **estimación** se realizó a partir de los resultados obtenidos para el Límite de Detección, Precisión y Exactitud.

Teniendo en cuenta que el nivel más pequeño estudiado en la precisión (10 parásitos) se ha evaluado correctamente con un buen nivel, podemos considerar esta cantidad teórica como un valor adecuado para Límite de Cuantificación. Además, según el artículo publicado por Currie, podemos aplicar una desviación estándar relativa de -10 para ponderar el Y-intercept (249).

MATERIAL Y MÉTODOS

H. Robustez

Se determinó el efecto de la **variación del tiempo de incubación durante la extracción** de ADN y de la **variación de la concentración LeishTaq-ADN** en la amplificación.

Para medir el efecto de la variación del tiempo de incubación, el **procedimiento experimental** se desarrolló en el mismo día, por el mismo operador y con los mismos reactivos, únicamente variando el tiempo de incubación. Se modificó el diseño experimental del proceso de extracción introduciendo variaciones de ± 2 minutos en los tiempos de incubación 1 (después de añadir la solución B1) y ± 1 minuto en el tiempo de incubación 2 (después de añadir la solución B5), según la Tabla 21.

Ensayo	Tiempo de incubación	
	1	2
1 (Estándar)	10 minutos	5 minutos
2	12 minutos	5 minutos
3	10 minutos	6 minutos
4	8 minutos	5 minutos
5	10 minutos	4 minutos

Tabla 21: Ensayos para evaluar el efecto del tiempo de incubación del método qPCR.

Se utilizaron las muestras que se muestran a continuación pertenecientes a los grupos **G1-qPCR** y **G3-qPCR** (Tabla 19) las cuales se analizaron 3 veces cada una de ellas (9 pocillos) de acuerdo con el método previamente descrito:

Muestras utilizadas para medir el efecto del tiempo de incubación:

- **G1-7-MO-qPCR** y **G1-7-GL-qPCR**: ADN extraído de muestras de médula ósea y ganglio positivas respectivamente utilizadas también utilizada para el análisis de sensibilidad.
- **G2-12-MO-qPCR** y **G2-10-GL-qPCR**: ADN extraído de muestras de médula ósea y ganglio negativas respectivamente utilizadas también utilizada para el análisis de especificidad.

MATERIAL Y MÉTODOS

El **análisis de los datos** consistió en la realización de la prueba ANOVA de las medias de la cantidad de parásitos obtenida en cada uno de los cinco ensayos para las muestras positivas de ganglio y médula ósea por separado. Para las muestras negativas se valoró la homogeneidad de los resultados.

Como **criterios de aceptación** se estableció que no hubiera diferencias significativas entre las medias obtenidas para cada ensayo ($p > 0,05$). En caso de encontrar diferencias significativas, se investigó qué casos eran diferentes. Además, los resultados de las muestras negativas debían ser negativos en todas las repeticiones.

Para medir el efecto de la variación de la concentración de LeishTaq-ADN el **procedimiento experimental** se desarrolló en un único día, por un operador y utilizando los mismos reactivos, únicamente haciendo variaciones de las cantidades de LeishTaq y ADN añadidas por pocillo. Así, se modificó el diseño experimental introduciendo variaciones de $\pm 5 \mu\text{l}$ en el volumen final de ADN y $\pm 2 \mu\text{l}$ en el volumen final de LeishTaq, según la siguiente tabla:

Ensayo	Volumen final	
	ADN	LeishTaq
1 (Estándar)	4 μl	16 μl
2	3,5 μl	14 μl
3	4,5 μl	18 μl

Tabla 22: Ensayos para valorar el efecto de la concentración LeishTaq-ADN.

Las muestras utilizadas para medir el efecto de la variación de la concentración de LeishTaq-ADN pertenecen a los grupos **G1-qPCR** y **G2-qPCR** (Tabla 19) de las cuales se analizaron 3 replicados (9 pocillos).

Muestras utilizadas para medir el efecto de la variación de la concentración de LeishTaq-ADN:

- **G1-13-MO-qPCR** y **G1-13-GL-qPCR**: ADN extraído de muestras de dos muestras de médula ósea y dos muestras ganglio positivas respectivamente y utilizadas también para el análisis de sensibilidad. Se hizo posteriormente un pull de las dos alícuotas de cada matriz.

MATERIAL Y MÉTODOS

- **G2-10-MO-qPCR** y **G2-10-GL-qPCR**: ADN extraído de dos muestras de médula ósea y dos muestras de ganglio negativas respectivamente y utilizadas también utilizada para el análisis de especificidad. Se hizo posteriormente un pull de las dos alícuotas de cada matriz.

El **análisis de los datos** consistió en la realización de la prueba ANOVA de las medias de la cantidad de parásitos obtenida en cada uno de los tres ensayos para las muestras positivas de ganglio y médula ósea por separado. Para las muestras negativas se valoró la homogeneidad de los resultados y se consideran los mismos **criterios de aceptación** de resultados los considerados en ensayo anterior.

I. Estabilidad

La capacidad de las muestras para mantener sus propiedades iniciales se comprobó teniendo en cuenta las siguientes condiciones:

- *Conservación a -80°C de alícuotas de la Recta Patrón DIL1-DIL6.*
- *Conservación a -80°C del Control + y Control – de muestra.*
- *2 ciclos de congelación a -80°C / descongelación*
- *Conservación a -80°C de una muestra de tejido.*
- *Conservación a -80°C de muestras de ADN extraído.*
- *Conservación de una muestra de tejido en refrigeración (2-8°C).*

El **procedimiento experimental** para evaluar la Conservación a -80°C de alícuotas de la Recta Patrón DIL1-DIL6 comenzó al inicio del proceso de validación mediante la extracción de los puntos para la recta patrón con el procedimiento explicado al inicio del apartado 3.4.3.4. para el método qPCR. Se consideró tiempo cero (t=0), el primer análisis de la validación. En los ensayos sucesivos se utilizaron alícuotas de la recta patrón que permanecieron congeladas a -80°C.

El **análisis de los datos** consistió en recopilar el valor de la pendiente de las rectas de calibración obtenidas durante todo el proceso de validación, a excepción de los puntos correspondientes a la estabilidad a largo plazo (6, 12 y 24 meses). Deben **cumplir los**

MATERIAL Y MÉTODOS

criterios de aceptación descritos para descritos en las generalidades del método qPCR.

El **procedimiento experimental** para evaluar la Conservación a -80°C del Control + y Control – de muestra comenzó al inicio del proceso de validación, considerando t=0, el primer análisis de la validación. En los ensayos sucesivos se utilizaron alícuotas de estos controles que permanecieron congeladas a -80°C.

El **análisis de los datos** consistió en recopilar los valores de Ct de los controles positivos y negativos de muestra obtenidos durante todo el proceso de validación, a excepción de los puntos correspondientes a la estabilidad a largo plazo (6, 12 y 24 meses). Deben **cumplir los criterios de clasificación de las muestras** descritos en las generalidades del método qPCR.

Para el desarrollo del **procedimiento experimental** que permita evaluar la estabilidad de las muestras sometidas a 2 ciclos de congelación a -80°C / descongelación, se utilizaron nueve alícuotas de las muestras representadas en la Tabla 19. A continuación, se representa mediante la siguiente tabla los ensayos realizados.

MATERIAL Y MÉTODOS

<p>9 alícuotas G1-13-MO-qPCR</p>	<p>t=0: 3 alícuotas de cada matriz recién obtenidas y mantenidas en refrigeración (12 horas).</p> <p>1 ciclo congelación/descongelación (tres alícuotas de cada matriz):</p> <ul style="list-style-type: none"> - Conservación -80°C mínimo 12 horas/descongelación/análisis <p>2 ciclos congelación/descongelación (3 alícuotas de cada matriz)</p> <ul style="list-style-type: none"> - Conservación -80°C mínimo 12 horas/descongelación - Congelación -80°C mínimo 12 horas/análisis
<p>9 alícuotas G1-13-G-qPCR</p>	<p>t=0</p>

Tabla 23: Resumen de los ensayos para valorar la Estabilidad del método qPCR.

El **análisis de los datos** para evaluar la estabilidad de este ensayo consistió en el cálculo del porcentaje de variación de los resultados de la cantidad de parásitos (Q) de dichas muestras tras realizar el experimento descrito anteriormente. La fórmula utilizada fue:

$$\text{Porcentaje de variación (\%)} = \left[1 - \frac{q(t=x)}{q(t=0)} \right] \times 100$$

q (t=x): Cantidad de parásitos media a t=x

q. (t=0): Cantidad de parásitos media a t=0

Para validar el ensayo los resultados obtenidos deben cumplir los siguientes **criterios de aceptación**:

- Todos los resultados obtenidos deben ser positivos.
- El % de variación para la cantidad de parásitos media obtenida tras 2 ciclos congelación/descongelación debe ser como máximo del 25%, es decir, se debe recuperar al menos el 75% de la cantidad obtenida para la muestra de referencia (t=0).

El **procedimiento experimental** para evaluar la Conservación a -80°C de una muestra de tejido, se tomaron 15 alícuotas de cada una de las siguientes muestras:

- **G1-13-MO-qPCR:** muestras de médula ósea positiva a *L. infantum*.
- **G1-13-GL- qPCR:** muestra de ganglio linfático a *L. infantum*.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se tomó como valor a tiempo 0 (t=0) de cada muestra el primer resultado (valor medio de tres análisis =9 pocillos) de ésta obtenido durante el estudio de validación.

Las otras 12 alícuotas de cada muestra se conservaron a -80°C y se analizaron de tres en tres y de acuerdo con el método descrito, a distintos tiempos: 15 días, 6 meses, 12 meses y 24 meses, respectivamente.

El **análisis de los datos** para evaluar la estabilidad de este ensayo consistió en el cálculo del porcentaje de variación de los resultados, a distintos tiempos de análisis, de la cantidad estimada de parásitos de dichas muestras respecto al tiempo 0 (t=0). Para ello se utilizó la misma fórmula que para el experimento anterior y cuyos resultados debían cumplir los mismos criterios de aceptación (resultados positivos cuyo % de variación para la cantidad de parásitos media obtenida deberá ser como máximo del 25%).

La estabilidad del ADN de *Leishmania* extraído de muestras de médula ósea y ganglio se evaluó después de un período de congelación de almacenamiento a largo plazo (a -80 ° C). El **procedimiento experimental** para evaluar la conservación a -80°C de ADN de las matrices ganglio linfático y médula ósea positivas para *L. infantum* y conservadas a -80°C durante 3, 6, 9, 12, 18, 24, 30, 36, 42, 48 meses, t= 0.

Para este experimento se utilizó ADN extraído de muestras de ganglios linfáticos y médula ósea de un perro infectado con *L. infantum* con código **L1/16**.

- **L1/16-MO-qPCR:** muestra de médula ósea recogida por punción external según el procedimiento ya descrito se dispensó en tubos EDTA k3 y se almacenó a -80°C en 10 partes alícuotas del volumen utilizado (50 µl) en el proceso de extracción.
- **L/16-GL-qPCR:** muestra de ganglios linfáticos recogidas durante la necropsia y almacenado a -80°C. El nodo fue procesado y dividido en 10 partes alícuotas de 100 µl (el volumen utilizado en el proceso de extracción).

Para cada una de las matrices, el ADN de las 10 alícuotas se extrajo siguiendo el procedimiento ya descrito. El ADN total obtenido (1 ml = 10 alícuotas de 100 µl de ADN

MATERIAL Y MÉTODOS

eluido en solución B5) se homogeneizó para reducir la variabilidad y se repartió en 14 alícuotas de 45 µl y se almacenó a -80°C, los tiempos indicados.

Se tomó como valor a tiempo 0 (t=0) el resultado de cada una de las muestras recién extraídas y analizadas (valor medio de tres análisis =9 pocillos).

El **análisis de los datos** para evaluar la estabilidad de este ensayo consistió en el cálculo del porcentaje de variación de los resultados, a distintos tiempos de análisis, de la cantidad estimada de parásitos de dichas muestras respecto al tiempo 0 (t=0), utilizando la misma fórmula y **criterios de aceptación** que en resto de experimentos realizados para validar la estabilidad de las muestras analizadas mediante qPCR (resultados positivos cuyo %de variación para la cantidad de parásitos media obtenida deberá ser como máximo del 25%).

El **procedimiento experimental** para evaluar la Conservación de una muestra de tejido en refrigeración (2-8°C), se tomaron 6 alícuotas de cada una de las siguientes muestras:

- **G1-13-MO-qPCR:** muestras de médula ósea positiva a *L. infantum*.
- **G1-13-GL- qPCR:** muestra de ganglio linfático a *L. infantum*.

Tres de las alícuotas recientemente obtenidas y mantenidas en refrigeración, se analizaron siguiendo el método descrito utilizando 9 pocillos, tomando su valor medio como t=0.

Las otras 3 alícuotas de esta muestra ser conservaron a 2-8°C durante 24 horas y pasado ese tiempo se analizaron de acuerdo con el método descrito.

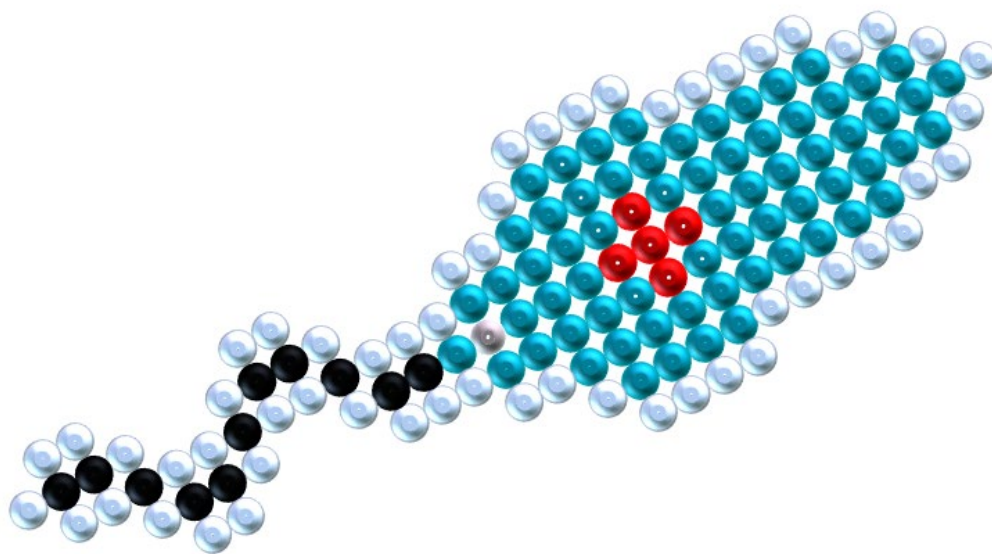
El **análisis de los datos** para evaluar la estabilidad de este ensayo consistió en el cálculo del porcentaje de variación de los resultados de la cantidad estimada de parásitos de dichas muestras tras 24 horas en refrigeración respecto al tiempo 0 (t=0). utilizando la misma fórmula y **criterios de aceptación** que en resto de experimentos realizados para validar la estabilidad de las muestras analizadas mediante qPCR (resultados positivos cuyo %de variación para la cantidad de parásitos media obtenida deberá ser como máximo del 25%, es decir, se debe recuperar al menos el 75% de la cantidad obtenida para la muestra de referencia (t=0).

3.5. Desarrollo de un sistema de diagnóstico múltiple

Gracias a la consecución del primer objetivo general de la presente tesis doctoral que plantea la validación de los métodos anteriormente descritos, y empleando las técnicas validadas como métodos de referencia, proponemos como **segundo objetivo general** desarrollar un **“Sistema de diagnóstico múltiple para la detección y seguimiento de perros infectados por *L. infantum*”**. Han sido varias investigaciones realizadas por el grupo LeishmanCeres, las que, utilizando estos métodos de referencia, han puesto en evidencia la idoneidad en el uso de otras muestras no invasivas para el diagnóstico y seguimiento de la LCan.

En la presente memoria de tesis se incluyen resultados previos al desarrollo de un sistema de diagnóstico múltiple, publicados en formato artículo en la revista *Veterinary Parasitology* en el año 2019, titulado *“Application of qPCR method to hair and cerumen samples for the diagnosis of canine leishmaniosis in Araçatuba, Brazil”*. Estas y otras investigaciones realizadas durante más de 30 años han hecho posible el desarrollo y la comercialización del MultiLeish 5D, que tal y como figura en el apartado de resultados y como se indica en el dossier, combina 5 diagnósticos específicos y sensibles en un solo sistema a partir de tres muestras (sangre, pelo e hisopado dermomucoso) obtenidas fácilmente y con gran estabilidad en los soportes utilizados.

Por último, como parte de los resultados obtenidos tras aplicar el MultiLeish 5D en clínicas veterinarias de gran parte del territorio español, se presenta el artículo publicado en el año 2020 en la revista *Argos* y titulado *“MultiLeish 5D: un novedoso sistema multidiagnóstico fiable de la leishmaniosis canina con valor pronóstico”*.



RESULTADOS

4. RESULTADOS

El primer objetivo general de la presente Tesis Doctoral, que es la validación de técnicas aplicadas al diagnóstico de la LCan (considerando las inmunológicas ELISA e IFI y la parasitológicas o molecular qPCR) ha reportado los resultados que se muestran a continuación para cada uno de los parámetros que plantean los objetivos específicos propuestos.

4.1. Resultados validación ELISA SLA

A continuación, se exponen los resultados obtenidos que, tras aplicar la metodología descrita en el epígrafe 3.4.1. ELISA SLA IgG2, ha permitido validar este método inmunoenzimático para el diagnóstico de la LCan, centrado la investigación en los atributos de **Linealidad, Especificidad, Sensibilidad, Precisión, Robustez y Estabilidad**, utilizando muestras de suero de perros a cuyas características y codificación se hace referencia en el epígrafe Tabla 6.

Los resultados se representan en tablas simplificadas para facilitar la lectura y comprensión de estos, los cuales se representan como un valor normalizado de las densidades ópticas, es decir, como reactividad de cada muestra con respecto al control positivo.

4.1.1. Linealidad y rango

Tras aplicar la metodología descrita en el epígrafe “3.4.1.5. Diseño del protocolo de validación (A)”, los resultados de Linealidad obtenidos tras realizar las 16 **diluciones seriadas** de sueros para cada una de las muestras estudiadas (Tablas 3 y 6), han determinado el rango en el cual existe una relación lineal entre la concentración de anticuerpos en el suero y la densidad óptica obtenida y aseguran que en el rango lineal los resultados son proporcionales a la concentración de inmunoglobulina IgG2 en las muestras analizadas. A continuación, se representan los resultados obtenidos respecto a la curva de regresión para cada una de las muestras estudiadas y los valores

RESULTADOS

obtenidos para el rango de dilución empleado. Los datos obtenidos se muestran a continuación en la Tabla 24 y la Figura 19.

Curva de regresión; Titulación de sueros de 1/25 a 1 / 819,200:

- **GC(+)-SLA:**
 - $y = -0.198x + 2.38$
 - $R^2 = 0.98$
 - $\sigma = 0.051$
 - rango lineal: 1/800 - 1/102,400
- **G6-2-SLA (S2):**
 - $y = -0.176x + 1.487$
 - $R^2 = 0.99$
 - $\sigma = 0.026$
 - rango lineal: 1/50 - 1/1,600
- **GC(-)-SLA (S3):**
 - $y = -0.154x + 1.097$
 - $R^2 = 0.95$
 - $\sigma = 0.036$
 - rango lineal: 1 /25 - 1/400

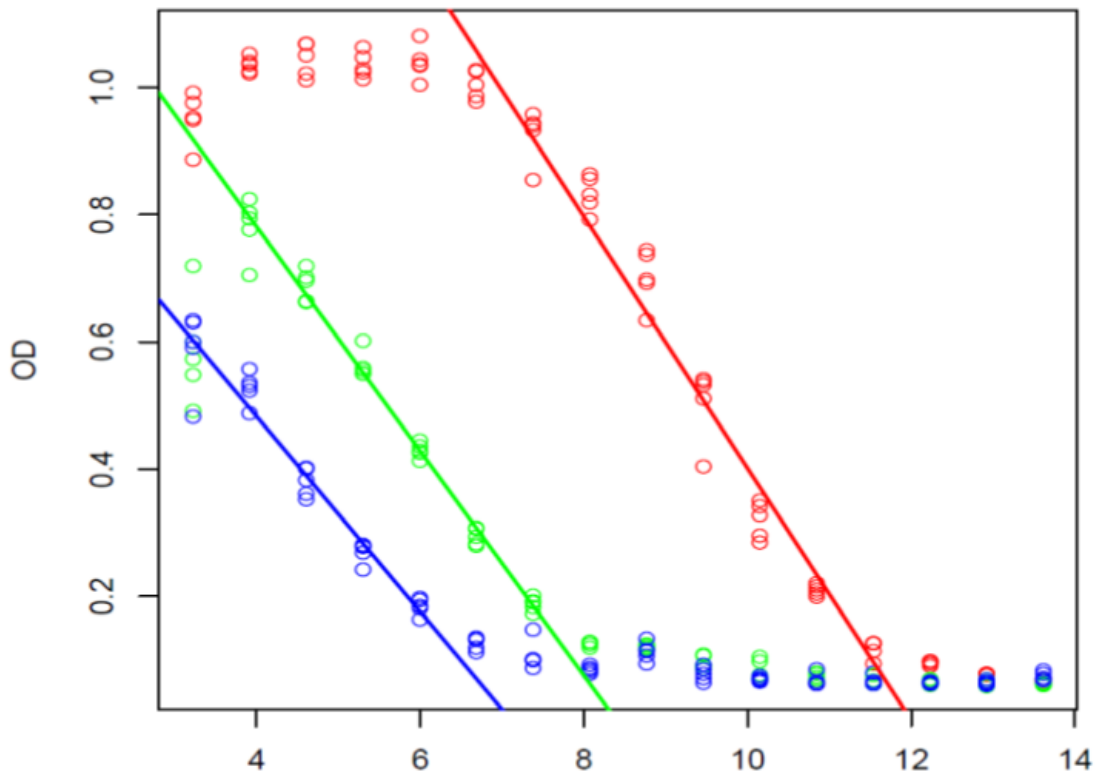


Figura 19: Curva de calibración con suero GC(+)-SLA (rojo) en comparación con G6-2-SLA (verde) y GC(-)-SLA (azul).

RESULTADOS

LINEALIDAD										
Muestra	Rango de linealidad (1/x)	Regresión lineal	Media		R ²	*Criterio de aceptación *	Error (%)	*Criterio de aceptación*	Cumple	
			D.O.	D.O.						
GC(+)-SLA	800	Slope:- 0,198 Intercept: 2,38	1,004	1,056	0,98		4,9		SI	
	1.600		0,926	0,919			0,8		SI	
	3.200		0,832	0,782			6,5		SI	
	6.400		0,702	0,645			8,8		SI	
	12.800		0,505	0,507			0,4		SI	
	25.600		0,320	0,370			13,5		SI	
	51.200		0,210	0,233			9,9		SI	
	102.400		0,117	0,096			22,6		NO	
	50		0,781	0,798			2,2		SI	
	100		0,689	0,676			1,8		SI	
G6-2-SLA	200	Slope:- 0,176 Intercept: 1,487	0,564	0,554	0,99		1,6		SI	
	400		0,430	0,433			0,5		SI	
	800		0,294	0,311			5,3		SI	
	1.600		0,188	0,189			0,3		SI	
	25		0,588	0,601			2,2		SI	
	50		0,527	0,495			6,6		SI	
GC(-)-SLA	100	Slope:- 0,154 Intercept: 1,097	0,380	0,388	0,95		2,0		SI	
	200		0,270	0,281			4,0		SI	
	400		0,184	0,174			5,8		SI	

Tabla 24: Resultados de validación del parámetro linealidad y rango para el método ELISA SLA.

*El intervalo lineal debe cumplir los siguientes criterios de aceptación:

- El coeficiente de determinación R², debe ser ≥ 0,95.
- El error debido al ajuste para cada de los puntos, calculado con la fórmula siguiente, debe ser < 20%

RESULTADOS

Como se puede observar en la tabla anterior, en las muestras con positividad alta, media y negativas los rangos de linealidad son diferentes. Así, para muestras con alta reactividad como la GC(+)-SLA la linealidad se cumple desde las diluciones 1/800 a 1/102,400 siendo la $R^2=0,98$. Para muestras de reactividad media/baja como G6-2-SLA, observamos linealidad para las diluciones de 1/50 a 1/1,600 siendo la $R^2=0,99$. Por último, para muestras negativas como GC(-)-SLA la linealidad se encuentra para diluciones de 1/25 - 1/400 siendo la $R^2=0,95$. Por lo tanto, se puede afirmar que técnica inmunológica ELSA SLA cumple con los criterios de Linealidad y rango establecidos, con la excepción de la dilución 1/102,400 para la muestra GC(+)-SLA, probablemente debido a la variabilidad que se produce a altas diluciones de suero, es decir, esto se debe a que tiene una alta concentración de anticuerpos y por lo tanto los valores obtenidos de D.O. para cada dilución son similares.

Para obtener un rango lineal, sería necesario hacer diluciones superiores a 1/400. Sin embargo, es importante resaltar que este hecho no causa interferencia en las determinaciones cualitativas (ausencia o presencia de anticuerpos específicos contra *Leishmania*).

4.1.2. Especificidad

Los resultados de Especificidad del método ELISA SLA IgG2, obtenidos tras aplicar la metodología descrita en el epígrafe "3.4.1.5. Diseño del protocolo de validación (B)", en la que se analizaron muestras negativas (Tablas 3 y 6) con diferentes características (Beagles experimentales, de cualquier raza y de cualquier raza con otras patologías), se representan en la siguiente tabla (Tabla 25) y se basan en el porcentaje de muestras negativas correctamente identificadas, teniendo en cuenta el *cut-off* establecido para cada grupo de animales.

RESULTADOS

ESPECIFICIDAD				
Muestras	Cut-off	Resultados	*Criterios de aceptación	Cumplimiento del criterio
G1-SLA (n=30)	0,586	97,5%	≥ 90% Cut-off: DO < 0,586	SI
G2-SLA (n=30)	0,437	100%	≥ 80% Cut-off: DO < 0,437	SI
G3-SLA (n=10)	0,437	100%		SI

Tabla 25: Resultados de validación del parámetro especificidad para el método ELISA SLA.

*Los **criterios de aceptación** se basan en el porcentaje de muestras negativas con resultado correcto:

- La especificidad debe ser de al menos del **90%** para perros experimentales.
- Para perros infectados en condiciones naturales y que tienen más probabilidad de presentar reacción cruzada con otros patógenos, la especificidad debe ser de al menos el **80%**.

Como se puede observar en la tabla anterior, la Especificidad del método ELISA SLA IgG2 en perros experimentales sanos (G1-SLA) es del 97.5% \geq 90%, y en perros naturales sanos (G2-SLA) y con otras patologías (G3-SLA) del 100% \geq 80%, es decir, se cumplen los criterios de aceptación establecidos para todos los grupos de animales en los que el *cut-off* debía ser de DO <0.586 y DO <0,437, respectivamente.

4.1.3. Sensibilidad

Los resultados del estudio de la Sensibilidad del método ELISA SLA IgG2, obtenidos tras aplicar la metodología descrita en el epígrafe “3.4.1.5. Diseño del protocolo de validación (C)”, en el que se analizaron muestras positivas (Tablas 3 y 6) con diferentes características, Beagles experimentales, de cualquier raza), se representan en la siguiente tabla (Tabla 26). Estos resultados muestran el porcentaje de muestras positivas correctamente identificadas, teniendo en cuenta el *cut-off* establecido para cada grupo de animales que fue el mismo que los obtenidos para la Especificidad.

RESULTADOS

SENSIBILIDAD				
Muestras	Cut-off	Resultados	*Criterios de aceptación	Cumplimiento del criterio
G4-SLA (n=20)	0,586	75%	≥ 70%	SI
G5-SLA (n=30)	0,437	100%	≥ 90%	SI

Tabla 26: Resultados de validación del parámetro sensibilidad para el método ELISA SLA.

*Los **criterios de aceptación** se basan en el porcentaje de muestras positivas con resultado correcto, teniendo en cuenta el *cut-off* establecido para los perros naturales o experimentales infectados.

- La Sensibilidad para los perros infectados experimentalmente debe ser al menos del **70%**.
- Para los perros infectados naturalmente debe ser **≥ 90%**.

Como se observa en la tabla el método ELISA SLA IgG2 es 100% sensible para los 30 perros naturalmente infectados (G5-SLA) y 75% sensible en perros los 20 experimentalmente infectados (G4-SLA), analizados por el método, cumpliéndose, por tanto, los criterios de aceptación establecidos para ambos grupos. Sin embargo, las diferencias encontradas en cuanto a la sensibilidad del método entre ambos grupos pueden explicarse debido a que el tiempo de infección transcurrido entre estos animales es diferente. El grupo de animales infectados naturalmente corresponde a infecciones ya establecidas durante meses o años y en estos el método ELISA SLA resulta totalmente sensible. Sin embargo, los animales del grupo experimental también incluyen infecciones recientes de pocas semanas de evolución.

4.1.4. Precisión

Los resultados de Precisión del método ELISA SLA IgG2 muestran la proximidad entre una serie de mediciones, obtenidas tras múltiples análisis de la misma muestra sometidos a diferentes situaciones, tal y como se describe en el epígrafe “3.4.1.5. Diseño del protocolo de validación (D)”.

A continuación, se exponen los resultados de los tres niveles de precisión considerados:

precisión instrumental, repetibilidad y precisión intermedia.

4.1.4.1. Precisión Instrumental

Los resultados obtenidos de variabilidad de las medidas proporcionadas por el Lector de Placas ELISA Sunrise (212-LEE), tras leer 10 veces una misma placa una vez que

RESULTADOS

se detuvo la reacción, se representan en la siguiente tabla como el CV de los 10 resultados obtenidos para las muestras **GC(+)-SLA**, **GC(-)-SLA**, muestra en **blanco** y otra con reactividad media **G6-2-SLA**.

PRECISIÓN INSTRUMENTAL					
Muestras	Media DO	DE	Resultados (CV)	*Criterio de aceptación	Cumplimiento del criterio
GC(+)-SLA	1,223	0,0084	0,7%	<3%	SI
GC(-)-SLA	0,278	0,0014	0,5%		SI
G6-2-SLA	0,857	0,0033	0,4%		SI
Blanco(PBS)	0,094	0,0021	2,2%		SI

Tabla 27: Resultados de validación del parámetro precisión instrumental para el método ELISA SLA.

*Como **criterios de aceptación** se estableció que el CV debe ser <3%.

Como se observa en la anterior tabla de resultados, el CV de las lecturas repetidas de cada una de las muestras estudiadas, cumplen con los criterios de aceptación establecidos. Así, el CV obtenido para las lecturas del GC(+)-SLA es del 0,7%, las del suero con reactividad media G6-2-SLA es del 0,4%, las del GC(-)-SLA tienen un CV del 0,5% y las de los blancos del 2,2%. La mayor variabilidad observada en la lectura del Blanco o Control del conjugado puede explicarse teniendo en cuenta que la reacción de la enzima y el sustrato pueden seguir reaccionando una vez parada la reacción, aunque de forma mínima y, por tanto, no afecta a la presión del método para el resto de los grupos.

4.1.4.2. Repetibilidad

Los resultados de Repetibilidad muestran la variabilidad del método al realizarlo bajo las mismas condiciones de análisis, es decir, por un solo operador, usando el mismo equipo, en un corto período de tiempo y en el mismo día en muestras con diferentes niveles de reactividad (Tablas 3 y 6). Se representan en la siguiente tabla como el CV de los 10 resultados obtenidos para cada una de las muestras.

RESULTADOS

PRECISIÓN REPETIBILIDAD					
Muestras	Media DO	DE	Resultados (CV)	*Criterio de aceptación	Cumplimiento del criterio
G6-1-SLA	0,984	0,037	3,7%	<10%	SI
G6-2-SLA	0,812	0,044	5,5%	<25%	SI
G6-3-SLA	0,330	0,023	6,9%	<35%	SI
G6-4-SLA	0,164	0,009	5,3%	<35%	SI

Tabla 28: Resultados de validación del parámetro repetibilidad para el método ELISA SLA.

*Se definieron los siguientes **criterios de aceptación**:

- Los resultados de diferentes repeticiones de las muestras deben ser homogéneos.
- El coeficiente de variación debe ser:
 - < 10% para muestras de alta reactividad.
 - < 25% para muestras de reactividad media.
 - < 35% para muestras de reactividad baja o nula.

Como se observa en la tabla anterior, los resultados obtenidos respecto al CV de las medias DO de las 10 repeticiones de cada una de las muestras analizadas, cumplen con los criterios de aceptación establecidos. El suero con alta reactividad (G6-1-SLA) presenta un CV del 3,7%, el de reactividad media G6-2-SLA del 5,5% el de baja reactividad (G6-3-SLA) del 6,9% y el suero negativo del 5,3%. La aparente discrepancia entre los criterios de aceptación y los resultados obtenidos se debe a que se decidió que estos criterios debían ser amplios, especialmente para muestras de reactividad baja o negativa.

4.1.4.3. Precisión intermedia

Los últimos resultados obtenidos del atributo Precisión, corresponden a la Precisión Intermedia, los cuales expresan la variabilidad del método tras realizarse en diferentes condiciones de operación. Tal y como se ha descrito en la Tabla 7 de material y métodos, se realizaron 10 ensayos incluyendo variaciones en el operador, día de análisis, lote de tapizado de placas, juego de pipetas, lote de tampón PBS10X y lote de tampón citrato-fosfato y utilizando las mismas muestras en el ensayo anterior (Tablas 3 y 6). Los CV de los 10 resultados obtenidos para cada una de las muestras se representan en la siguiente tabla.

RESULTADOS

PRECISIÓN INTERMEDIA					
Muestras	Media DO	DE	Resultados (CV)	*Criterio de aceptación*	Cumplimiento del criterio
G6-1-SLA	1,010	0,051	5,1%	<20%	SI
G6-2-SLA	0,878	0,069	7,9%	<30%	SI
G6-3-SLA	0,441	0,060	13,7%	<40%	SI
G6-4-SLA	0,196	0,026	13,4%	<40%	SI

Tabla 29: Resultados de validación del parámetro precisión intermedia para el método ELISA SLA.

***Criterios de aceptación:**

- Los resultados de diferentes repeticiones de las muestras deben ser homogéneos para cada muestra.
- El coeficiente de variación (CV) debe ser:
 - < 20% para muestras de alta reactividad.
 - < 30% para muestras de reactividad media.
 - < 40% para muestras de reactividad baja o nula.

Como se puede observar en la tabla anterior, los resultados obtenidos cumplen con los criterios de aceptación establecidos, siendo los 10 ensayos con la muestra de alta reactividad (G6-1-SLA) y media (G6-2-SLA) los que menor CV presentan, siendo del 5,1% y del 7,9% respectivamente. Nuevamente, la discrepancia entre los criterios de aceptación y los resultados obtenidos se debe a que se decidió que estos criterios debían ser amplios, especialmente para muestras de reactividad baja (G6-3-SLA) o negativa (G6-4-SLA), en las que el CV ha sido del 13,7% y 13,4%, respectivamente.

4.1.5. Robustez

Los resultados de Robustez de la técnica ELISA SLA IgG2, ponen en evidencia la capacidad del método para permanecer inalterable cuando se realizan variaciones pequeñas pero deliberadas, por lo que brinda una idea de su confiabilidad para el uso rutinario. Tal y como se describe en el epígrafe “3.4.1.5. Diseño del protocolo de validación (E)”, la solidez de este método analítico se determinó estudiando las variaciones en los tres parámetros que se exponen a continuación: **tiempo de incubación, temperatura de incubación y lote de antígenos** y cuyos resultados se muestran en las Tablas 30, 31 y 32.

RESULTADOS

4.1.5.1. Efecto del tiempo de incubación

Los resultados reportados por el método tras modificar el diseño experimental, introduciendo variaciones en los tiempos de incubación tal y como se muestra en la metodología descrita en la Tabla 8 del apartado material y métodos, se representan en la siguiente tabla de resultados mediante el valor ANOVA (p-valor) obtenido de las medias de las D.O. obtenidas, de cada muestra en cada uno de los 5 ensayos, comprobando así si existen diferencias significativas ($p \leq 0,05$), para cada muestra en cada ensayo y entre los ensayos.

RESULTADOS

ROBUSTEZ (TIEMPO DE INCUBACIÓN)																
Muestras	ENSAYO 1 Estándar		ENSAYO 2 30 min. 1 ^a incubación		ENSAYO 3 30 min. 2 ^a incubación		ENSAYO 4 40 min. 1 ^a incubación		ENSAYO 5 40 min. 2 ^a incubación		1 vs 2	1 vs 3	1 vs 4	1 vs 5	ANOVA (p-valor) Intergrupos	*Cumple
	Media DO	DE	Media DO	DE	Media DO	DE	Media DO	DE	Media DO	DE	p-valor	p-valor	p-valor	p-valor		
G6-1-SLA	1,066	0,037	1,030	0,011	1,004	0,013	1,011	0,042	1,073	0,032	0,342	0,027	0,061	0,994	0,003	NO
G6-2-SLA	0,836	0,027	0,917	0,031	0,947	0,048	0,796	0,031	0,852	0,008	0,005	<0,001	0,301	0,930	< 0,001	NO
G6-3-SLA	0,388	0,028	0,538	0,015	0,522	0,033	0,336	0,024	0,355	0,034	<0,001	<0,001	0,054	0,373	< 0,001	NO
G6-4-SLA	0,162	0,007	0,263	0,012	0,253	0,007	0,155	0,009	0,157	0,004	< 0,05	< 0,05	> 0,05	0,001	0,001	NO

Tabla 30: Resultados de validación del parámetro robustez, efecto del tiempo de incubación, para el método ELISA SLA.

*Como criterios de aceptación se estableció que no debe haber diferencias significativas entre las medias de D.O. obtenidas para cada ensayo (p >0,05)

RESULTADOS

Los resultados muestran diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$) globales de las D.O. normalizadas entre los cinco ensayos y para las cuatro muestras que representan diferentes niveles de reactividad. Además, las comparaciones individuales de los ensayos 2 a 5 con las condiciones estándar (ensayo 1) confirmaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) para la mayoría de las muestras, en concreto G6-1-SLA $p=0,003$; G6-2-SLA $p < 0,001$; G6-3-SLA $p < 0,001$; G6-4-SLA $p=0,001$. Así, el método no se considera robusto para una modificación de ± 5 minutos en los tiempos de incubación. En consecuencia, el control estricto de los parámetros implementados en el procedimiento de trabajo (PNT) se debe mantener en el uso rutinario.

4.1.5.2. Efecto de la temperatura de incubación

Los resultados reportados por el método tras modificar el diseño experimental, introduciendo variaciones en la temperatura de incubación tal y como se muestra en la Tabla 9 del apartado material y métodos, se muestran en la siguiente tabla de resultados en la que se representa el valor ANOVA (p-valor) obtenido de las medias de las D.O. obtenidas, de cada muestra en cada uno de los 5 ensayos, para comprobar así si existen diferencias significativas ($p \leq 0,05$), para cada muestra en cada ensayo y entre los ensayos.

RESULTADOS

ROBUSTEZ (TEMPERATURA DE INCUBACIÓN)																
Muestras	ENSAYO 1 Estándar		ENSAYO 2 35°C. 1ª incubación		ENSAYO 3 35°C 2ª incubación		ENSAYO 4 39°C 1ª incubación		ENSAYO 5 39°C. 2ª incubación		1 vs 2	1 vs 3	1 vs 4	1 vs 5	ANOVA (p-valor) Intergrupos	*Cumple
	Media DO	DE	Media DO	DE	Media DO	DE	Media DO	DE	Media DO	DE	p-valor	p-valor	p-valor	p-valor		
G6-1-SLA	1,066	0,037	1,064	0,028	1,107	0,060	1,181	0,071	1,057	0,029	1,000	0,667	0,009	0,999	0,003	NO
G6-2-SLA	0,836	0,027	0,904	0,023	0,840	0,061	0,921	0,111	0,767	0,018	0,023	1,000	0,666	0,014	0,004	NO
G6-3-SLA	0,388	0,028	0,470	0,022	0,367	0,045	0,424	0,041	0,497	0,015	0,005	0,839	0,397	<0,001	<0,001	NO
G6-4-SLA	0,162	0,007	0,189	0,020	0,146	0,005	0,159	0,011	0,203	0,025	0,204	0,031	0,999	0,118	0,001	NO

Tabla 31: Resultados de validación del parámetro robustez, efecto de la temperatura de incubación, para el método ELISA SLA.
*Como criterios de aceptación se estableció que no debe haber diferencias significativas entre las medias de D.O. obtenidas para cada ensayo (p >0,05)

RESULTADOS

Los resultados obtenidos muestran diferencias estadísticamente significativas globales ($p < 0.05$) de las DO normalizadas entre los cinco ensayos y para las cuatro muestras que representan diferentes niveles de reactividad. Además, las comparaciones individuales de los ensayos 2 a 5 con las condiciones estándar (ensayo 1), también confirman diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) para la mayoría de estas variaciones de temperaturas de incubación, en concreto G6-1-SLA $p=0,003$; G6-2-SLA $p=0,004$; G6-3-SLA $p=<0,001$ y G6-4-SLA $p=0,001$. Por lo tanto, en base a estos resultados podemos decir que el método no se considera robusto para una modificación de $\pm 2^{\circ}\text{C}$ en la temperatura de incubación. En consecuencia, el control estricto de los parámetros implementados en nuestra estandarización incluidos en el procedimiento o PNT se mantendrá para uso de rutina.

4.1.5.3. Efecto del parámetro lote de antígeno

Los resultados del último ensayo que evidencian la Robustez del método ELISA SLA IgG2, muestran el efecto del dos lotes de antígeno diferentes para el tapizado de placas. Se utilizaron las mismas muestras que en los ensayos anteriores (Tabla 3 y 6) las cuales se analizaron tal y como se describe en el apartado de material y métodos. La siguiente tabla muestra los resultados del análisis estadístico mediante es test t de Student para cada tipo de muestra, lo cual ha permitido verificar la existencia de diferencias estadísticas significativas entre las densidades ópticas, obtenidas para cada lote de antígenos.

RESULTADOS

ROBUSTEZ (LOTE DE ANTÍGENO)						
Muestras	Lote 1 Estándar		Lote 2		Lote 1 Vs Lote 2 (p-valor)	*Cumple
	Media DO	DE	Media DO	DE		
G6-1-SLA	1,066	0,037	1,050	0,023	0,356	SI
G6-2-SLA	0,836	0,027	0,800	0,012	0,065	SI
G6-3-SLA	0,388	0,028	0,343	0,030	0,009	NO
G6-4-SLA	0,162	0,007	0,182	0,017	0,016	NO

Tabla 32: Resultados de validación del parámetro robustez, efecto del lote de antígeno, para el método ELISA SLA.

*Como **criterios de aceptación** se estableció que no debe haber diferencias significativas entre las medias de D.O. obtenidas para cada ensayo ($p > 0,05$)

Los resultados obtenidos muestran diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$) de la D.O. normalizada para muestras de baja reactividad G6-3-SLA ($p=0,009$) y negativa G6-4-SLA ($p=0,016$), probablemente debido a interferencias causadas por escasa o nula presencia de anticuerpos al analizar este tipo de muestras (reactivo bajo y negativo).

En consecuencia, aunque se han observado las diferencias, en muestras reactivas y negativas bajas, el control estricto del lote de antígenos se debe mantener para el uso rutinario en todos los análisis de un mismo estudio. En el caso de que sea necesario cambiar el lote de antígenos, se debe realizar una comparación previa de ambos.

4.1.6. Estabilidad

Los resultados de Estabilidad del método ELISA SLA IgG2 ponen en evidencia la capacidad de las muestras para conservar sus propiedades iniciales cuando se almacenan en unas condiciones definidas. Tal y como se describe en el epígrafe “3.4.1.5. Diseño del protocolo de validación (F)”, muestras con diferentes niveles de reactividad fueron sometidas a diferentes condiciones de almacenamiento, cuyos resultados se representan en las Tablas 33-35 mediante porcentajes de variación (%) obtenidos de las D.O. normalizadas de cada muestra (Tabla 3 y 6) respecto al “t=0.

RESULTADOS

4.1.6.1. Almacenamiento largo tiempo a -80°C

Los resultados reportados por el método, tras almacenar las muestras del **G6-SLA** durante tiempo prolongado (15 días, 6, 12, 18 y 24 meses) a -80°C, se representan en la siguiente tabla como los % de variación obtenidos de las D.O. normalizadas respecto al t=0.

ESTABILIDAD (Almacenamiento prolongado a -80°C)					
Resultados		Muestras			
		G6-1-SLA	G6-2-SLA	G6-3-SLA	G6-4-SLA
t=0	DO	1,083	0,996	0,356	0,177
t=15 15 días a 80°C	DO	1,082	0,998	0,411	0,182
	% variación	0,2%	0,1%	15,3%	5,7%
	*Cumplimiento	SI	SI	SI	SI
t= 6 6 meses a 80°C	DO.	1,011	0,882	0,417	0,213
	% variación	6,5%	11,6%	1,6%	13,9%
	*Cumplimiento	SI	SI	SI	SI
t=12 12 meses a 80°C	DO	1,093	0,968	0,551	0,274
	% variación	0,9%	2,9%	54,6%	55,3%
	*Cumplimiento	SI	SI	NO	NO
t=18 18 meses a -80°C	DO	1,025	0,899	0,497	0,157
	% variación	5,3 %	9,8 %	39,7 %	11,2 %
	*Cumplimiento	SI	SI	SI	SI
t=24 24 meses a -80°C	DO	1,041	0,865	0,440	0,177
	% variación	3,9 %	13,2 %	23,5 %	0,1 %
	*Cumplimiento	SI	SI	SI	SI

Tabla 33: Resultados de la estabilidad, efecto del almacenamiento prolongado a -80°C para el método ELISA SLA.

*Los **criterios de aceptación** establecidos son los siguientes:

- < 20% para las muestras de alta reactividad.
- < 30% en caso de las muestras de reactividad media.
- <40% para muestras de baja reactividad y negativas.

Como se observa en la anterior tabla, los resultados de estabilidad obtenidos del análisis, de las muestras tras almacenamiento prolongado a -80°C, mediante el método ELISA SLA IgG2, cumplen con los criterios de aceptación establecidos. Las muestras mantuvieron valores estables de reactividad después de 24 meses a -80°C independientemente de la reactividad que presentaran. Los resultados obtenidos para muestras con reactividad baja (G6-3-SLA) y negativa (G6-4-SLA) a los 12 meses, los

RESULTADOS

cuales no cumplieron los criterios de aceptación establecidos siendo el % de variación de 54,6% y 55,3% respectivamente, probablemente se debieron a cualquier error de manejo durante el desarrollo del método, ya que los resultados obtenidos a los 18 meses eran correctos, siendo el % de variación de 23,5 % y 0,1% respectivamente.

4.1.6.2. Tres procesos de congelación-descongelación

Tras someter a las muestras a tres procesos de congelación-descongelación tal y como se describe en el apartado de material y métodos, a continuación se presentan los resultados obtenidos tras calcular el % de variación de las D.O. normalizadas respecto al t=0.

ESTABILIDAD (Congelación-descongelación)					
Resultados		Muestras			
		G6-1-SLA	G6-2-SLA	G6-3-SLA	G6-4-SLA
t=0	DO	1,083	0,996	0,356	0,177
1º ciclo Congelación-descongelación	DO	1,04	0,942	0,350	0,166
	% variación	6,4%	5,5%	1,8%	6,0%
	*Cumplimiento	SI	SI	SI	SI
2º ciclo Congelación-descongelación	DO	0,832	0,863	0,463	0,257
	% variación	23,2%	13,4%	29,92%	45,4%
	*Cumplimiento	NO	SI	SI	NO
3º ciclo Congelación-descongelación	DO	1,019	0,942	0,450	0,208
	% variación	5,9%	5,5%	26,4%	17,9%
	Cumplimiento	SI	SI	SI	SI

Tabla 34: Resultados de la estabilidad, efecto tres procesos de congelación-descongelación para el método ELISA SLA.

*Los **criterios de aceptación** establecidos son los siguientes: < 20% para las muestras de alta reactividad. < 30% en caso de las muestras de reactividad media. <40% para muestras de baja reactividad y negativas.

Como se muestra en la Tabla 34, los resultados obtenidos cumplen con los criterios de aceptación establecidos con la excepción de las muestras G6-1-SLA y G6-4-SLA después del segundo proceso de congelación-descongelación, siendo el % de variación del 23,2% y 45,4%, respectivamente. En este experimento (segundo proceso de congelación-descongelación), la muestra G6-1-SLA reveló valores de reactividad más bajos (0,832) que el experimento t=0 (1,083), mientras que la muestra G6-4-SLA mostró

RESULTADOS

una reactividad más alta (0,257) que el experimento t=0 (0,177), pero se mantuvo en valores de reactividad negativos.

Los resultados obtenidos después del tercer proceso de congelación-descongelación indican que las diferencias observadas después del segundo proceso podrían deberse a cualquier error de manejo durante el desarrollo del método puesto que vuelven a obtenerse reactividades similares al t=0. Por lo tanto, las muestras obtienen valores de reactividad estables después de 3 procesos de congelación-descongelación.

4.1.6.3. Manteniendo las muestras en refrigeración (2-8°C)

Los resultados del último ensayo que evidencian la Estabilidad de las muestras de suero para ser analizadas por el método ELISA SLA IgG2 muestran el efecto del mantenimiento de las muestras (Tabla 3 y 6) en refrigeración (2-8°C), las cuales se conservaron y analizaron tal y como se describe en el apartado de material y métodos. La siguiente tabla muestra los resultados tras calcular el % de variación obtenidos de las D.O. normalizadas respecto al t=0, en el cual la muestra era recién extraída.

ESTABILIDAD (Refrigeración 2-8°C)					
Resultados		Muestras			
		6-1-SLA	6-2-SLA	6-3-SLA	6-4-SLA
t=0	D.O. normalizada	1,083	0,996	0,356	0,177
24 horas a 2-8°C	D.O. normalizada	1,030	0,858	0,363	0,187
	% variación	4,9%	13,9%	1,8%	6,0%
	*Cumplimiento	SI	SI	SI	SI
48 horas a 2-8 °C	D.O. normalizada	0,966	0,976	0,624	0,308
	% variación	10,8%	2,1%	75,1%	74,3%
	*Cumplimiento	SI	SI	NO	NO

Tabla 35: Resultados de la estabilidad, efecto manteniendo las muestras en refrigeración (2-8°C) para el método ELISA SLA.

*Los **criterios de aceptación** establecidos son los siguientes:

- < 20% para las muestras de alta reactividad.
- < 30% en caso de las muestras de reactividad media.
- <40% para muestras de baja reactividad y negativas.

Como se muestra en la tabla anterior, los resultados obtenidos cumplen con los criterios de aceptación establecidos con la excepción de las muestras G6-3-SLA y G6-4-SLA en

RESULTADOS

las que el % de variación ha sido de 75,1% y 74,3% respectivamente, después de 48 horas a 2-8°C. En este experimento, las muestras G6-3-SLA y G6-4-SLA mostraron valores de reactividad más altos, 0,624 y 0,308 respectivamente, que el experimento t=0, teniendo previamente unas densidades ópticas normalizadas de 0,356 y 0,177, respectivamente. Sin embargo, la muestra G6-4-SLA se mantuvo en valores de reactividad negativos. Los resultados obtenidos indican que la estabilidad de sueros de baja reactividad y de las muestras negativas podrían verse comprometidas después de 48 horas a 2-8°C, sin embargo, reportan valores de reactividad estables después de 24h a 2-8°C.

En definitiva, podemos afirmar que el método ELISA SLA, desarrollado para determinar la presencia de anticuerpos IgG2 en sueros perros, se ha validado con resultados aceptables en relación con la linealidad, la especificidad, la precisión y la estabilidad.

El análisis de robustez reveló que la modificación de cualquier temperatura o tiempo de incubación, así como el lote de antígenos durante el desarrollo del método ELISA SLA IgG2, causa diferencias de reactividad. Por lo tanto, el control estricto de los parámetros implementados en el PNT se mantendrá para uso rutinario, y habrá que tener en cuenta que todas las placas ELISA SLA IgG2 utilizadas en un mismo estudio deberán tapizarse utilizando el mismo lote de antígenos.

RESULTADOS

4.2. Resultados validación IFI

A continuación, se exponen los resultados obtenidos que, tras aplicar la metodología descrita en el epígrafe 3.4.2. Inmunofluorescencia indirecta (IFI), han permitido validar este método inmunológico, centrado en detectar la presencia de anticuerpos del isotipo IgG anti-*L. infantum* en muestras de sueros caninos, a cuyas características y codificación se hace referencia en la Tabla 9. Para ello, se han investigado los atributos de Especificidad, Sensibilidad, Precisión y Robustez, expresando los resultados de estos ensayos como títulos de anticuerpos, es decir, la dilución máxima de la muestra a la que los promastigotes presentes en el campo microscópico emiten suficiente fluorescencia para distinguir el flagelo y la membrana.

4.2.1. Especificidad

Los resultados de Especificidad del método IFI, obtenidos tras aplicar la metodología descrita en el epígrafe “3.4.2.5. Diseño del protocolo de validación (A)”, en la que se analizaron muestras de suero correctamente identificadas como negativas a *L. infantum* (Tablas 9 y 11) con diferentes características (sueros de Beagles experimentales pertenecientes al grupo G1-IFI seleccionados a través del *cut-off* SLA 0,539, sueros de perros de cualquier raza pertenecientes al grupo G2-IFI y de cualquier raza con otras patologías pertenecientes al grupo G3-IFI, siendo el *cut-off* SLA establecido para ambos grupos de 0,497), se representan en la siguiente tabla (Tabla 36) y se basan en el porcentaje de muestras negativas correctamente identificadas como negativas, teniendo en cuenta el valor de corte descrito de $< 1/80$, siendo este el punto de corte establecido para este método.

RESULTADOS

ESPECIFICIDAD				
Muestras	Resultado IFI	Correctamente identificados	*Criterios de aceptación	Cumplimiento del criterio
G1-IFI (n=20)	Negativo	100% (20/20)	≥95%	SI
G2-IFI (n=20)	Negativo	100% (20/20)		SI
G3-IFI (n=10)	Negativo	100% (10/10)		SI

Tabla 36: Resultados de validación del parámetro especificidad para el método IFI.

*El **criterio de aceptación** establecido fue que porcentaje de muestras analizadas correctamente asignadas como negativas debe ser $\geq 95\%$, y el fracaso en el 5% restante solo se aceptará si el título obtenido es 1/80.

Como puede observarse en la tabla anterior, las muestras pertenecientes a los tres grupos, G1-IFI formado 20 sueros procedentes de perros Beagle experimentales negativos a *L. infantum*, G2-IFI, formado por 20 sueros de perros negativos que vivían en condiciones naturales y G3-IFI, formado por 10 sueros negativos procedentes de perros que vivían en condiciones naturales pero con otras patologías, cumplen con los criterios de aceptación establecidos, demostrándose la total especificidad (100%) de esta técnica sobre una población total de 50 sueros caninos no infectados por *L. infantum*.

4.2.2. Sensibilidad

Los resultados del estudio de la Sensibilidad del método IFI, obtenidos tras aplicar la metodología descrita en el epígrafe “3.4.2.5. Diseño del protocolo de validación (B)”, en el que se analizaron muestras positivas (Tablas 9 y 11) con diferentes características, tratando de cubrir todo el rango de positividad para representar la variabilidad real en los títulos que normalmente se pueden encontrar en perros infectados con este parásito. Así, se escogieron para el grupo G4-IFI un total de 20 sueros de Beagles experimentalmente infectados con diferentes rangos de reactividad; 8 con título de anticuerpos bajo o 1/80, 10 con reactividad moderada 1/160-1/320 y 2 con reactividad alta $\geq 1/640$. También se utilizaron 20 perros naturalmente infectados G5-IFI en este caso formado por 5 sueros con moderado título de anticuerpos (1/160-1/320) y 15 con alto

RESULTADOS

título de anticuerpos ($\geq 1/640$) que fueron seleccionados teniendo en cuenta los resultados del *cut-off* de SLA 0,355 para el grupo G4-IFI y 0,497 para el grupo G5-IFI. En la siguiente tabla (Tabla 37) se muestran los resultados basados en el porcentaje de muestras positivas correctamente identificadas, teniendo en cuenta el valor de corte establecido para los positivos $\geq 1/80$.

SENSIBILIDAD				
Muestras	Resultados IFI	Correctamente identificados	*Criterios de aceptación	Cumplimiento del criterio
G4-IFI (n=20)	Positivos	100% (20/20)	$\geq 90\%$	SI
G5-IFI (n=20)	Positivos	100% (20/20)		SI

Tabla 37: Resultados de validación de la sensibilidad del método IFI.

Los **criterios de aceptación** se basaron en el porcentaje de muestras correctamente asignadas como positivas, que deben ser $\geq 90\%$

Como muestran los resultados de la tabla anterior, la técnica IFI cumple con los criterios de aceptación establecidos siendo 100% sensible para el diagnóstico de la LCan en los perros experimentales (G4-IFI) y naturalmente infectados (G5-IFI) por *L. infantum*. También se evidencia que al ser seleccionadas estas muestras a través de las técnicas de referencia como ELISA SLA positiva y presencia de parásitos por qPCR, las 40 muestras obtuvieron títulos de anticuerpos moderados y altos, no evidenciándose perros con baja respuesta a la LCan en el grupo de perros naturalmente infectados.

4.2.3. Precisión

Los resultados de Precisión del método IFI muestran la proximidad entre una serie de mediciones, obtenidas tras múltiples análisis de la misma muestra sometiendo a diferentes situaciones, tal y como se describe en el epígrafe “3.4.2.5. Diseño del protocolo de validación (C)”. A continuación, se exponen los resultados de los dos niveles de precisión considerados: **repetibilidad** y **precisión intermedia**.

4.2.3.1. Repetibilidad

Los resultados de Repetibilidad muestran la variabilidad del método IFI al realizarlo bajo las mismas condiciones de análisis, es decir, por un solo operador, usando el mismo

RESULTADOS

equipo y reactivos, en un corto período de tiempo. Así, en la siguiente tabla se evidencian los resultados de Precisión inherente al método y el equipo, utilizando muestras de sueros caninos positivos del **G-6** con reactividades altas (1/640), medias (1/320), bajas (1/80) y negativas (<1/80) (Tablas 9 y 11), representando los resultados en la siguiente tabla como el % lecturas iguales para cada una de las 10 repeticiones de cada una de las muestras.

PRECISIÓN REPETIBILIDAD				
Muestras	RESULTADOS IFI	Correctamente identificados	*Criterio de aceptación	Cumplimiento del criterio
G6-1-IFI	1/640	100% (10/10)	Homogeneidad del título de las muestras (± 1) $\geq 90\%$	SI
G6-2-IFI	1/320	100% (10/10)		SI
G6-3-IFI	1/80	100% (10/10)		SI
G6-4-IFI	Negativo	100% (10/10)		SI

Tabla 38: Resultados de validación del parámetro repetibilidad para el método IFI.

*Como **criterios de aceptación**, la repetibilidad del método IFI debe ser al menos el 90% de los títulos para la frecuencia más abundante, aceptando una variación del 10% para un título por encima o por debajo del correcto.

Tal y como se observa en la tabla, todas las muestras analizadas las cuales abarcan todos los rangos de positividad G6-1-IFI (1/640), G6-2-IFI (1/320), G6-3-IFI (1/80) y G6-4-IF negativos, cumplen el criterio de aceptación establecidos, puesto que todas las repeticiones de lectura para cada una de las muestras, independientemente del título de anticuerpos, fue la misma.

4.2.3.2. Precisión intermedia

Los últimos resultados obtenidos del atributo Precisión, corresponden a la Precisión Intermedia, los cuales expresan la variabilidad del método al modificarse las condiciones de análisis. Tras realizar los 10 ensayos incluyendo variaciones de operador, fecha, juego de pipetas, lote de portaobjetos recubiertos y lote de tampón (PBS), descritos en la Tabla 12 del epígrafe material método, utilizando las mismas muestras en en el

RESULTADOS

ensayo anterior (G-6) (Tablas 9 y 11). A continuación, se representan los valores de homogeneidad de los 10 títulos (5 por operador) obtenidos para cada muestra.

PRECISIÓN INTERMEDIA				
Muestras	Resultados IFI	Correctamente identificados	*Criterio de aceptación	Cumplimiento del criterio
6-1-IFI	1/640	100% (10/10)	Homogeneidad del título de las muestras (± 1) $\geq 90\%$	SI
6-2-IFI	1/320	100% (10/10)		SI
6-3-IFI	1/80	100% (10/10)		SI
6-4-IFI	Negativo	100% (10/10)		SI

Tabla 39: Resultados de validación del parámetro precisión intermedia para el método IFI.
*Como **criterio de aceptación**, la precisión intermedia del método IFI debe ser al menos el 90% de los títulos para la frecuencia más abundante, aceptando una variación del 10% con un título por encima o por debajo del correcto.

Como se puede observar, la precisión intermedia del método IFI cumplió los criterios de aceptación, demostrando una total precisión en nuestras condiciones de trabajo, las cuales pueden incluir variaciones como el cambio de operador, día de análisis, juego de pipetas, lote de tapizado de portaobjetos y el lote del tampón utilizado, para sueros de perros positivos con reactividades altas (1/640), medias (1/320), bajas (1/80) y negativas (<1/80).

4.2.4. Robustez

Los resultados de Robustez del método IFI ponen en evidencia la capacidad del método para permanecer inalterable aún estando sujeto a ligeras variaciones deliberadas de las condiciones óptimas, por lo que brinda una idea de su confiabilidad para el uso rutinario. Tal y como se describe en el epígrafe “3.4.2.5. Diseño del protocolo de validación (D)”, la solidez de este método analítico se determinó estudiando las variaciones en el parámetro **tiempo de incubación**, y cuyos resultados se muestran en la Tabla 40.

RESULTADOS

ROBUSTEZ				
Muestras	Resultados IFI	Correctamente identificados	*Criterio de aceptación	Cumplimiento de criterio
G6-1-IFI	>1/640	100% (20/20)	p ≤ 0.05	SI
G6-2-IFI	1/320	100% (20/20)		SI
G6-3-IFI	1/80	100% (20/20)		SI
G6-4-IFI	Negativos	100% (20/20)		SI

Tabla 40: Resultados de validación del parámetro robustez para el método IFI.

*Como **criterios de aceptación** se estableció que no debe haber diferencias estadísticamente significativas entre las proporciones obtenidas para cada ensayo ($p \leq 0.05$).

Como muestran los resultados representados en la tabla anterior, la prueba de Chi cuadrado confirmó que no hay diferencias significativas entre los diferentes ensayos, en los cuales los cambios introducidos fueron la modificación del tiempo de la primera y la segunda incubación de los portaobjetos en ± 5 minutos. Así, los resultados obtenidos cumplen con los criterios de aceptación y podemos decir que es un método es robusto para los parámetros y niveles de reactividad evaluados.

En definitiva, el método de IFI desarrollado para determinar la presencia y el título de anticuerpos IgGT anti-*L. infantum* se ha validado con resultados aceptables en relación con los parámetros de especificidad, sensibilidad, precisión y robustez.

RESULTADOS

4.3. Resultados validación qPCR

A continuación, se exponen los resultados obtenidos que tras aplicar la metodología descrita en el epígrafe “3.4.3. PCR cuantitativa a tiempo real (qPCR)”, ha permitido validar este método parasitológico para el diagnóstico de la LCan, centrado la investigación en los atributos de **Linealidad, Precisión, Especificidad, Sensibilidad, Límite de detección, Límite de cuantificación, Robustez y Estabilidad**, en muestras de médula ósea y ganglio linfático de perros a cuyas características y codificación se hace referencia en las Tabla 15 y 19 del epígrafe material y métodos.

Después del proceso de amplificación de las muestras, los resultados son analizados automáticamente por el equipo, y se expresan como el Ciclo umbral (Ct), cantidad estimada de parásitos (Q), el coeficiente de determinación (R²), la línea de regresión, y la eficiencia de reacción.

Recordemos que, para este método, una muestra se considera positiva cuando se han amplificado los tres pocillos analizados, con un valor Ct es \leq al valor del Y-intercept, cantidad de ADN correspondiente a un parásito. Por otro lado, una muestra se ha considerado negativa cuando no se ha detectado amplificación en ninguno de los tres pocillos analizados o la media de los Ct de estos ha sido \geq al valor del Y-intercept. Y, por último, una muestra se ha considerado dudosa cuando la media de los Ct de la amplificación del triplicado se ha localizado entre el valor del Y-intercept + 0,1 y el Ct es \geq a 34,99.

4.3.1. Linealidad y Rango

Tras aplicar la metodología descrita en el epígrafe “3.4.3.5. Diseño del protocolo de validación (A)”, los resultados de Linealidad establecen una relación lineal entre la cantidad estimada de parásitos y Ct. Esto ha sido posible gracias al análisis de cada una de las curvas estándar utilizadas a lo largo del período de validación. Tal y como se muestra en la siguiente tabla de resultados (Tabla 41), la relación lineal se estableció

RESULTADOS

con los valores del coeficiente de linealidad (Cm) y del coeficiente de variación (R²), obtenidos durante todo el ensayo de validación.

LINEALIDAD Y RANGO				
Muestras (Recta patrón de placa)	Resultados R2		Resultados Cm	
	Valor R ²	*Cumplimiento del criterio	Valor Cm	*Cumplimiento del criterio
Placa 1	0,996	SI	98,4	SI
Placa 2	0,998	SI	99,9	SI
Placa 3	0,997	SI	98,6	SI
Placa 4	0,999	SI	99,2	SI
Placa 5	>0,999	SI	99,6	SI
Placa 6	0,991	SI	98,8	SI
Placa 7	0,999	SI	99,1	SI
Placa 8	0,999	SI	99,2	SI
Placa 9	0,999	SI	99,1	SI
Placa 10	0,999	SI	99,4	SI
Placa 11	>0,999	SI	99,9	SI
Placa 12	0,999	SI	99,4	SI
Placa 13	0,998	SI	99,7	SI
Placa 14	0,999	SI	99,3	SI
Placa 15	0,999	SI	99,4	SI
Placa 16	0,998	SI	99,0	SI
Placa 17	0,998	SI	98,9	SI
Placa 18	0,998	SI	98,8	SI
Placa 19	0,997	SI	98,6	SI

Tabla 41: Resultados de validación del parámetro linealidad y rango para el método qPCR.

*R2: Coeficiente de regresión calculado a partir de la recta patrón. Se define como la covarianza de las variables (x e y) dividida por su desviación estándar, siendo "x" el Log10 (cantidad de parásitos) e "y" el Ct.
Como **criterios de aceptación se establecieron los siguiente: el valor del coeficiente de determinación R2 debe ser $\geq 0,98$ y el valor del coeficiente de linealidad Cm de ser $\geq 95\%$.

Como se observa en los resultados representados en la tabla anterior, el método qPCR tiene buen nivel de ajuste de la respuesta medida de la cantidad de parásitos en función del Ct. Mientras más cercano este R2 a el valor 1, mayor ajuste hay entre la cantidad de parásitos y el Ct, por lo tanto, nuestros resultados se ajustan a un modelo lineal y cumplen con los criterios de aceptación establecidos.

RESULTADOS

4.3.2. Exactitud

Tras aplicar la metodología descrita en el epígrafe “3.4.3.5. Diseño del protocolo de validación (B)” se evaluó el **factor de recuperación** obtenido para muestras con carga parasitaria conocida y se verificó la **ausencia de contaminación** durante la extracción. Los resultados que evidencian el factor de recuperación del método se obtuvieron tras la contaminación de las muestras negativas de médula ósea y ganglio linfático pertenecientes al grupo **G2-qPCR**, cuyos valores de Ct medio y la media de parásitos estimados antes de la contaminación, se muestran a continuación:

Muestras negativas	Ct	Media Ct	Media del nº de parásitos	DE del nº de parásitos (n=3)	Y-intercept
G2-7-MO-qPCR	36,20	36,04	0,13	0,05	33,111
	36,40				
	35,53				
G2-7-GL-qPCR	36,50	>37,47	0,15	0,04	33,383
	>40				
	35,90				
G2-8-MO-qPCR	35,97	>37,53	0,13	0,04	33,35
	>40				
	36,61				
G2-8-GL-qPCR	38,29	>38,31	0,007	0,05	
	36,64				
	>40				

Tabla 42: Resultados previos a la contaminación de las muestras

Tras contaminar estas muestras negativas con tres niveles de carga parasitaria conocidas (10.000, 1.000 y 10 parásitos) se obtuvieron los resultados representados en la Tabla 43 en forma de valor **promedio del porcentaje de recuperación**, la **desviación estándar** (DE).

RESULTADOS

EXACTITUD					
Factor de Recuperación					
Muestras (negativas contaminadas)	Media del nº de parásitos (n=3)	Factor de recuperación (%)		*Criterio de aceptación	Cumplimiento del criterio
		Media	DE		
10.000 MO	9,818	98,18	3,83	≥75%	SI
1.000 MO	1,054	105,40	5,23		SI
10 MO	8,93	89,33	8,47	≥60%	SI
10.000 GL	10,438	104,38	6,44	≥75%	SI
1.000 GL	988,2	98,82	9,60		SI
10 GL	8,93	89,27	10,09	≥60%	SI

Tabla 43: Resultados de validación del factor de recuperación que mide la exactitud del método qPCR.

*Como **criterio de aceptación** se estableció que el factor de recuperación debe ser $\geq 75\%$ si la cantidad de parásitos es 10.000 ó 1.000 y $\geq 60\%$ si la cantidad de parásitos es 10.

Como se observa en los resultados representados en la tabla anterior, el método qPCR es exacto puesto que cumple los criterios de aceptación establecidos en cuanto al factor de recuperación en las dos matrices utilizadas. A modo resumen, podemos decir que el factor de recuperación de las muestras de médula ósea negativa contaminadas con 10.000 parásitos es del 98,18%, con 1.000 parásitos de 105,40% y con 10 parásitos de 89,27%. Por otro lado, para, las muestras de ganglio linfático negativas contaminadas con 10.000 parásitos el factor de recuperación es del 104,38%, las contaminadas con 1.000 parásitos del 98,82% y para las contaminadas con 10 parásitos el factor de recuperación del método es del 89,27%.

Por otro lado, los resultados obtenidos para verificar la ausencia de contaminación durante el proceso de extracción utilizando los valores de control negativo (B5) de placa obtenidos durante todo el estudio de validación de la técnica qPCR, se muestran en la siguiente tabla.

RESULTADOS

EXACTITUD			
Ausencia de Contaminación			
Ensayo	Y-intercept	Ct medio Solución B5	*Cumplimiento del criterio
Placa 1	33,232	36,97	SI
Placa 2	33,232	>40	SI
Placa 3	33,005	>40	SI
Placa 4	33,511	>39	SI
Placa 5	33,480	>40	SI
Placa 6	33,027	>40	SI
Placa 7	33,229	>40	SI
Placa 8	33,284	>40	SI
Placa 9	33,334	>40	SI
Placa 10	33,549	>40	SI
Placa 11	33,300	>40	SI
Placa 12	33,091	>40	SI
Placa 13	33,315	>40	SI
Placa 14	33,293	>39,27	SI
Placa 15	33,139	>38,71	SI
Placa 16	33,484	>39,17	SI
Placa 17	33,494	>39,24	SI
Placa 18	33,029	35,01	SI
Placa 19	33,653	>40	SI

Tabla 44: Resultados de validación que verifica la ausencia de contaminación durante el proceso de extracción de las muestras y que mide la exactitud del método qPCR.

*El criterio de aceptación establecido fue que la Media Ct de muestra de solución B5 debe ser > Y-intercept.

Los resultados de esta tabla expresan el Y-intercept de cada una de las placas utilizadas durante el estudio de validación y la media de los Ct de las muestras control negativo blanco, para lo cual se utilizó la solución B5, sometida al mismo proceso de extracción que el resto de las muestras. Observamos como todas cumplen con los criterios de aceptación establecidos siendo la media Ct de los blancos mayor al Y-intercept, y por lo tanto 100% negativos lo cual evidencia la total especificidad del método estandarizado qPCR.

RESULTADOS

4.3.3. Especificidad

Los resultados que se muestran a continuación evidencian la Especificidad del método qPCR obtenidos tras aplicar la metodología descrita en el epígrafe “3.4.3.5. Diseño del protocolo de validación (C)”. Al igual que en el ensayo anterior, se utilizaron muestras de ambas matrices, médula ósea y ganglio, pertenecientes a perros sanos no infectados (**G2-qPCR**) (Tablas 15 y 19). Los resultados se representan en la siguiente tabla (Tabla 45) y se basan en el porcentaje de muestras negativas correctamente identificadas como negativas teniendo en cuenta los puntos de corte establecidos.

ESPECIFICIDAD				
Muestras	Resultados qPCR Rango Ct medio	Resultados Correctamente identificados	*Criterios de aceptación	Cumplimiento del criterio
G2-MO-qPCR (n=20)	>40-33,5	100%	≥95% negativos	SI
G2 -GL-qPCR (n=20)	>40-33,92	100%		SI

Tabla 45: Resultados de validación del parámetro especificidad para el método qPCR.

*Como **criterio de aceptación** se estableció que las muestras identificadas como negativas debía ser ≥95% para ambas matrices.

Como observamos en la anterior tabla de resultados, las muestras pertenecientes al grupo G2-qPCR, formadas por 20 médulas óseas (G2-MO-qPCR) y 20 ganglios linfáticos (G2 -GL-qPCR) negativos, cumplen con los criterios de aceptación establecidos, demostrándose una especificidad del método qPCR del 100% para ambas matrices.

4.3.4. Sensibilidad

Los resultados de Sensibilidad del método qPCR evidencian el porcentaje de muestras correctamente identificadas como positivas a la presencia de ADNk de *L. infantum* tras aplicar la metodología descrita en el epígrafe “3.4.3.5. Diseño del protocolo de validación (D)”. En la tabla que se muestra a continuación (Tabla 46), se representan los resultados de las 40 muestras pertenecientes al grupo **G1-qPCR**, 20 muestras

RESULTADOS

positivas de ganglio y 20 positivas de médula, procedentes de perros confirmados como positivos por los métodos inmunológicos.

SENSIBILIDAD				
Muestras	Resultados qPCR Rango Ct medio	Resultados Correctamente identificados	*Criterios de aceptación	Cumplimiento del criterio
G1-MO-qPCR (n=20)	25,92-12,59	100%	≥95% positivos	SI
G1 -GL-qPCR (n=20)	30,74-12,82	100%		SI

Tabla 46: Resultados de validación del parámetro sensibilidad para el método qPCR.

*El **criterio de aceptación** definido se basa en el % de muestras correctamente identificadas como positivas que debe ser $\geq 95\%$ para ambas matrices.

Como observamos en la anterior tabla de resultados, las muestras pertenecientes al grupo G1-qPCR, formadas por 20 médulas ósea y 20 ganglios linfáticos positivos cumplen con los criterios de aceptación establecidos, demostrándose una especificidad del método qPCR del 100% para ambas matrices.

4.3.5. Precisión

Los resultados de Precisión del método qPCR expresan el grado de acuerdo entre una serie de mediciones obtenidas de múltiples análisis de la misma muestra en las condiciones prescritas, tal y como se describe en el epígrafe “3.4.3.5. Diseño del protocolo de validación (E)”.

A continuación, se tratarán los resultados de los tres niveles de precisión considerados: **precisión instrumental**, **repetibilidad** y **precisión intermedia**, los cuales se encuentran representados en las Tablas 47, 48 y 49 respectivamente.

4.3.5.1. Precisión Instrumental

Para la obtención de los primeros resultados del parámetro Precisión del método qPCR, y considerando concretamente la Precisión Instrumental, se ha verificado que el equipo realiza lecturas precisas y homogéneas en cualquiera zona de la placa. Para ello se han utilizado muestras de médula ósea y ganglio pertenecientes a los grupos **G1-qPCR** y

RESULTADOS

G2-qPCR, positivas y negativas respectivamente, de las cuales se ha obtenido el Ct mediante el que se calculó la cantidad de parásitos. En la siguiente tabla se expresa el CV de los Ct para las muestras positivas y la homegeneidad de los resultados de las muestras negativas.

PRECISIÓN INSTRUMENTAL							
Muestras	Y-intercept	Ct Medio	DE	Cv Ct muestras positivas	Resultados (%) de resultado correcto	Criterio de aceptación	Cumple
G1-12-MO-qPCR	33,139	---	---	---	100% negativos (10/10)	Todos negativos	SI
G1-12-GL-qPCR	33,484	---	---	---	100% negativos (10/10)		SI
G2-7-MO-qPCR	33,315	18,38	0,111	0,606%	100% positivos (10/10)	Todos positivos	SI
G2-7-GL-qPCR	33,293	20,74	0,087	0,422%	100% positivos (10/10)		SI

Tabla 47: Resultados de validación del parámetro precisión instrumental para el método qPCR.

*Los **criterios de aceptación** definidos son los siguientes:

- Los resultados de todas las repeticiones de una muestra negativa deben ser negativos.
- Los resultados de todas las repeticiones de una muestra positiva deben ser positivos.
- El CV de las muestras positivas debe ser (Ct) <3%.

Como se observa en la anterior tabla de resultados, el CV de las lecturas repetidas de cada una de las muestras estudiadas cumplen con los criterios de aceptación definidos. En concreto, las muestras de médula ósea (G1-12-MO-qPCR) y ganglio negativas (G1-12-GL-qPCR) muestran lecturas precisas y homogéneas en cualquier zona de la placa siendo, en todos los casos, negativas. Respecto a las diferentes lecturas del equipo de las muestras positivas de médula ósea (G2-7-MO-qPCR) y ganglio linfático (G2-7-GL-qPCR) también muestran una precisión aceptable, siendo el CV de 0,606% y de 0,422%, respectivamente.

RESULTADOS

4.3.5.2. Repetibilidad

Los resultados de Repetibilidad obtenidos muestran la variabilidad del método al realizarlo bajo las mismas condiciones de análisis, es decir, por un solo analista, el mismo equipo y en un corto período de tiempo, por lo tanto, se evidencia la precisión inherente del método y el equipo, siendo necesario el análisis de muestras con cargas parasitarias altas, medias y negativas de ambas matrices, médula ósea y ganglio, pertenecientes al grupo **G3-qPCR** (Tabla 15 y 19).

Los resultados que se representan en la siguiente tabla, obtenidos tras analizar 6 veces cada una de las muestras y teniendo en cuenta que el el equipo obtiene el Ct, se expresan como el CV de los 6 valores de Ct obtenidos para las muestras positivas y en las muestras negativas se tienen en cuenta la homeogeneidad de los resultados.

REPETIBILIDAD						
Muestras	Ct Medio	DE	Cv Ct muestras positivas	Resultados (%) de resultado correcto	*Criterio de aceptación	*Cumple
G3-3-MO-qPCR	---	---	---	100% negativos (6/6)	Todos negativos	SI
G3-3-GL-qPCR	---	---	---	100% negativos (6/6)		SI
G3-1-MO-qPCR	18,07	0,125	0,692%	100% positivos (6/6)	Todos positivos Ct <8%	SI
G3-2-MO-qPCR	23,73	0,236	0,993%	100% positivos (6/6)		SI
G3-1-GL-qPCR	18,71	0,953	5,091%	100% positivos (6/6)		SI
G3-2-GL-qPCR	22,75	0,544	2,437%	100% positivos (6/6)		SI

Tabla 48: Resultados de validación del parámetro repetibilidad para el método qPCR.

*Los **criterios de aceptación** establecidos fueron:

- Los resultados de todas las repeticiones de una misma muestra positiva deben ser positivos y el CV (Ct) <8%.
- Los resultados de todas las repeticiones de una misma muestra negativa deben ser negativos.

Como se observa en la tabla anterior, el CV de los Ct de las muestras positivas y negativas cumplen con los criterios de aceptación establecidos. Es cierto que el método muestra una mayor variabilidad dentro de las muestras de ganglios linfáticos. Tal y como muestran los resultados, las muestras positivas con cargas parasitarias altas (G3-1-GL-

RESULTADOS

qPCR) y medias (G3-2)-GL-qPCR muestran un CV de 5,091% y 2,437%, respectivamente. Sin embargo, en las muestras de médula ósea positivas con cargas parasitarias altas (G3-1-MO-qPCR), medias (G3-2-MO-qPCR) el CV es menor, siendo de 0,692% y 0,993% respectivamente.

4.3.5.3. Precisión intermedia

Los últimos resultados obtenidos del atributo Precisión del método qPCR corresponden a la Precisión Intermedia, los cuales hacen referencia a la variabilidad que se espera entre las diferentes mediciones tras realizarse en diferentes condiciones de operación. Tal y como se ha descrito en material y métodos, los resultados que se muestran en la siguiente tabla en forma de CV de los Ct proceden del análisis de las muestras del grupo **G3-qPCR** con cargas parasitarias altas, medias y negativas de médula ósea y ganglio (Tabla 15 y 19), las cuales se analizaron 7 veces, incluyendo las variaciones en cuanto a la **fecha de análisis**, el **operador**, el **set de pipetas** y el **lote del kit de extracción de ADN** tal y como se muestra en la siguiente tabla.

PRECISIÓN INTERMEDIA						
Muestras	Ct Medio	DE	Cv Ct muestras positivas	Criterio de aceptación	Resultados (%) de resultado correcto	*Cumple
G2-3-MO-qPCR	---	---	---	Todos negativos	100% negativos (7/7)	SI
2-3-GL-qPCR	---	---	---		100% negativos (7/7)	SI
3-1-MO-qPCR	18,20	0,434	2,387%	Todos positivos Ct <15%	100% positivos (7/7)	SI
3-2-MO-qPCR	23,66	0,564	2,382%		100% positivos (7/7)	SI
3-1-GL-qPCR	18,86	1,464	7,387%		100% positivos (7/7)	SI
3-2-GL-qPCR	22,16	1,802	8,129%		100% positivos (7/7)	SI

Tabla 49: Resultados de validación del parámetro precisión intermedia para el método qPCR.

*Los **criterios de aceptación** establecidos son:

- Los resultados de todas las repeticiones de una misma muestra positiva deben ser positivos y el CV (Ct) <15%.
- Los resultados de todas las repeticiones de una misma muestra negativa deben ser negativos.

RESULTADOS

Como se observa en la tabla anterior, el CV de los Ct de las muestras positivas y negativas cumplen con los criterios de aceptación establecidos. Es cierto que el método muestra una mayor variabilidad dentro de las muestras de ganglios linfáticos, al igual que ocurría tras los análisis de Repetibilidad. Las muestras positivas con cargas parasitarias altas (G3-1-GL-qPCR) y medias (G3-2)-GL-qPCR muestran un CV de 7,387% y 8,129%, respectivamente. Sin embargo, en las muestras de médula ósea positivas con cargas parasitarias altas (G3-1-MO-qPCR) y medias (G3-2-MO-qPCR) el CV es menor, siendo de 2,387% y 2,382%, respectivamente.

4.3.6. Límite de detección

Los resultados del parámetro límite de detección del método qPCR muestran la concentración mínima de ADNk que se puede detectar aplicando la metodología descrita en el epígrafe “3.4.3.5. Diseño del protocolo de validación (F)”.

En nuestro caso, la cantidad mínima teórica de ADN detectada corresponde a 1 parásito (Y-intercept) obtenido automáticamente por el equipo StepOne Plus. Para la obtención de estos resultados, se recopilaron todos los valores de Ct obtenidos de la Y-intercept de cada placa del período de validación, y se calculó su valor promedio y la desviación estándar tal y como se muestra en la Tabla 50.

RESULTADOS

LÍMITE DE DETECCIÓN		
Ensayo	Y-intercept	Pendiente
Placa 1	33,498	-3,425
Placa 2	33,232	-3,32
Placa 3	33,005	-3,274
Placa 4	33,511	-3,352
Placa 5	33,48	-3,361
Placa 6	33,027	-3,247
Placa 7	33,229	-3,314
Placa 8	33,284	-3,315
Placa 9	33,334	-3,346
Placa 10	33,549	-3,391
Placa 11	33,3	-3,346
Placa 12	33,091	-3,355
Placa 13	33,315	-3,338
Placa 14	33,293	-3,344
Placa 15	33,139	-3,304
Placa 16	33,484	-3,381
Placa 17	33,494	-3,387
Placa 18	33,029	-3,245
Placa 19	33,653	-3,366
Valor medio	33,313	-3,338
DE	0,195	

Tabla 50: Resultados de validación del parámetro límite de detección del método qPCR.

El resumen de los resultados del límite de detección para el método qPCR es el siguiente:

- Valor promedio de Y-intercept – 3DE = $33.313 - (3 * 0.195) = 32.728$
- Cálculo de Límite de Detección:

- Curva estándar: $Y = mx + b$

$$Y = -3.338 * (\text{Log}q) + 33.313$$

$$32.728 = -3.338 * \text{Log}q + 33.313$$

$$\text{Log}q = (32.728 - 33.313) \div (-3.338)$$

$$\text{Log}q = 0.176$$

$$q = 1.498 \text{ parásitos}$$

Por lo tanto, en base a estos datos, podemos establecer el límite de detección de nuestro método de qPCR en **1.5** parásitos.

4.3.7. Límite de cuantificación

RESULTADOS

Los resultados del parámetro límite de cuantificación del método qPCR representan la última dilución en la que una muestra sigue siendo lineal. Tal y como se describe en el epígrafe “3.4.3.5. Diseño del protocolo de validación (G)” del apartado material y métodos, para obtener estos resultados no fue necesario realizar un procedimiento experimental debido a que su estimación se realizó a partir de los resultados obtenidos para el Límite de Detección, Precisión y Exactitud.

Teniendo en cuenta que el nivel más pequeño estudiado en la precisión (10 parásitos) se ha evaluado correctamente, podemos considerar esta cantidad teórica como un valor adecuado para el Límite de Cuantificación.

A continuación, se muestra el resumen de los resultados del límite de cuantificación para el método qPCR, los cuales, como se ha dicho anteriormente, se han obtenido teniendo en cuenta los resultados del límite de detección y la precisión (Tabla 51).

RESULTADOS

LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN		
Ensayo	Y-intercept	Pendiente
Placa 1	33,498	-3,425
Placa 2	33,232	-3,32
Placa 3	33,005	-3,274
Placa 4	33,511	-3,352
Placa 5	33,48	-3,361
Placa 6	33,027	-3,247
Placa 7	33,229	-3,314
Placa 8	33,284	-3,315
Placa 9	33,334	-3,346
Placa 10	33,549	-3,391
Placa 11	33,3	-3,346
Placa 12	33,091	-3,355
Placa 13	33,315	-3,338
Placa 14	33,293	-3,344
Placa 15	33,139	-3,304
Placa 16	33,484	-3,381
Placa 17	33,494	-3,387
Placa 18	33,029	-3,245
Placa 19	33,653	-3,366
Valor promedio	33,313	-3,338
DE	0,195	

Tabla 51: Resultados de validación del parámetro límite de cuantificación del método qPCR.

- Valor promedio de intercepción en Y-intercept – 10DE = $33.313 - (10 * 0.195) = 31.363$

- Cálculo de Límite de Cuantificación:

▪ Curva estándar: $Y = mx + b$

$$Y = -3.338 * (\text{Log}q) + 33.313$$

$$31.363 = -3.338 * \text{Log}q + 33.313$$

$$\text{Log}q = 31.363 - 33.313 \div (-3.338)$$

$$\text{Log}q = 0.585$$

$$q = 3.848 \text{ parásitos}$$

RESULTADOS

En base a estos datos, podemos establecer que el límite de cuantificación de nuestro método qPCR es un intervalo comprendido entre 3.85 y 10 parásitos.

4.3.8. Robustez

Los resultados de Robustez del método qPCR ponen en evidencia la capacidad del método para permanecer inalterado cuando se realizan variaciones pequeñas pero deliberadas en condiciones óptimas, lo que brinda una idea de su confiabilidad o estabilidad para el uso rutinario.

Tal y como se describe en el epígrafe “3.4.3.5. Diseño del protocolo de validación (H)”, la solidez de este método analítico se determinó incluyendo variaciones en el **tiempo de incubación** (Tabla 21) durante la extracción de ADN y variaciones de la **concentración LeishTaq-ADN** en la amplificación (Tabla 22), cuyos resultados se muestran en las Tablas 52 y 53, respectivamente.

Los resultados que se muestran en la siguiente tabla (Tabla 52) indican que, para ambas matrices, médula ósea y ganglio, las muestras positivas y negativas pertenecientes a los grupos **G2-qPCR** y **G3-qPCR**, respectivamente (Tabla 15 y 19), se muestran como el valor ANOVA (p-valor) obtenido con la cantidad media de parásitos para cada uno de los ensayos y como el % de resultados negativos en muestras negativas.

ROBUSTEZ					
Efecto del tiempo de incubación					
Muestras	Resultados qPCR Rango Ct medio	*Criterio de aceptación	Homogeneidad repeticiones	p-valor Muestras positivas	Cumple
G2-12-MO-qPCR	37,91-35,15	Todas las repeticiones deben ser negativas	100% negativas	---	SI
G2-10-GL-qPCR	38,04-35		100% negativas	---	SI
G1-7-MO-qPCR	19,15-17,98	No debe haber diferencias significativas ($p > 0,05$) entre las medias obtenida en cada ensayo	---	0,924	NO
G1-7-GL-qPCR	20,88-19,11		---	0,067	NO

Tabla 52: Resultados de validación de robustez del método qPCR, realizando modificaciones en el tiempo de incubación.

***Criterios de aceptación:** Muestras positivas: no debe diferencias significativas ($p > 0,05$) entre las medias obtenidos para cada uno de los ensayos. Muestras negativas: Los resultados de todas las repeticiones de las muestras negativas deben ser negativos.

RESULTADOS

Como se observa en la tabla anterior, la p-valor obtenida del Ct y la cantidad estimada de parásitos para todas las repeticiones de la muestra positiva de médula ósea (G1-7-MO-qPCR) y ganglio límfatico (G1-7-GL-qPCR) no cumplen con los criterios de aceptación establecidos, siendo de 0,924 y de 0,067, respectivamente. Sin embargo, la homogeneidad de los resultados obtenidos para las muestras negativas resulta no ser alterada por las variaciones realizadas en el tiempo de incubación, siendo negativos el 100% de los resultados obtenidos para las muestras negativas de médula ósea (G2-12-MO-qPCR) y ganglio límfatico (G2-10-GL-qPCR).

A continuación, en la Tabla 53 se muestran los resultados obtenidos tras hacer las variaciones indicadas en la Tabla 22 de material y métodos, referentes a la **concentración de LeishTaq-ADN** en la extracción de ADNk de muestras positivas y negativas de ambas matrices, pertenecientes a los grupos **G1-qPCR** y **G2-qPCR** (Tablas 15 y 19), como el valor ANOVA (p-valor) obtenido con la cantidad media de parásitos para cada uno de los ensayos y como el % de resultados negativos en muestras negativas.

ROBUSTEZ					
Efecto variación de la concentración LeishTaq-ADN en la amplificación					
Muestras	Resultados qPCR Rango Ct medio	*Criterio de aceptación	Homogeneidad repeticiones	p-valor Muestras positivas	Cumple
G2-10-MO-qPCR	>40-36,45	Todas las repeticiones deben ser negativas	100% negativas	---	SI
G2-10-GL-qPCR	>40-35,23		100% negativas	---	SI
G1-13-MO-qPCR	21,27-21,19	No debe haber diferencias significativas ($p > 0,05$) entre las medias obtenida en cada ensayo	---	0,162	NO
G1-13-GL-qPCR	16,89-17,08		---	0,148	NO

Tabla 53: Resultados de validación de robustez del método qPCR, realizando modificaciones en la concentración LeishTaq-ADN en la amplificación.

***Criterios de aceptación:** Muestras positivas: no debe haber diferencias significativas ($p > 0,05$) entre las medias obtenidos para cada uno de los ensayos. Muestras negativas: Los resultados de todas las repeticiones de las muestras negativas deben ser negativos.

RESULTADOS

Como ocurría en el ensayo anterior, en el que se introdujeron variaciones en el tiempo de incubación, tras hacer variaciones en la **concentración de LeishTaq-ADN**, como se observa en la tabla 51, la muestra positiva de médula ósea (G1-13-MO-qPCR) y ganglio linfático (G1-13-GL-qPCR) no cumplen con los criterios de aceptación establecidos. Se observa como la p-valor obtenida del Ct y la cantidad estimada de parásitos para todas las repeticiones, tras hacer las variaciones indicadas en la Tabla 22, es de 0,162 y 0,148 para la matriz médula ósea y ganglio linfático, respectivamente. Sin embargo, la homogeneidad de los resultados obtenidos para las muestras negativas resulta no ser alterada por las variaciones realizadas, siendo negativos el 100% de los resultados obtenidos para las muestras negativas de médula ósea (G2-10-MO-qPCR) y ganglio linfático (G2-10-GL-qPCR).

4.3.9. Estabilidad

Los resultados de Estabilidad del método qPCR ponen en evidencia la capacidad de las muestras para conservar sus propiedades iniciales cuando se almacenan en unas condiciones definidas. Tal y como se describe en el epígrafe “3.4.3.5. Diseño del protocolo de validación (I)”, muestras con diferentes niveles de reactividad fueron sometidas a diferentes condiciones de almacenamiento, cuyos resultados se representan en las Tablas 54-59, considerando el t=0 los resultados de los C+ y C- de ambas matrices (médula ósea y ganglio linfático) del primer análisis de la validación.

4.3.9.1. Conservación a -80°C de alícuotas de la Recta Patrón DIL1-DIL6

Considerando el el t=0 los resultados obtenidos del primer análisis de validación de las diferentes diluciones de la recta patrón (DIL1-DIL6), los resultados de esas alícuotas extraídas y conservadas a -80°C se han obtenido del valor de la pendiente de las rectas de calibración obtenidas durante todo el proceso de validación.

Como se muestra en la Tabla 54, los resultados de las diferentes alícuotas de las diluciones de la recta patrón son estables durante durante todo el proceso de validación,

RESULTADOS

cumpliendo con los criterios de aceptación de positividad/negatividad descritos en el punto 3.4.3.4., y el valor de la pendiente se sitúa en todas las placas entre 3,58 y 3,10.

ESTABILIDAD		
Conservación a -80°C de alícuotas de la Recta Patrón DIL1-DIL6		
Ensayo	Pendiente	*Cumplimiento del criterio
Placa 1	-3,425	SI
Placa 2	-3,32	SI
Placa 3	-3,274	SI
Placa 4	-3,352	SI
Placa 5	-3,361	SI
Placa 6	-3,247	SI
Placa 7	-3,314	SI
Placa 8	-3,315	SI
Placa 9	-3,346	SI
Placa 10	-3,391	SI
Placa 11	-3,346	SI
Placa 12	-3,355	SI
Placa 13	-3,338	SI
Placa 14	-3,344	SI
Placa 15	-3,304	SI
Placa 16	-3,381	SI
Placa 17	-3,387	SI
Placa 18	-3,245	SI
Placa 19	-3,366	SI

Tabla 54: Resultados de estabilidad de alícuotas de la Recta Patrón conservadas a -80°C para el método qPCR.

***Criterio de aceptación:** el valor de la pendiente debe situarse entre -3,58 y -3,10

Como se observa en la tabla anterior los resultados cumplen con los criterios de aceptación establecidos, situándose la pendiente de todas las placas utilizadas en el proceso de validación entre -3,58 y -3,10, esto significa que la eficiencia de la reacción es de entre 90 y 110%.

RESULTADOS

4.3.9.2. Conservación a -80°C del Control + y Control – de muestra

Los resultados reportados por el método tras almacenar las muestras de los controles positivos y negativos de médula ósea (C (+)MO-qPCR; C (-)MO-qPCR) y ganglio linfático (C (+)GL-qPCR; C (-)GL-qPCR) a -80 °C considerando también el t=0 los resultados de estas muestras del primer análisis de la validación, muestran que, en los ensayos sucesivos realizados a los 6, 12 y 24 meses, las muestras se conservan estables puesto que cumplen con los criterios de positividad/negatividad establecidos en el punto 3.4.3.4. de material y métodos, en los que una muestra es considerada positiva cuando se detecta amplificación en los tres pocillos y el valor medio del Ct es \leq al valor del Y-intercept tal y como ocurre en los controles utilizados en 18 placas del proceso de validación (Tabla 55). Del mismo modo, observamos como en todos los análisis de los controles negativos de ambas matrices no se ha detectado amplificación en ninguno de los tres pocillos, y la media de los Ct es \geq al valor del Y-intercept.

RESULTADOS

ESTABILIDAD				
Muestras de Control + y Control – conservación a-80 °C				
Ensayo	Muestras	Ct medio	Y-intercept	*Cumplimiento del criterio
Placa 1	C (+)MO-qPCR	12.91	33,498	SI
	C (-)MO-qPCR	>37,6		SI
	C (+)GL-qPCR	14.32		SI
	C (-)GL-qPCR	34.79		SI
Placa 2	C (+)MO-qPCR	12.78	33,005	SI
	C (-)MO-qPCR	>37.41		SI
	C (+)GL-qPCR	13.58		SI
	C (-)GL-qPCR	35.06		SI
Placa 3	C (+)MO-qPCR	12.77	33,511	SI
	C (-)MO-qPCR	34.02		SI
	C (+)GL-qPCR	16.39		SI
	C (-)GL-qPCR	>38.64		SI
Placa 4	C (+)MO-qPCR	13.72	33,48	SI
	C (-)MO-qPCR	37.83		SI
Placa 5	C (+)MO-qPCR	13.53	33,027	SI
	C (-)MO-qPCR	>40		SI
	C (+)GL-qPCR	16.32		SI
	C (-)GL-qPCR	>39.26		SI
Placa 6	C (+)MO-qPCR	12.97	33,229	SI
	C (-)MO-qPCR	>39.17		SI
Placa 7	C (+)GL-qPCR	16.26	33,284	SI
	C (-)GL-qPCR	>39.08		SI
Placa 8	C (+)MO-qPCR	12.74	33,334	SI
	C (-)MO-qPCR	>38.94		SI
	C (+)GL-qPCR	16.25		SI
	C (-)GL-qPCR	>38.91		SI
Placa 9	C (+)GL-qPCR	15.47	33,549	SI
	C (-)GL-qPCR	>38.98		SI
Placa 10	C (+)MO-qPCR	13.06	33,3	SI
	C (-)MO-qPCR	>39.25		SI
Placa 11	C (+)GL-qPCR	13.96	33,091	SI
	C (-)GL-qPCR	>39.25		SI
Placa 12	C (+)MO-qPCR	12.6	33,315	SI
	C (-)MO-qPCR	>36.37		SI
Placa 13	C (+)GL-qPCR	15.91	33,293	SI
	C (-)GL-qPCR	33.99		SI
Placa 14	C (+)MO-qPCR	13.33	33,139	SI
	C (-)MO-qPCR	>39.23		SI
Placa 15	C (+)GL-qPCR	13.25	33,484	SI
	C (-)GL-qPCR	>38.12		SI
Placa 16	C (+)MO-qPCR	12.62	33,494	SI
	C (-)MO-qPCR	37.15		SI
	C (+)GL-qPCR	14.87		SI
	C (-)GL-qPCR	>38.48		SI
Placa 17	C (+)MO-qPCR	12.32	33,029	SI
	C (-)MO-qPCR	>36.8		SI
Placa 18	C (+)MO-qPCR	13.16	33,653	SI
	C (-)MO-qPCR	>38.56		SI
	C (+)GL-qPCR	13.97		SI
	C (-)GL-qPCR	37.29		SI

Tabla 55: Resultados de estabilidad de muestras de Control + y Control –conservadas a-80 °C para el método qPCR.

*Criterio de aceptación: (C+): el valor medio del Ct sea \leq al valor de Y-intercept (cantidad de ADN correspondiente a un parásito) (C-): media de los Ct de estos sea \geq al valor del Y-intercept.

RESULTADOS

Como se observa en la tabla anterior los resultados obtenidos cumplen con los criterios de aceptación establecidos puesto que el valor medio del Ct es \leq al valor de Y-intercept (cantidad de ADN correspondiente a un parásito) de todos los ensayos con el control positivo. Por otro lado, los controles negativos tienen una media de los Ct \geq al valor del Y-intercept en todos los ensayos.

4.3.9.3. 2 ciclos de congelación a -80°C - descongelación

Tras someter a las muestras a tres procesos de congelación-descongelación tal y como se describe en el apartado de material y métodos (Tabla 23), utilizando una muestra positiva de médula ósea (G1-13-MO-qPCR) y otra positiva de ganglio (G1-13-GL-qPCR), a continuación se presentan los resultados obtenidos tras calcular el % de variación de la cantidad de parásitos de dichas muestras tras realizar el experimento, respecto al t=0.

ESTABILIDAD					
2 ciclos de congelación a -80°C - descongelación					
Muestras	Tiempo	Ct medio	Media del nº de parásitos	% de variación	*Cumplimiento del criterio
G1-13-MO-qPCR	t=0	21.29	3.675	N/A	SI
	t= 1ºciclo	17.97	39.612	-977.908	SI
	t= 2ºciclo	17.91	45.230	-1130.786	SI
G1-13-GL-qPCR	t= 0	17.02	65.007	N/A	SI
	t= 1ºciclo	17.14	70.124	-7.872	SI
	t=2ºciclo	17.12	77.550	-19.294	SI

Tabla 56: Resultados de estabilidad de muestras sometidas a 2 ciclos de congelación - 80°C - descongelación para el método qPCR.

*Criterios de aceptación: Todos los resultados obtenidos deben ser positivos. El % de variación para la cantidad de parásitos media obtenida tras 2 ciclos congelación-descongelación debe ser como máximo del 25% respecto al t=0.

Como se puede observar en la tabla anterior, el % de variación tras el primer ciclo de congelación-descongelación para las muestras de médula ósea y ganglio analizadas es de -977.908 y -7.872 respectivamente y, tras el segundo ciclo de congelación-descongelación, el % de variación respecto al t=0 es de -1130.786 para la muestra de médula ósea y de -19.294 para la de ganglio linfático.

RESULTADOS

Creemos que las diferencias observadas entre los valores obtenidos posiblemente se deban a la formación de cristales de hielo durante los ciclos de congelación-descongelación, lo que provoca la hinchazón y finalmente la ruptura de células (246) que promueven la liberación de ADN y su posterior detección por qPCR.

En vista de esta razón, podemos decir que la sensibilidad del método no disminuye debido a los ciclos de congelación-descongelación, incluso aumenta. Este hecho no afecta a los procedimientos de operación estándar de nuestro laboratorio, porque siempre analizamos muestras después de al menos un ciclo de congelación-descongelación.

4.3.9.4. Conservación a -80°C de una muestra de tejido

Los resultados de estabilidad obtenidos tras la conservación a -80°C de muestras positivas de médula ósea (G1-13-MO-qPCR) y ganglio linfático (G1-13-GL- qPCR) y su comparación con el (t=0) de cada, se expresa como el porcentaje de variación de la cantidad estimada de parásitos a los distintos tiempos de análisis (15 días, 6, 12, y 24 meses) respecto al t=0, tal y como se muestra en la siguiente tabla de resultados (Tabla 57).

ESTABILIDAD					
Conservación a -80°C de muestras de tejido					
Muestras	Tiempo	Ct medio	Media del n° de parásitos	% de variación	*Cumplimiento del criterio
G1-13-MO-qPCR	t=0 días	15,66	226,196	N/A	N/A
	t= 15 días	15,91	187,071	17.297	SI
	t= 6 mes	15,63	259,332	-14,65	SI
	t=12 meses	18,91	20,239	91,052	NO
	t=24 meses	18,54	20,363	90,997	NO
G1-13-GL-qPCR	t=0 días	18,46	27,629	N/A	N/A
	t= 15 días	18,67	28,425	-2.882	SI
	t= 6 mes	18,63	27,398	0,836	SI
	t=12 meses	20,94	5,084	81,598	NO
	t=24 meses	20,38	5,487	80,141	NO

Tabla 57: Resultados de estabilidad de muestras conservadas a -80°C y analizadas con el método qPCR.

***Criterios de aceptación:** Todos los resultados obtenidos en el análisis de las muestras deben ser positivos. El % de variación para la cantidad de parásitos media obtenida deberá ser como máximo del 25%)

RESULTADOS

Como evidencian los resultados de la tabla anterior, las muestras de tejido de médula ósea y ganglio, tras ser almacenadas a -80°C , son estables hasta solo hasta los 6 meses de congelación ya que a los 12 y 24 meses de almacenamiento tanto las muestras de médula ósea (G1-13-MO-qPCR) como la de ganglio linfático (G1-13-GL-qPCR) muestran un % de variación de alrededor de un 90% y un 80% respectivamente.

4.3.9.5. Conservación a -80°C del ADN de *Leishmania* extraído

Los resultados de estabilidad obtenidos durante 3, 6, 9, 12, 18, 24, 30, 36, 42, 48 meses del ADN de *Leishmania* ya extraído de las muestras de médula ósea (L1/16MO) y ganglio linfático positivos (L1/16GL) se representan en la siguiente tabla de resultados (Tabla 58) como el porcentaje de variación de la cantidad estimada de parásitos a los distintos tiempos de análisis respecto al $t=0$.

ESTABILIDAD					
Conservación de ADN a -80°C					
Muestras	Tiempo	Ct medio	Media del nº de parásitos	% variación	*Cumplimiento del criterio
L1/16MO	t=0 meses	23,11	943,54	N/A	N/A
	t=3 meses	23,41	629,96	-1,29	SI
	t= 6 meses	23,57	576,67	-2,00	SI
	t= 9 meses	23,52	605,02	-1,80	SI
	t= 12 meses	23,51	556,80	-1,75	SI
	t=18 meses	23,58	549,71	-2,03	SI
	t=24 meses	23,19	586,41	-0,36	SI
	t= 30 meses	23,50	561,63	-1,72	SI
	t= 36 meses	23,59	570,73	-2,10	SI
	t= 42 meses	23,57	556,15	-2,01	SI
	t= 48 meses	23,84	578,91	-3,18	SI
L1/16 GL	t=0 meses	18,56	17585,64	N/A	N/A
	t=3 meses	18,83	13379,93	-1,45	SI
	t= 6 meses	18,96	12738,83	-2,15	SI
	t= 9 meses	18,95	12128,15	-2,10	SI
	t= 12 meses	18,95	12098,02	-2,08	SI
	t=18 meses	18,99	12304,45	-2,31	SI
	t=24 meses	18,65	13023,05	-0,46	SI
	t= 30 meses	18,94	13434,02	-2,00	SI
	t= 36 meses	18,94	12905,97	-2,01	SI
	t= 42 meses	18,96	12987,07	-2,15	SI
	t= 48 meses	19,30	11276,88	-3,97	SI

Tabla 58: Resultados de estabilidad del ADN extraído y conservado a -80°C .

***Criterios de aceptación:** Todos los resultados obtenidos en el análisis de las muestras deben ser positivos. El % de variación para la cantidad de parásitos media obtenida para cualquier extracción deberá ser como máximo del 25%.

RESULTADOS

Con los resultados representados en tabla anterior se evidencia que las muestras de ADN de ambas matrices almacenadas y conservadas a -80°C durante 48 meses se mantienen estables y cumplen con los criterios de aceptación establecidos siendo el % de variación menor al 25% en todos los tiempos de análisis.

4.3.9.6. Conservación de una muestra de tejido en refrigeración (2-8°C)

Los resultados de estabilidad obtenidos tras mantener la muestra de médula ósea (G1-13-MO-qPCR) y ganglio linfático (G1-13-GL- qPCR) en refrigeración durante 24 horas se representan en la siguiente tabla (Tabla 59) como el porcentaje de variación de la cantidad estimada de parásitos de dichas muestras tras 24 horas en refrigeración, respecto al tiempo 0 (t=0).

ESTABILIDAD					
Conservación de muestras en refrigeración (2-8°C).					
Muestras	Tiempo	Ct medio	Media del nº de parásitos	% de variación	Cumplimiento del criterio
G1-13-MO-qPCR	t=0	21.29	3.675	N/A	N/A
	t= 24 horas	21.24	4.040	-9.945	SI
G1-13-GL-qPCR	t=0 días	17.02	65.007	N/A	N/A
	t= 24 horas	17.38	59.577	8.353	SI

Tabla 59: Resultados de estabilidad de muestras conservadas en refrigeración a 2-8°C y analizadas con el método qPCR.

***Criterios de aceptación:** Todos los resultados obtenidos en el análisis de las muestras deberán ser positivos. El % de variación para la cantidad de parásitos media obtenida para la extracción tras 24 horas en refrigeración deberá ser como máximo del 25%.

Los resultados de la tabla anterior evidencian que las muestras positivas de médula ósea (G1-13-MO-qPCR) y ganglio linfático (G1-13-MO-qPCR) son estables conservadas en refrigeración a 2-8°C durante 24 horas, ya que el % de variación es de -9.945 y de 8.353, respectivamente, por lo que cumplen los criterios de aceptación establecidos.

El método qPCR estandarizado en nuestro laboratorio para determinar la presencia y concentración de ADNk de *Leishmania* en muestras de ADN canino extraídas de ganglio

RESULTADOS

linfático y médula ósea se ha validado con resultados aceptables en relación con los atributos de linealidad, precisión, especificidad, sensibilidad, robustez y estabilidad.

RESULTADOS

4.4. Resultados previos al desarrollo de un sistema de diagnóstico múltiple de la LCan

Gracias a la consecución de los objetivos de esta Tesis Doctoral, que planteaban validar las técnicas inmunológicas ELISA e IFI y la técnica parasitológica qPCR cuantitativa a tiempo real de médula ósea y ganglio linfático estandarizadas previamente, se presentan, en una publicación, los resultados previos al desarrollo de un sistema de diagnóstico múltiple empleando estas técnicas validadas como métodos de referencia. A continuación, se incluye un resumen del artículo publicado, así como el texto completo.

4.4.1. Application of qPCR method to hair and cerumen samples for the diagnosis of canine leishmaniosis in Araçatuba, Brazil. Vet Parasitol Reg Stud Reportes 15 (2019) 100267

RESUMEN

En estudios preliminares realizados en nuestro laboratorio (27,223,234) se ha descrito que el pelo y el cerumen, tanto de humanos como de animales, es capaz de acumular y excretar sustancias químicas y biológicas y, en concreto, ADNk de *Leishmania infantum* y *L. major* (224), que puede ser detectado mediante qPCR con alta sensibilidad en perros sintomáticos, asintomáticos y vacunados. Continuando con esta línea de investigación, en este trabajo se evaluó el uso combinado del método qPCR aplicado a muestras de pelo, cerumen y sangre adherida a papel Whatman, junto con los resultados serológicos obtenidos mediante la técnica ELISA SLA IgG2, de perros procedentes de Brasil.

Para llevar a cabo el estudio, una población de 21 perros fue dividida en dos grupos, A (16 perros naturalmente infectados por *L. infantum* y confirmados por métodos serológicos y qPCR de de ganglio linfático) y B (5 perros sanos). De cada uno de los animales (21), se tomaron muestras de sangre que fueron depositadas en papel Whatman (100µl), pelo de zonas del cuerpo sanas, cerumen mediante hisopos de algodón estériles y pelo de áreas que rodeaban las lesiones cutáneas cuando estaban

RESULTADOS

presentes (14 perros), las cuales no requirieron condiciones especiales de almacenamiento.

Nuestros resultados obtenidos mostraron que, en perros con la enfermedad avanzada y presencia de signos clínicos típicos, a excepción del número 2, el método qPCR de cerumen presentó la mayor sensibilidad (87,5%, 14/16), seguido del pelo de zonas que rodeaban a las lesiones (78,57%, 11/14), del pelo de zonas sanas (62,5%, 10/16) y sangre (68,75%, 11/16). Sin embargo, la cantidad media estimada de parásitos en la sangre (333,64) fue la más alta dentro de todas las muestras, aunque en solo dos animales (perros 2 y 13), seguido del cerumen (180,82), pelo de áreas lesionadas (104,14) y pelo de zonas sanas (98,5). Es decir, aplicando el método qPCR, se detectó ADNk en 14 de 16 perros, 9 mostraron resultados positivos en todas las muestras y el resto fue positivo en al menos dos muestras. Respecto a los dos perros (8 y 11), que no presentaron ADNk en ninguna de las muestras, el diagnóstico fue posible gracias a una respuesta de anticuerpos baja y alta respectivamente, reportada por el método ELISA SLA IgG2, aplicado a muestras de sangre adherida a papel Whatman y a la presencia de signos clínicos. Por otro lado, la especificidad del método qPCR aplicado a todas las muestras (sangre, cerumen y pelo) fue del 100%.

Teniendo en cuenta estos resultados, los análisis para la detección y cuantificación de ADNk de *L. infantum* en muestras de cerumen y pelo (especialmente de zonas lesionadas) proporcionan un diagnóstico más preciso de LCan en comparación con la sangre, por lo que recomendamos confirmar los resultados serológicos comúnmente utilizados en los programas de control mediante la cuantificación del ADNk en muestras de pelo por el método qPCR.



Contents lists available at ScienceDirect

Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports

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

Application of qPCR method to hair and cerumen samples for the diagnosis of canine leishmaniosis in Araçatuba, Brazil



Silvia Belinchón-Lorenzo^{a,*}, Rubén Muñoz-Madrid^a, Fernanda Grecco Grano^b, Virginia Iniesta^a, Javier Fernández-Cotrina^a, Juan Carlos Parejo^c, Isabel Monroy^a, Victoria Baz^a, Adela Gómez-Luque^a, José Luis Barneto^a, Carolina Grecco Grano Bordini^d, Gisele Fabrino Machado^b, Luis Carlos Gómez-Nieto^a

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

^b Laboratório de Patologia Aplicada (LApap), College of Veterinary Medicine, UNESP - Univ Estadual Paulista, Rua Clóvis Pestana, 793, Araçatuba, SP CEP: 16050-680, Brazil

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

^d Departamento de Clínicas Veterinárias (CCA), Universidade Estadual de Londrina (UEL), Campus Universitário, Londrina, PR CEP: 86051-990, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Hair
Cerumen
qPCR
Leishmania
Dogs
Brazil

ABSTRACT

Visceral leishmaniosis (VL) remains a serious public health problem in Brazil. Dogs are the main hosts of the parasite, developing canine leishmaniosis (CanL), hence the importance of an accurate diagnosis of the animals. Recently, the application of qPCR method to non-invasive samples obtained from dogs with CanL has shown high sensitivity. Thus, we analyzed by qPCR blood, hair (from healthy zones and cutaneous lesions) and cerumen of 16 dogs with confirmed leishmaniosis from Araçatuba, a Brazilian endemic area. Cerumen-qPCR showed the highest sensitivity (87.5%), followed by hair (lesions: 78.57%, healthy skin: 62.5%), and blood (68.75%). We also analyzed blood, hair and cerumen of 5 healthy dogs from a non-endemic area, obtaining 100% of specificity in all samples. The use of cerumen and hair for qPCR analysis provides high reliability, taking into account the sensitivity and total specificity of the method. The non-invasive sampling procedure without the need of specific conditions of storage and transport support the usefulness of hair and cerumen for the diagnosis of CanL.

1. Introduction

Leishmaniasis are diseases caused by protozoan parasites from the genus *Leishmania* transmitted by phlebotomine sandflies (Akhoundi et al., 2016). The visceral form of leishmaniosis (VL) is found worldwide, occurring over 90% of cases in six countries: Bangladesh, Brazil, Ethiopia, India, South Sudan and Sudan (WHO, 2017). In Brazil, VL cases are present both in rural and urban areas, being affected large cities such as Rio de Janeiro, Belo Horizonte, Araçatuba, Santarém, Corumbá, Teresina, Natal, São Luís, Fortaleza, Três Lagoas, Campo Grande and Palmas (Ministério da Saúde of Brazil, 2006).

Dogs are the main domestic reservoir of the parasite, developing canine leishmaniosis (CanL), and can present from subclinical to generalized disorders that sometimes overlap with other diseases, which difficult the diagnosis (Gomes et al., 2008). To confirm CanL, the Brazilian Zoonosis Control Centre perform immunological methods (Leite et al., 2010), but it is necessary to combine different techniques for a

more accurate diagnosis. In this context, the use of non-invasive samples for the molecular diagnosis of CanL has become increasingly important nowadays, as it has shown high sensitivity results (Leite et al., 2010). In Brazil, previous studies have evaluated conjunctival swabs, obtaining high sensitivity and specificity in symptomatic, asymptomatic and vaccinated dogs (Strauss-Ayali et al., 2004; Leite et al., 2010; Leite et al., 2011). In addition, studies conducted in Spain and Brazil have proved the efficacy of hair from dogs with CanL for the molecular diagnosis of the disease (Belinchón-Lorenzo et al., 2013; De Sousa Gonçalves et al., 2016). Finally, it has been also demonstrated that cerumen is a good source of *Leishmania* kinetoplast DNA (kDNA) (Belinchón-Lorenzo et al., 2016).

Therefore, the aim of this study was to assess the combined use of hair and cerumen samples by Real Time quantitative PCR (qPCR) of dogs from Araçatuba, a Brazilian endemic area, comparing these results with blood-qPCR and serology, in order to emphasize the importance of these non-invasive samples for the molecular diagnosis of CanL.

* Corresponding author.

E-mail address: sibelo@unex.es (S. Belinchón-Lorenzo).

<https://doi.org/10.1016/j.vprsr.2019.100267>

Received 1 October 2018; Received in revised form 17 January 2019; Accepted 25 January 2019

Available online 30 January 2019

2405-9390/ © 2019 Elsevier B.V. All rights reserved.

2. Material and methods

2.1. Animals

We established two different groups:

- Group A ($n = 16$): Dogs with confirmed leishmaniosis, 12 male and 4 female, ranging from 2 to 6 years old were selected from the Veterinary Teaching Hospital of UNESP, São Paulo State University and from the Zoonosis Control Center (Araçatuba, São Paulo State, Brazil). CanL diagnosis was performed by serology (DPP and ELISA, Bio- Manguinhos/Fiocruz, Manguinhos, RJ, Brazil) and afterwards confirmed using popliteal lymph node fine-needle aspiration. In compliance with the current state law (SUCEN of São Paulo, 2006), dogs were euthanized with the owners' permission. All dogs except one showed at least one of the typical clinical signs of the disease.
- Group B ($n = 5$): Healthy dogs were selected from veterinary clinics from Londrina (Paraná State, Brazil), a leishmaniosis non-endemic area. Dogs did not present any clinical signs, and were assessed as negative by parasitological and serological methods.

2.2. Sampling

Dogs from group A were anesthetized with pentobarbital (Hypnol®). Peripheral blood samples (4 ml) were obtained from the cephalic vein and collected in EDTA tubes. 100 μ l of blood were placed in Whatman paper. Then, animals were euthanized with potassium chloride. Hair samples were extracted with tweezers, from healthy body zones (all dogs) and from areas surrounding cutaneous lesions when present (14 dogs). Cerumen was obtained inserting double tipped sterile cotton swabs into the dogs' ears and swabbing against the surface of the vertical ear canal. Samples of healthy dogs from group B (blood, cerumen and hair) were obtained *in vivo* without anesthesia. All samples were stored at room temperature.

2.3. SLA ELISA

Whatman papers containing blood were washed in 1 ml of sterile PBS and stirred 24 h at 37 °C. Supernatant was diluted 1/50 and tested in duplicate. SLA ELISA assays were performed as described (Belinchón-Lorenzo et al., 2013). Cut-off value was set as mean O.D. values plus 3SD obtained from the 5 control dogs. Individual results are expressed as the mean O.D. of both duplicates.

2.4. DNA extraction and qPCR analysis

Half cotton swab with cerumen, Whatman papers with blood, and 10–15 hairs/sample were incubated at 56 °C overnight in 250 μ l of lysis buffer (10 mM TrisCl, 0.1 M EDTA, 0.5% SDS + 20 μ g/ml pancreatic RNase + proteinase K 100 μ g/ml). DNA was extracted using 200 μ l of supernatant with UltraClean BloodSpin kit (MoBio Laboratories, Carlsbad, CA, USA). The qPCR assays were performed following published protocols (Belinchón-Lorenzo et al., 2016). Samples were considered positive when the estimated quantity of parasites obtained was ≥ 1 .

3. Results

Table 1 shows clinical status, antibody levels and qPCR results of the studied population. All dogs from group A (excepting number 2), showed an advanced status of the disease with the presence of the typical clinical signs. The whole group showed positive antibody response by SLA-ELISA, assessed as low, medium and high. Regarding qPCR, kDNA was detected in 14 of 16 dogs, 9 showed positive results in all samples and the rest were positive to at least two samples. Dogs 8 and 11 did not present kDNA in any sample, despite both animals had

clinical signs and showed high and low antibody response, respectively.

Blood-qPCR reached the lowest sensitivity, 68.75% (11+/16), although the mean estimated quantity of parasites (333.64) was the highest within all samples, due to the great parasite load detected in dogs 2 and 13. In contrast, cerumen-qPCR showed the highest sensitivity, 87.5% (14+/16), with a mean estimated quantity of parasites of 180.82. Regarding hair-qPCR results, sensitivity was higher in hair from lesions (78.57%) than in healthy hair (62.5%), although mean quantities of kDNA obtained were similar (104.14 and 98.5, respectively). We could not obtain hair from skin lesions from dogs 2 (asymptomatic) and 3 (only had onychogryphosis as cutaneous sign).

On the other hand, the specificity of qPCR assays was the 100% in all samples from healthy dogs of the group B.

4. Discussion

Epidemiological control of VL in Brazil involves systematic treatment of human cases, insecticide treatment (Ferreira et al., 2008) and the elimination of dogs with CanL, previously confirmed by immunological analysis. However, serological techniques may present some problems like cross-reactivity with other parasitic diseases and low sensitivity and specificity in early or asymptomatic infections (De Andrade and Melo, 2014). Thus, for a more accurate diagnosis it is necessary to perform molecular techniques, especially qPCR, which provides a highly sensitive and specific detection and quantification of the parasitic DNA (Reithinger and Dujardin, 2007). Recently, the association between qPCR and non-invasive samples for the diagnosis of CanL has shown high sensitivity results, even when compared with samples obtained by an invasive way (Leite et al., 2010; Belinchón-Lorenzo et al., 2013). In Brazil, non-invasive samples have been evaluated, such as swabs from eye conjunctiva, from oral and nasal mucosa (De Andrade and Melo, 2014) and hair (De Sousa Gonçalves et al., 2016), obtaining high sensitivities. Taking these into account, we have analyzed by qPCR hair (from healthy and injured areas) and cerumen for the diagnosis of CanL in dogs from Araçatuba, a Brazilian endemic area.

Regarding cerumen samples, our sensitivity results (87.50%) are in agreement with those achieved in Spain (90.90%) from a population of 33 dogs (Belinchón-Lorenzo et al., 2016).

Concerning hair, our sensitivity results of hair from different healthy zones (62.50%) are consistent with the published by Belinchón-Lorenzo et al. in 2013 (69.24%, hair from ears), but lower than the 80% (dorsal hair) reached in Brazil (De Sousa Gonçalves et al., 2016). We detected kDNA in hair from different healthy body areas (cervical dorsal, abdominal lateral and head), even from the asymptomatic animal, but further research should be done regarding larger populations of dogs with and without clinical signs. It is worth to note that in the current study sensitivity increased using hair obtained from cutaneous lesions (78.57%), as desquamations or ulcers. A similar finding has been already described using a murine model of cutaneous leishmaniosis (Iniesta et al., 2013).

Despite hair and cerumen are a good source of kDNA for the diagnosis of CanL, we did not detect *Leishmania* kDNA in any sample from dogs 8 and 11. As both animals presented antibody response and clinical signs, a mild or low parasite load could explain their negative PCR results, being kDNA only detectable in lymphoid organs such as lymph nodes, since animals were confirmed as positive using popliteal lymph node fine-needle aspiration.

As samples suitable for qPCR, hair and cerumen have many advantages. The collection is fast, harmless, and they do not need specific conditions for transport and storage, being useful for large-scale field studies. Moreover, it has been demonstrated that *L. infantum* kDNA remains stable within hair after the exposure to different environmental conditions (Muñoz-Madrid et al., 2013).

Finally, we also performed serological and molecular analyses of dried blood spots in Whatman paper stored at room temperature.

RESULTADOS

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

Group	Animal no.	Clinical signs ^a	Origin of hair		Immunological analyses			qPCR analyses ^c (Estimated mean quantity of parasites/sample)	
			Healthy	Lesion	SLA IgG2 ELISA ^b (O.D.)	Blood	Cerumen	Hair	
								Healthy	Lesion
A	1	G,C,O	Cervical dorsal	Abdominal lateral	0.435(+)	8.13	181.15	3.07	10.9
	2	-	Abdominal dorsal	-	0.346(+)	1714.87	7.48	2.19	ND
	3	G,C,O,LN	Abdominal dorsal	-	0.443(+)	411.3	470.66	207.75	ND
	4	G,C,O	Head	Head	0.674(+++)	38.49	85.29	2.68	55.21
	5	C,O,LN	Head	Ear	0.991(+++)	1.35	1193.48	12.37	268.4
	6	G,C,O,LN	Head	Ear	1.475(+++)	419.13	36.18	162.24	138.78
	7	C,LN	Head	Right leg	1.107(+++)	N	1.22	N	24.71
	8	G,C	Head	Ear	1.301(+++)	N	N	N	N
	9	G,C,LN	Head	Ear	1.361(+++)	1.25	1.87	N	12.5
	10	C,O	Head	Ear	0.779(+++)	N	1.88	N	24.6
	11	C,O	Head	Ear	0.512(+)	N	N	N	N
	12	G,C,O,LN	Head	Head	1.254(+++)	19.24	59.99	14.1	36.69
	13	G,C	Head	Head	1.035(+++)	1009.88	1.24	N	N
	14	C	Head	Ear	1.102(+++)	N	16.28	300.43	85.67
	15	G,C,LN	Head	Ear	0.687(+++)	19.97	5.31	4.46	2.72
	16	C,O,LN	Head	Head	1.277(+++)	26.48	469.49	275.84	485.34
			% Sensitivity (X positives/Y total samples analyzed)			68.75% (11/16)	87.50% (14/16)	62.50% (10/16)	78.57% (11/14)
			Mean estimated quantity of parasites			333.64	180.82	98.51	104.14
B	17	-	Head	-	0.178	N	N	N	ND
	18	-	Head	-	0.122	N	N	N	ND
	19	-	Head	-	0.115	N	N	N	ND
	20	-	Head	-	0.108	N	N	N	ND
	21	-	Head	-	0.114	N	N	N	ND
				% Specificity (X negatives/Y total samples analyzed)			100% (5/5)	100% (5/5)	100% (5/5)

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

^a Clinical signs: O (ocular signs: conjunctivitis, ocular discharge), G (general signs: cachexia, temporalis muscle atrophy), LN (generalized lymphadenopathy), C (cutaneous signs: generalized alopecia, seborrhea, onychogriphosis, hypotrichosis, nasal hyperkeratosis).

^b SLA IgG2 ELISA: established cut-off positive O.D. ≥ 0.214 (set as the mean of O.D. values plus 3SD of the healthy dogs). Low positive (+): O.D. ≤ 0.5 ; medium positive (++) : 0.5 > O.D. ≤ 0.8 ; high positive (+++) : O.D. > 0.8.

^c qPCR: Positive result was considered when the estimated quantity of parasites obtained was ≥ 1 . Values obtained per diluted blood disk, 10–15 hairs and half cotton swab with cerumen sample.

Despite all positive dogs showed antibody responses, the sensitivity reached in blood-qPCR was the lowest (68.75%), in accordance with previous findings (Leite et al., 2010; De Almeida Ferreira et al., 2012). Thus, molecular analyses of cerumen and hair provide a more accurate diagnosis of CanL compared to blood.

5. Conclusion

Our results support the use of hair (especially from cutaneous lesions if they are present) and cerumen for the molecular diagnosis of CanL, being appropriate to confirm the results given by the serological analysis commonly used in Brazilian control programs.

Ethical statement

The study was approved by the institutional Ethics and Animal Welfare Committee (CEEA - Comissão de Ética e Experimentação Animal, UNESP, process #2014-00876).

Conflict of interest

The authors have no conflict of interest.

Acknowledgements

This investigation was partially supported by grants from the University of Extremadura (Spain).

References

- Akhoundi, M., Kuhls, K., Cannet, A., Vorýpka, J., Marty, P., Delaunay, P., Seren, D., 2016. A historical overview of the classification, evolution, and dispersion of *Leishmania* parasites and sandflies. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 10 (3), e0004349.
- Belinchón-Lorenzo, S., Iniesta, V., Parejo, J.C., Fernández-Cotrina, J., Muñoz-Madrid, R., Soto, M., Alonso, C., Gómez Nieto, L.C., 2013. Detection of *Leishmania infantum* kinetoplast minicircle DNA by Real Time PCR in hair of dogs with leishmaniasis. *Vet. Parasitol.* 192, 43–50.
- Belinchón-Lorenzo, S., Parejo, J.C., Iniesta, V., Fernández-Cotrina, J., Muñoz-Madrid, R., Monroy, I., Baz, V., Gómez-Luque, A., Serrano-Aguilera, F.J., Barneto, J.L., Gómez-Nieto, L.C., 2016. First detection of *Leishmania* kDNA in canine cerumen samples by qPCR. *Vet. Parasitol.* 228, 65–68.
- De Almeida Ferreira, S., Leite, R.S., Ituassu, L.T., Almeida, G.G., Souza, D.M., Fujiwara, R.T., Andrade, A.S.R., Melo, M.N., 2012. Canine skin and conjunctival swab samples for the detection and quantification of *Leishmania infantum* DNA in an Endemic Urban Area in Brazil. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 6 (4), e1596.
- De Andrade, A.S.R., Melo, M.N., 2014. Non-invasive molecular diagnosis of canine visceral leishmaniasis using conjunctival swab samples. In: *Leishmaniasis - Trends in Epidemiology, Diagnosis and Treatment*, Dr. David Claborn (Ed.), InTech, Available in: <http://www.intechopen.com/books/leishmaniasis-trends-in-epidemiology-diagnosis-and-treatment/non-invasive-molecular-diagnosis-of-canine-visceral-leishmaniasis-using-conjunctival-swab-samples>.
- De Sousa Gonçalves, R., Franke, C.R., Magalhães-Junior, J.T., Souza, B.M., Solcà, M.S., Larangeira, D.F., Barrouin-Melo, S.M., 2016. Association between *Leishmania infantum* DNA in the hair of dogs and their infectiousness to *Lutzomyia longipalpis*. *Vet. Parasitol.* 232, 43–47.
- Ferreira, S.de.A., Ituassu, L.T., De Melo, M.N., De Andrade, A.S., 2008. Evaluation of the conjunctival swab for canine visceral leishmaniasis diagnosis by PCR-hybridization in Minas Gerais State, Brazil. *Vet. Parasitol.* 152 (3–4), 257–263.
- Gomes, Y.M., Paiva Cavalcanti, M., Lira, R.A., Abath, F.G.C., Alves, L.C., 2008. Diagnosis of canine visceral leishmaniasis: biotechnological advances. *Vet. J.* 175, 45–52.
- Iniesta, V., Belinchón-Lorenzo, S., Soto, M., Fernández-Cotrina, J., Muñoz-Madrid, R., Monroy, I., Baz, V., Gómez-Luque, A., Parejo, J.C., Alonso, C., Gómez Nieto, L.C., 2013. Detection and chronology of parasitic kinetoplast DNA presence in hair of experimental *Leishmania major* infected BALB/c mice by Real Time PCR. *Acta Trop.* 128, 468–472.
- Leite, R.S., Ferreira Sde, A., Ituassu, L.T., de Melo, M.N., de Andrade, A.S., 2010. PCR diagnosis of visceral leishmaniasis in asymptomatic dogs using conjunctival swab

RESULTADOS

S. Belinchón-Lorenzo et al.

Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports 15 (2019) 100267

- samples. *Vet. Parasitol.* 170, 201–206.
- Leite, R.S., Mendes, V.C., Ferreira, A.L., Andrade, A.S., 2011. The use of conjunctival swab samples for PCR screening for visceral leishmaniasis in vaccinated dogs. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 20 (1), 36–41.
- Ministério da saúde, Brasil, 2006. Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. In: Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral.
- Muñoz-Madrid, R., Belinchón-Lorenzo, S., Iniesta, V., Fernández-Cotrino, J., Parejo, J.C., Serrano, F., Monroy, I., Baz, V., Gómez-Luque, A., Gómez Nieto, L.C., 2013. First detection of *Leishmania infantum* kinetoplast DNA in hair of wild mammals: Application of qPCR method to determine potential parasite reservoirs. *Acta Trop.* 180, 706–709.
- Reithinger, R., Dujardin, J.C., 2007. Molecular diagnosis of leishmaniasis: current status and future applications. *J. Clin. Microbiol.* 45 (1), 21–25.
- Strauss-Ayali, D., Jaffe, C.L., Burshtain, O., Gonen, L., Baneth, G., 2004. Polymerase chain reaction using noninvasively obtained samples, for the detection of *Leishmania infantum* DNA in dogs. *J. Infect. Dis.* 189 (9), 1729–1733.
- Superintendência de Controle de Endemias (SUCEN), São Paulo (Estado), 2006. Coordenadoria de Controle de Doenças (CCD). Secretaria de estado da Saúde. In: Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral Americana do Estado de São Paulo. Coordenação Vera Lucia Fonseca de Camargo-Neves, São Paulo: A Secretaria.
- WHO (World Health Organization), 2017. Leishmaniasis. Epidemiological Situation. Available in: <http://www.who.int/leishmaniasis/burden/en>, Accessed date: January 2019.

RESULTADOS

4.5. Resultados sobre el desarrollo del sistema multidiagnóstico de la LCan (MultiLeish 5D), y su utilidad en la Clínica Veterinaria

A continuación, se presenta el resumen y el texto completo del dossier del Sistema de Diagnóstico Múltiple "**MultiLeish 5D**", el cual ha sido desarrollado gracias a la estandarización de las técnicas de referencia plasmadas en la presente Tesis Doctoral y a una trayectoria de más de treinta años de I+D+I sobre la leishmaniosis. Este sistema ha sido comercializado en 2018 por VetIbérica, una empresa de suministros de productos de salud animal, la cual ha distribuido el kit por clínicas veterinarias de gran parte de España, con el objetivo de ofrecer al veterinario clínico una herramienta fiable en su actividad diaria para el diagnóstico precoz y la monitorización tras el tratamiento de perros con leishmaniosis.

Los primeros resultados consecuentes de la comercialización de MultiLeish 5D para el diagnóstico y seguimiento de perros con leishmaniosis procedentes de clínicas veterinarias de todo el territorio español han sido publicados en artículo titulado "**MultiLeish 5D: un novedoso sistema multidiagnóstico fiable de la LCan con valor pronóstico**" en la revista Argos, en un número especial dedicado a I+D EMPRESAS.

A continuación del dossier, se incluye también el texto completo del artículo publicado.

RESUMEN

Decimos que MultiLeish 5D tiene una total sensibilidad y especificidad en cualquier etapa de la enfermedad debido a que combina 5 diagnósticos en un solo sistema a partir de 3 muestras (sangre, pelo e hisopado dermomucoso) que se obtienen fácilmente sin causar molestias al animal y que, como se ha demostrado, son soportes que ofrecen gran estabilidad de las muestras sin necesidad de condiciones especiales de almacenamiento y transporte y que permite descartar la infección o, por el contrario, confirmar su magnitud (carga parasitaria, ADNk), así como de las respuestas de anticuerpos específicas anti-*Leishmania*.

RESULTADOS

Los niveles de anticuerpos IgG específicos son cuantificados por el método ELISA frente a SLA y proteínas internas recombinantes (PR) de *L. infantum*, a través de muestras de sangre seca adheridas a tarjetas de papel Whatman. Los resultados reflejan la Densidad Óptica (D.O.) normalizada frente al control positivo, y se categorizan en negativos (-), positivos bajos (+), positivos moderados (++) y positivos altos (+++), siendo los rangos de resultados los siguientes:

Rangos de resultados ELISA SLA	Rangos de resultados ELISA PR
Negativo (-): D.O. < 0,438	Negativo (-): D.O. < 0,509
Positivo bajo (+): D.O. 0,438-0,600	Positivo bajo (+): D.O. 0,509-0,700
Positivo moderado (++) : D.O. 0,601-0,800	Positivo moderado (++) : D.O. 0,701-0,900
Positivo alto (+++) : D.O. > 0,800	Positivo alto (+++) : D.O. > 0,900

Estos resultados se combinan con los que reporta el diagnóstico parasitológico realizado mediante qPCR para la detección y cuantificación del ADNk parasitario presente en las muestras de sangre, pelo e hisopados de heridas, conjuntivales o de cerumen. Los resultados representan la cantidad estimada de parásitos del género *Leishmania* presente en las distintas muestras, categorizando los resultados positivos en:

- Negativos (-): cantidad de parásitos < 1
- Positivos bajos (+): cantidad de parásitos 1-100,
- Positivos moderados (++) : cantidad de parásitos 101-1.000
- Positivos altos (+++) cantidad de parásitos >1.000

Por tanto, MultiLeish 5D es un biomarcador múltiple que combina dos análisis inmunológicos y tres moleculares, gracias a lo cual se consigue una total fiabilidad diagnóstica de la LCan con valor pronóstico, estando indicado por sus características para el diagnóstico de perros infectados por *L. infantum* en cualquier fase de la enfermedad, para el seguimiento de perros tratados, para la detección de posibles recidivas y el análisis de seguimiento anual recomendado especialmente entre los meses de diciembre a marzo para la prevención de esta parasitosis.

RESULTADOS

Tras la comercialización del kit multidiagnóstico se publicaron los resultados de 20 casos clínicos diagnosticados con MultiLeish 5D, correspondientes a distintos estadios de la enfermedad: 1) fase de incubación o de latencia, 2) casos patentes con signos clínicos compatibles, 3) seguimiento de perros tratados con eficacia terapéutica, 4) detección de posibles recidivas y 5) perros no infectados con signos compatibles de LCan en los que MultiLeish 5D no obtiene resultados dudosos o falsos positivos. Estos 20 casos clínicos procedentes de clínicas veterinarias de pequeños animales han sido una pequeña representación de las muestras analizadas (más de 1000, datos no mostrados), en los que MultiLeish 5D está siendo aceptado como un método fiable de diagnóstico y de seguimiento para la LCan.

MultiLeish5D

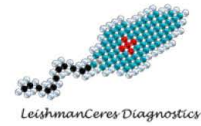
Sistema de diagnóstico múltiple para
detección y seguimiento de perros
infectados por *Leishmania infantum*



Iniesta Orozco V, Monroy Pérez I, Fernández Cotrina J, Baz Agudo V, Belinchón Lorenzo S, Muñoz Madrid R, Barneto Lozano JL, Gómez Luque A, Parejo Rosas JC, Gómez Nieto LC

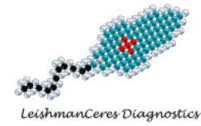
Laboratorio LeishmanCeres Diagnostics, Unidad de Parasitología y Enfermedades Parasitarias, Departamento de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad de Extremadura. Avda. de la Universidad s/n, 10003 Cáceres (España). leishmanceresdiagnostics@gmail.com

Publicado en enero de 2019



ÍNDICE

1. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE MultiLeish 5D	4
2. INSTRUCCIONES PARA LA TOMA DE MUESTRAS	5
2.1. MUESTRAS DE SANGRE	5
2.2. MUESTRAS DE PELO	6
2.3. MUESTRAS DE HISOPADO	7
2.4. REMISIÓN DE MUESTRAS	8
2.5. ANÁLISIS REALIZADOS Y EMISIÓN DE RESULTADOS	9
2.6. APLICACIONES: VALOR DIAGNÓSTICO Y PRONÓSTICO	11
3. LEISHMANIA Y LEISHMANIOSIS CANINA	13
3.1. CICLO BIOLÓGICO	13
3.2. PRIMOINFECCIÓN: RESISTENCIA O SUSCEPTIBILIDAD	16
3.3. EXPRESIONES CLÍNICAS DE LA LEISHMANIOSIS CANINA	18
3.4. LA PIEL Y SU PAPEL EN LA LEISHMANIOSIS CANINA	22
3.5. DIAGNÓSTICO DE LA ENFERMEDAD	24
3.5.1. DIAGNÓSTICO INMUNOLÓGICO	24
3.5.2. DIAGNÓSTICO MOLECULAR POR qPCR	25
4. EJEMPLOS DE DIAGNÓSTICOS CON MultiLeish 5D	27
CASO CLÍNICO 1: LEISHMANIOSIS LATENTE EVOLUTIVA: CUTÁNEA LOCALIZADA	28
CASO CLÍNICO 2: LEISHMANIOSIS EVOLUTIVA CRÓNICA: PATENTE O SINTOMÁTICA	29
CASO CLÍNICO 3: LEISHMANIOSIS EN PERROS TRATADOS: EFICACIA TERAPEÚTICA	30
CASO CLÍNICO 4: LEISHMANIOSIS EN PERROS TRATADOS: DETECCIÓN DE RECIDIVAS	31
5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	32



PREFACIO

El sistema de diagnóstico múltiple de la leishmaniosis canina **MultiLeish5D** ha sido desarrollado con el objetivo de ofrecer al veterinario clínico una herramienta fiable en su actividad diaria.

Dada la elevada prevalencia de la leishmaniosis canina en España y, por consiguiente, la alta casuística en la clínica, **MultiLeish5D** permite el diagnóstico precoz y seguimiento de perros con leishmaniosis y su monitorización tras el tratamiento, ya que es capaz de determinar en el tiempo tanto la eficacia terapéutica como los casos de recidivas tan frecuentes en esta enfermedad. Además, es un sistema totalmente preciso como punto de partida para la profilaxis, permitiendo descartar con seguridad la presencia del parásito en perros sanos que vayan a ser vacunados frente a leishmaniosis.

MultiLeish5D combina 5 diagnósticos específicos y sensibles en un solo sistema a partir de 3 muestras (sangre, pelo e hisopado dermomucoso) obtenidas fácilmente, y de gran estabilidad en los soportes utilizados, que permiten descartar la infección o, por el contrario, confirmar su magnitud (carga parasitaria), así como determinar las respuestas inmunitarias frente a los distintos antígenos de *Leishmania infantum*. Los resultados obtenidos conllevan una excepcional sensibilidad y especificidad, descartando valores dudosos y falsos positivos o negativos y permitiendo el diagnóstico diferencial frente a otras enfermedades compatibles o similares a la leishmaniosis canina. Además, son reproducibles y comparables en el tiempo, lo que permite controlar de manera precisa la evolución de los pacientes.

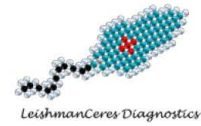
Para concluir, sólo mencionar que **MultiLeish5D** es fruto de más de treinta años de I+D+i de *LeishmanCeresDiagnostics*, un grupo multidisciplinar de investigadores de la Universidad de Extremadura (UEX) especializados en diagnóstico y profilaxis de la leishmaniosis canina.

En nombre de todo el personal e investigadores de *LeishmanCeresDiagnostics*, esperamos que **MultiLeish5D** sea un instrumento de gran utilidad para los profesionales veterinarios, sus pacientes y los responsables de los animales, ya que la leishmaniosis es un problema de todos.

Dr. Luis Carlos Gómez Nieto

Director de *LeishmanCeresDiagnostics*

Cáceres, octubre de 2018



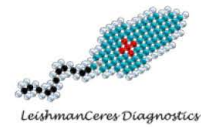
1. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE MultiLeish 5D

Este método combinado está indicado para el diagnóstico precoz de perros infectados por *Leishmania infantum* y para el seguimiento de perros tratados frente a esta enfermedad con total fiabilidad, permitiendo la detección y cuantificación de las respuestas de anticuerpos específicas anti-*Leishmania* y de la carga parasitaria (ADNk) presente en las diferentes muestras requeridas:

- La respuesta inmune es detectada y cuantificada por el método ELISA frente a antígenos totales (SLA) y proteínas internas recombinantes de *L. infantum* (PR) a través de muestras de sangre seca adheridas a la tarjeta de papel.
- El diagnóstico molecular es realizado mediante Real Time PCR (qPCR) para la detección y cuantificación del ADNk parasitario presente en las muestras de sangre, pelo e hisopados de heridas, conjuntivales o de cerumen.

La combinación de dos análisis inmunológicos y tres moleculares ofrece una total especificidad y sensibilidad en cualquier etapa de la leishmaniosis canina (primoinfecciones, portadores latentes, patentes o sintomáticos), siendo adecuada para el seguimiento y monitorización de perros tratados frente a esta enfermedad.

La obtención de sangre, pelo e hisopados es rápida, sencilla y no causa molestias al animal. Además, las muestras de pelo, sangre adherida al soporte de papel y las contenidas en hisopos de algodón permanecen estables muchos meses a temperatura ambiente **sin necesidad de condiciones especiales de almacenamiento ni transporte.**



2. INSTRUCCIONES PARA LA TOMA DE MUESTRAS

Las muestras de sangre, pelo e hisopados se obtendrán y depositarán en los correspondientes soportes, en base al protocolo explicado a continuación.

2.1. MUESTRAS DE SANGRE

Rellenar los datos requeridos en la tarjeta (Figura 1B).

Una vez extraída por venopuntura, depositar con la pipeta adjunta 3 gotas de sangre recién obtenida o con anticoagulante en cada uno de los tres círculos de la tarjeta (Figura 1C), y dejar secar completamente a temperatura ambiente (Figura 1D).

Introducir la tarjeta en la bolsa de plástico y conservar a temperatura ambiente hasta su remisión a *LeishmanCeres Diagnostics* (Figura 1E).

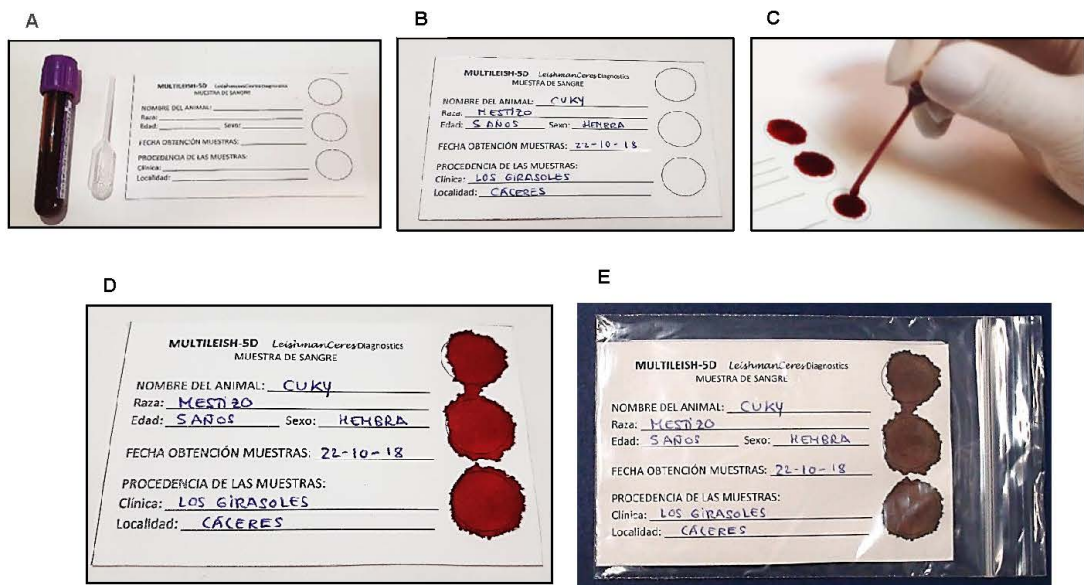


Figura 1

2.2. MUESTRAS DE PELO

Obtener al menos 20 pelos utilizando para ello unas pinzas previamente desinfectadas con alcohol, con el siguiente orden de preferencia:

1. En el caso de existir **lesiones dérmicas**, el pelo se tomará de la zona de piel que rodea a dicha lesión (**Figura 2A**)
2. Si el animal no presenta lesiones dérmicas, se cogerá pelo de la **punta de la oreja** (**Figura 2B**)

Depositar la muestra en la bolsa correspondiente (**Figura 2C**) y rellenar la información requerida en la etiqueta (**Figura 2D**). Conservar la muestra a temperatura ambiente hasta su remisión a *LeishmanCeres Diagnostics*.



Figura 2

2.3. MUESTRAS DE HISOPADO

La zona de toma de muestra de hisopado (**Figura 3**) dependerá de la presencia o ausencia lesiones y con el siguiente orden de preferencia:

1. Si existe lesión dérmica ulcerativa se tomará una **muestra de la herida (hh)** frotando ambas puntas del hisopo contra la misma (**Figura 3A**).



2. En presencia de cualquier tipo de patología ocular se tomará una **muestra de células conjuntivales (hc)**, introduciendo cada punta del hisopo en uno de los sacos conjuntivales del párpado inferior y frotando suavemente (**Figura 3B**).

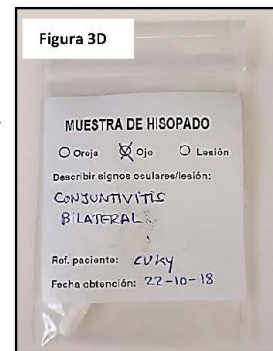


En el caso de existir tanto úlceras como sintomatología ocular se tomará la muestra de la úlcera.

3. Si no se observan signos clínicos externos se obtendrá una **muestra de cerumen (ho)** de cada oído, frotando cada canal auditivo externo con cada una de las puntas del hisopo, comprobando que se ha recogido muestra (**Figura 3C**).



Depositar el hisopo en la bolsa correspondiente y rellenar la información requerida en la etiqueta (**Figura 3D**). Conservar a temperatura ambiente hasta su remisión a *LeishmanCeres Diagnostics*.



2.4. REMISIÓN DE MUESTRAS

Depositar las bolsas que contienen las muestras de pelo e hisopado, respectivamente, en el interior de la bolsa que contiene la tarjeta con la sangre (Figura 4).

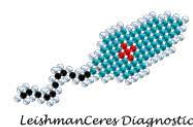


Figura 4: Bolsa de muestras lista para su remisión.

Enviar las muestras a la siguiente dirección:

A/A Dr. Luis Carlos Gómez Nieto. LeishmanCeres Diagnostics
Unidad de Parasitología y Enfermedades Parasitarias, Facultad de Veterinaria (UEX)
Avda. de la Universidad s/n
10003 Cáceres

Email: leishmanceresdiagnostics@gmail.com
Tfno: 927257131 // 927251504



2.5. ANÁLISIS REALIZADOS Y EMISIÓN DE RESULTADOS

Gracias a la combinación de 2 análisis inmunológicos (ELISA) y 3 moleculares (qPCR), **MultiLeish-5D** permite la detección y cuantificación de las respuestas de anticuerpos específicas anti-*Leishmania* y de la carga parasitaria.

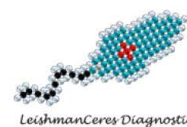
Los niveles de anticuerpos IgG específicos son cuantificados por el método ELISA frente a antígenos totales (SLA) y proteínas internas recombinantes (PR) de *L. infantum* a través de las muestras de sangre seca adheridas a la tarjeta de papel. Se emitirá un resultado numérico que reflejará la **Densidad Óptica** (D.O.) obtenida (normalizada frente al control positivo), clasificándose los resultados positivos en tres categorías (bajos, moderados y altos):

Rangos de resultados ELISA SLA	Rangos de resultados ELISA PR
Negativo (-): D.O. < 0,438	Negativo (-): D.O. < 0,509
Positivo bajo (+): D.O. 0,438-0,600	Positivo bajo (+): D.O. 0,509-0,700
Positivo moderado (++) : D.O. 0,601-0,800	Positivo moderado (++) : D.O. 0,701-0,900
Positivo alto (+++) : D.O. > 0,800	Positivo alto (+++) : D.O. > 0,900

El diagnóstico molecular es realizado mediante Real Time PCR (qPCR) para la **detección y cuantificación del ADNk parasitario** presente en las muestras de sangre, pelo e hisopados. Se emitirá un resultado que reflejará la **cantidad estimada de parásitos** del género *Leishmania* presente en las distintas muestras, clasificándose los resultados positivos en tres categorías (bajos, moderados y altos):

Rangos de resultados qPCR
Negativo (-): cantidad de parásitos < 1
Positivo bajo (+): cantidad de parásitos 1-100
Positivo moderado (++) : cantidad de parásitos 101-1.000
Positivo alto (+++) : cantidad de parásitos >1.000

LeishmanCeres Diagnostics



En el **informe de resultados (Figura 5)** emitido por *LeishmanCeres Diagnostics* todos estos valores son reflejados en tanto en una **tabla resumen** como en una **gráfica de barras**, representando la negatividad y los rangos de positividad (bajo+, moderado++ y alto+++) de cada una de las muestras analizadas. Esto permite su mejor interpretación, tanto desde el primer diagnóstico como en la posterior comparativa cuando se realizan las sucesivas revisiones del mismo animal en la clínica.

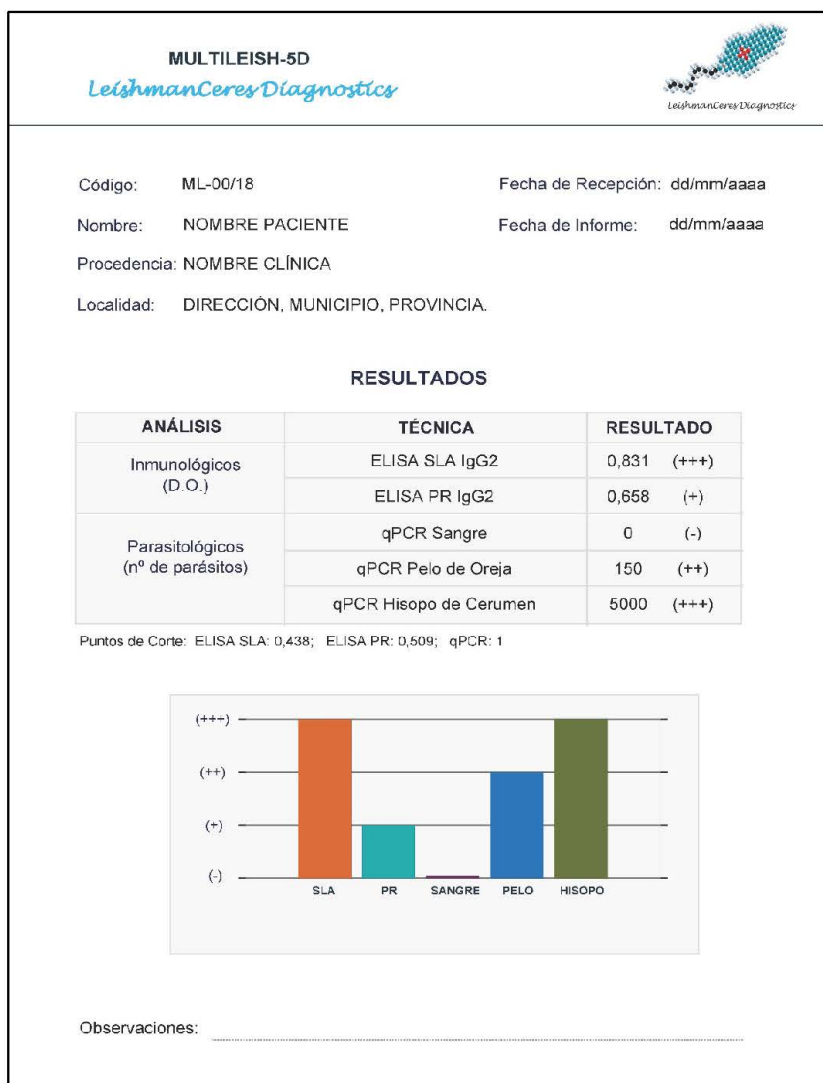
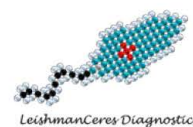


Figura 5: Ejemplo de informe de resultados emitido por *LeishmanCeres Diagnostics*



2.6. APLICACIONES: VALOR DIAGNÓSTICO Y PRONÓSTICO

MultiLeish5D permite determinar la ausencia o presencia de infección por *L. infantum* con **total especificidad y sensibilidad**, cuantificándose tanto los niveles de los distintos tipos de anticuerpos anti-*Leishmania* como del número estimado de parásitos presentes en sangre, piel o mucosas.

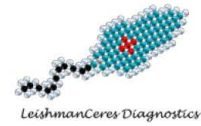
Por sus características, **MultiLeish5D** está indicado en:

- **El diagnóstico de perros infectados por *L. infantum*** en cualquier fase de la enfermedad.
- **El seguimiento de perros tratados.** Ayuda a la completa monitorización y evaluación de la eficacia terapéutica (disminución tanto del nivel de anticuerpos como de la carga parasitaria) en perros positivos tratados.
- **La detección de posibles recidivas** a lo largo de la vida del animal.
- **El análisis anual** (recomendado entre los meses de diciembre a marzo) **previo de los animales que vayan a ser vacunados frente a la leishmaniosis**, posibilitando descartar de manera totalmente precisa la infección por este parásito.

MultiLeish5D conjuga **5 biomarcadores** diagnósticos específicos en sus resultados, lo que permite conocer con exactitud los tipos y magnitud de las respuestas inmunitarias, así como la carga parasitaria de los perros infectados. Cada uno de los biomarcadores utilizados presta una información valiosa desde el primer diagnóstico y es punto de partida para el seguimiento de los perros tratados a lo largo de su vida.

- **Anticuerpos anti-SLA (ELISA):** es el biomarcador inmunológico más sensible y precoz en el diagnóstico de la LCan que permite, además, valorar la magnitud de la respuesta de anticuerpos frente a *L. infantum*.
- **Anticuerpos anti-PR (ELISA):** es un biomarcador inmunológico específico asociado a formas diseminadas de la LCan con elevadas cargas parasitarias, por lo que es indicador de eficacia terapéutica y de recidivas en LCan.
- **ADNk en sangre (qPCR):** es un biomarcador molecular específico de la detección (50-60% de los casos) de perros con visceralización y diseminación parasitaria (presencia de ADNk circulante), por lo que es indicador de susceptibilidad, de recidivas y de monitorización de la eficacia del tratamiento frente a LCan.
- **ADNk pelo (qPCR):** es un biomarcador molecular específico y altamente sensible indicado en la detección de diseminación y visceralización parasitaria incluso en ausencia de lesiones dérmicas. En todos los casos de dermatopatías, el pelo es un biomarcador desde

LeishmanCeres Diagnostics



la primoinfección hasta la visceralización, y de curación o de detección de recidivas en los casos de fallo terapéutico.

- **ADNk dermomucoso (qPCR):** es un biomarcador molecular específico y altamente sensible indicado en la detección y cuantificación de la carga parasitaria en piel y mucosas.
 - a) **Hisopado de heridas (hh):** es capaz de detectar la presencia y carga parasitaria de *L. infantum* en la piel lesionada con total sensibilidad. Indicado en el diagnóstico y detección de recidivas en perros tratados que cursan con esta expresión clínica. También resulta de mucha utilidad a la hora de descartar (resultado negativo) dermatopatías de etiología diferente a LCan.
 - b) **Hisopado conjuntival (hc):** es capaz de detectar la presencia y carga parasitaria de cualquier oculopatía asociada a LCan con total sensibilidad. Indicado en diagnóstico y detección de recidivas en perros tratados. También resulta de mucha utilidad a la hora de descartar (resultado negativo) oculopatías distintas a las producidas por LCan.
 - c) **Hisopado ótico (ho):** la acumulación progresiva del ADNk parasitario en el cerumen permite la detección específica y sensible de portadores de *L. infantum* y el seguimiento de perros tratados.

En resumen, **MultiLeish5D** es un biomarcador múltiple combinado que obtiene cinco resultados diagnósticos en uno, gracias a lo cual consigue una total fiabilidad diagnóstica de la LCan con valor pronóstico.

3. LEISHMANIA Y LEISHMANIOSIS CANINA

3.1. CICLO BIOLÓGICO

El ciclo de vida del parásito *Leishmania* (Figura 6) es asexual y heteroxeno, es decir, tiene lugar en dos hospedadores diferentes: uno intermediario (insecto díptero: flebotomo), que actúa como vector, y uno definitivo, que es un vertebrado casi siempre mamífero (especies de roedores, cánidos y hombre, principalmente).

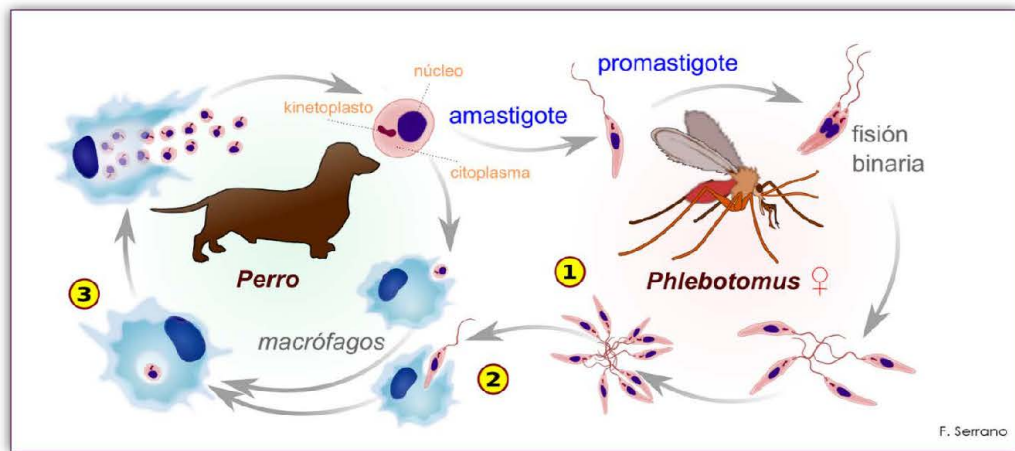


Figura 6: Ciclo de vida de *Leishmania* spp.

El ciclo de vida está presente en ecosistemas silvestres, rurales o domésticos (Figura 7).

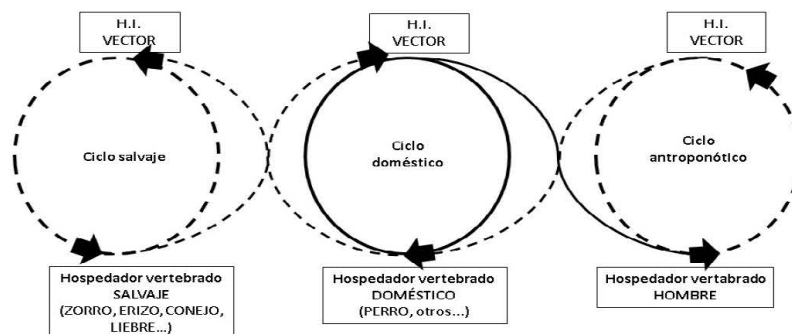
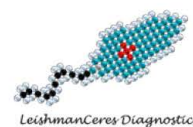


Figura 7: Interacciones entre los ciclos silvestre, doméstico y humano de la leishmaniosis visceral (adaptado de Rioux, 1977)



El ciclo se inicia cuando las hembras hematófagas de flebotomo ingieren, con su picadura, formas amastigote de la piel del hospedador infectado. Los amastigotes (redondeados y sin flagelo visible) se liberan en el intestino del insecto y se transforman en promastigotes (flagelados y móviles). Éstos pasan por diferentes estadios de maduración en el hospedador invertebrado hasta que son infectivos y se sitúan en la probóscide (trompa) del insecto.

Cuando el flebotomo pica en la piel del mamífero, los promastigotes son liberados en el punto de inoculación. En este momento moléculas del complemento, anticuerpos y células fagocíticas van a eliminar hasta el 80% de los parásitos inoculados en la picadura. Sin embargo, un porcentaje de los promastigotes evade la lisis y es ingerido por células del Sistema Mononuclear Fagocítico (principalmente macrófagos), localizándose dentro de los fagolisosomas. En ellos los promastigotes se transforman en amastigotes, manteniéndose en esta forma en el interior del hospedador y evadiendo o reduciendo el impacto de los mecanismos potencialmente destructivos para el parásito con los que están equipados los macrófagos, tales como radicales de oxígeno, óxido nitroso, enzimas lisosomales, etc.

Los flebotomos, vectores naturales de *Leishmania*, son pequeños insectos que miden 3-4 mm. En España se han citado aproximadamente 12 especies, siendo *P. perniciosus* en especial y *P. ariasi* las más involucradas en la transmisión (**Figura 8**).



Figura 8: Ejemplar hembra de *Phlebotomus* spp.

La distribución de las poblaciones de estos dípteros es muy variada, encontrándose tanto en regiones húmedas como en zonas áridas, y en altitudes comprendidas entre los 0 y los 2500 metros sobre el nivel del mar, es decir, desde valles y vegas hasta zonas montañosas. Los factores medioambientales necesarios e idóneos para su desarrollo (**Figura 9**) son temperaturas medias de 17-28° C, zonas protegidas de la luz solar directa, con humedad moderada y abundante materia orgánica de origen animal y/o vegetal en descomposición como hojarasca y restos de podas, madrigueras de animales, viviendas en ruinas, gallineros o establos.

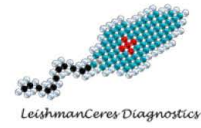
Así, durante el día, estos insectos suelen mantenerse ocultos en sus diversos refugios, saliendo al atardecer para alimentarse. Son más abundantes en áreas rurales o periurbanas, y en las ciudades suelen encontrarse en zonas ajardinadas, parques y arboledas. Los perros con más riesgo de contraer la infección son aquellos que habitan fuera de casa, y sobre todo aquéllos que pasan la noche en el exterior, ya las hembras de estos insectos pican desde la puesta de sol hasta el amanecer.



Figura 9: Condiciones ecológicas favorables para la presencia de flebotomos

El periodo de actividad de los flebotomos es variable, totalmente dependiente de la climatología, comenzando con la finalización de la estación fría y el inicio de la primavera y terminando en otoño con la aparición de bajas temperaturas, aunque la fenología de los adultos dependerá de las diferentes latitudes y áreas geográficas, ya que en las zonas de clima más cálido pueden encontrarse prácticamente durante todo el año. La frecuencia de la transmisión de *Leishmania* está directamente relacionada con la densidad de estos vectores.

Con estos factores epidemiológicos mencionados, resulta comprensible la elevada prevalencia de la leishmaniosis canina en los países de la Cuenca Mediterránea.



3.2. PRIMAINFECCIÓN: RESISTENCIA O SUSCEPTIBILIDAD

Aunque se conocen muchos y variados aspectos de la respuesta inmune desarrollada como consecuencia de la infección por *Leishmania*, no están claros los mecanismos involucrados en dicha susceptibilidad o resistencia al establecimiento de la infección, si bien es cierto que tanto la respuesta inmune generada (**Figura 10**) como la base genética propia de cada individuo son claves para controlar o padecer la infección, especialmente en las especies viscerotropas como *L. infantum*.

Los animales predispuestos a padecer la enfermedad o **susceptibles** presentan una escasa capacidad de linfoproliferación (inmunidad celular escasa o nula) y altos títulos de anticuerpos frente a *Leishmania*, produciéndose una desmesurada respuesta humoral no protectora frente a los antígenos del parásito, con una elevada producción de inmunoglobulinas. Éstas son básicamente de tipo IgG, y sus niveles circulantes generalmente se corresponden con la intensidad de la infección. En los perros susceptibles la aparición de signos clínicos tiene lugar habitualmente tras un periodo de incubación de 2 a 6 meses. En cuanto a la base genética, existen ciertas razas que muestran predisposición al desarrollo de la enfermedad clínica, estando también asociada a otros factores como estado nutricional, virulencia de la cepa del parásito o presencia de otras enfermedades concomitantes.

Por el contrario, los animales **resistentes** presentan una adecuada y equilibrada respuesta inmune, tanto natural como adquirida de las diferentes poblaciones celulares y de sus mediadores inmunológicos o citocinas. En estas situaciones, los perros suelen mostrar moderados niveles de anticuerpos circulantes y bajas cargas parasitarias. Estos animales pueden portar parásitos toda su vida sin mostrar sintomatología (portadores sanos). Al igual que ocurre con los perros susceptibles, se ha demostrado que ciertas razas a pesar de estar expuestas al parásito al mismo nivel que otras, son capaces de desarrollar una respuesta inmune protectora y mostrar raramente enfermedad clínica. Es importante tener en cuenta que un cambio en el estado de salud de los animales resistentes debido a estados de gestación o lactancia, la aparición de enfermedades concomitantes o la administración de medicamentos inmunosupresores podría reactivar las infecciones latentes y conducir a la aparición de enfermedad clínica.

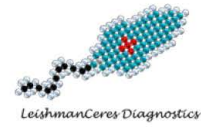


Figura 10: Resistencia y susceptibilidad en leishmaniosis canina

3.3. EXPRESIONES CLÍNICAS DE LA LEISHMANIOSIS CANINA

La presencia de signos clínicos en los perros con leishmaniosis (**Figura 11**) depende en gran medida del tipo de respuesta inmune generada por cada animal. Los perros naturalmente resistentes a la infección, con una moderada y equilibrada respuesta humoral y adecuada respuesta inmune de tipo celular, pueden ser portadores de los parásitos toda su vida y no mostrar sintomatología bajo formas latentes asintomáticas e incluso regresivas y de autocuración en ausencia de tratamiento.

Por el contrario, los animales predispuestos a desarrollar la infección (formas evolutivas patentes o sintomáticas de cursos agudo, subagudo o crónico) presentan una marcada respuesta inmune de tipo humoral no efectiva, junto con una escasa capacidad defensiva de base celular mediada por citocinas.

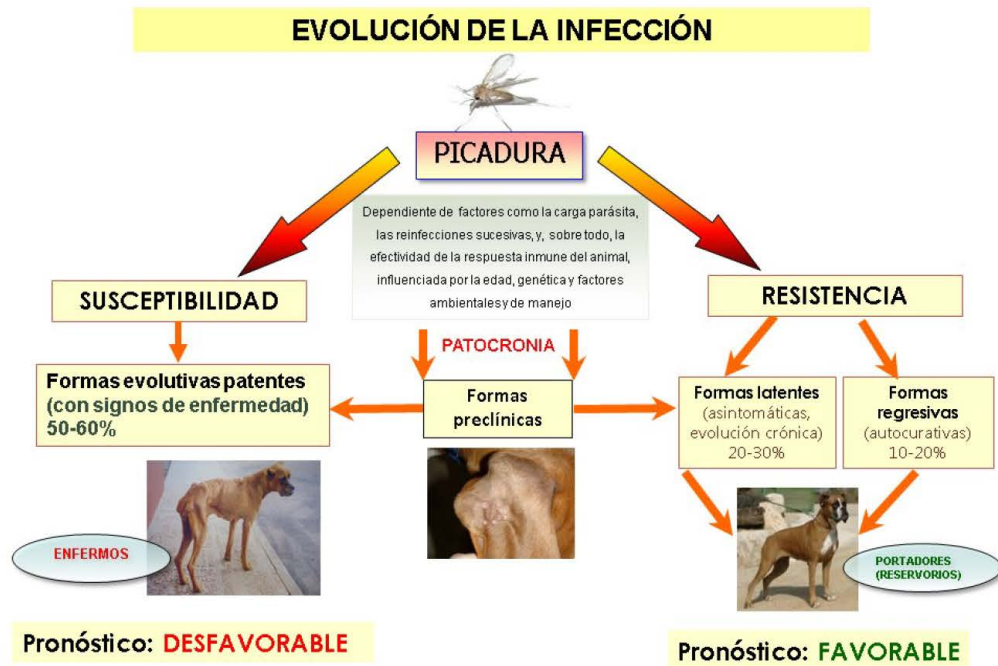


Figura 11: Patocronia: evolución de la infección hacia formas resistentes o susceptibles de la enfermedad

Dentro de la variabilidad clínica de esta enfermedad existen signos altamente frecuentes tal y como se muestra en la **Figura 12**.

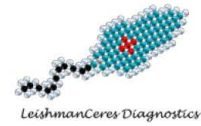


Figura 12: Patocronia: manifestaciones clínicas más frecuentes de la leishmaniosis canina (adaptado de Gómez Nieto, 1990)

En cuanto al curso de la LCan, las manifestaciones clínicas dependerán de la patocronia o fase en la que se encuentre la enfermedad (**Figura 13**).

En las fases tempranas pueden observarse únicamente signos clínicos generales, como pérdida de peso, astenia y apatía (**Periodo 1**).

A medida que la enfermedad progresa y se hace patente, pueden manifestarse una gran variedad de signos clínicos además de los generales inespecíficos presentes al inicio (**Periodo 2**). Uno de los más comunes es el aumento de tamaño de los ganglios linfáticos o linfadenomegalia. Por otra parte, se ha demostrado que el 90% de los perros con leishmaniosis patente pueden desarrollar alteraciones cutáneas. Entre las más importantes destacan: alopecia difusa o circunscrita, dermatitis exfoliativa o descamativa, de tipo papular o nodular, úlceras, onicogriposis e hiperqueratosis. Además, un porcentaje importante de animales desarrolla alteraciones oculares, siendo las más comunes la queratoconjuntivitis y la uveítis. Por último, los perros también pueden presentar hemorragia nasal o epistaxis en esta fase de la enfermedad.



Si la LCan no es diagnosticada y tratada a tiempo, los animales pueden manifestar un marcado deterioro del estado general, emaciación y finalmente caquexia (**Periodo 3**), junto con daños en órganos internos tales como hígado, bazo o riñón sobre todo, lo que conduce finalmente a la muerte del paciente.

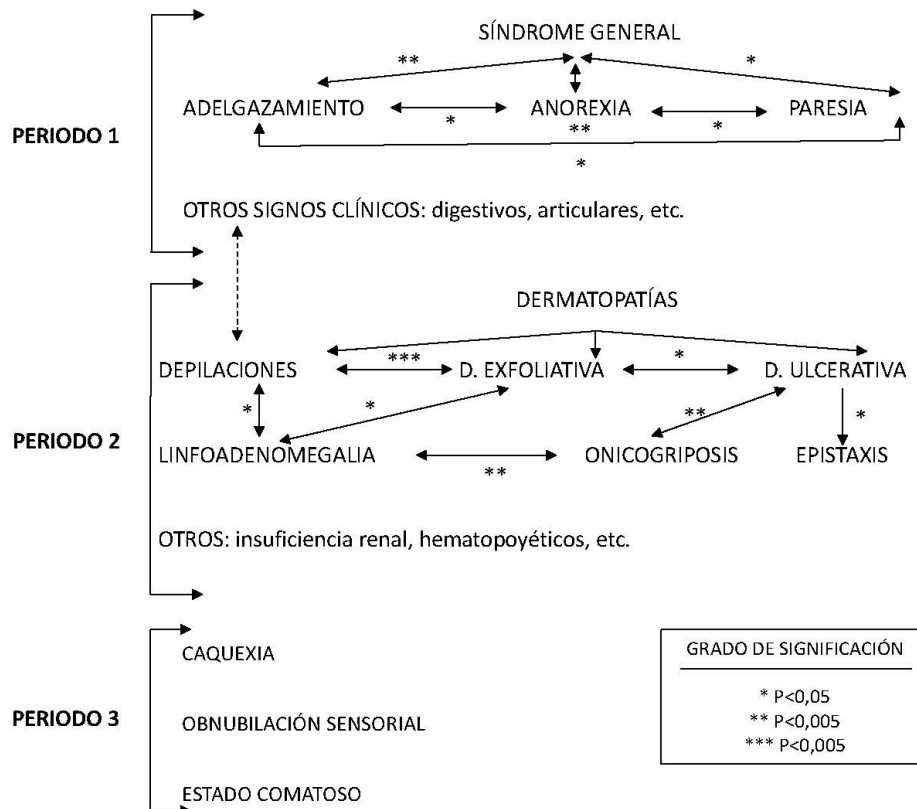
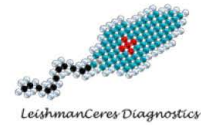


Figura 13: Curso de la enfermedad (adaptado de Gómez Nieto, 1990)

Debido a que existen numerosas enfermedades que pueden cursar con sintomatología similar a la producida por la LCan es necesario realizar un diagnóstico diferencial con otras patologías de base inmunológica o infectocontagiosa, tales como hepatozoonosis, babesiosis, ehrlichiosis, sarna sarcóptica y demodéica, así como varios tipos de alergias, aunque es posible que debido al deterioro del sistema inmune del animal aparezcan estas enfermedades de forma concomitante.

En cuanto a los **hallazgos analíticos** más frecuentes, destaca la disproteinemia, con el aumento de las proteínas totales por hiperglobulinemia (especialmente las gammaglobulinas



debido a la elevada respuesta inmune humoral producida), e hipoalbuminemia junto con descenso del ratio albúmina/globulinas. Las alteraciones detectadas en los parámetros hematológicos observadas con más frecuencia son anemia, trombocitopenia y leucopenia. Además, y debido al posible daño de los órganos, es necesario sobre todo el estudio de parámetros renales y hepáticos, puesto que el aumento de urea, creatinina y enzimas hepáticas, así como la presencia de proteinuria podrían ser indicativas de la LCan activa y de mal pronóstico.

Por último, hay que resaltar que un gran número de animales pueden ser resistentes a la infección y no mostrar sintomatología, de ahí la **importancia de confirmar siempre la sospecha clínico-lesional empleando métodos diagnósticos tanto inmunológicos como parasitológicos (Figura 14).**

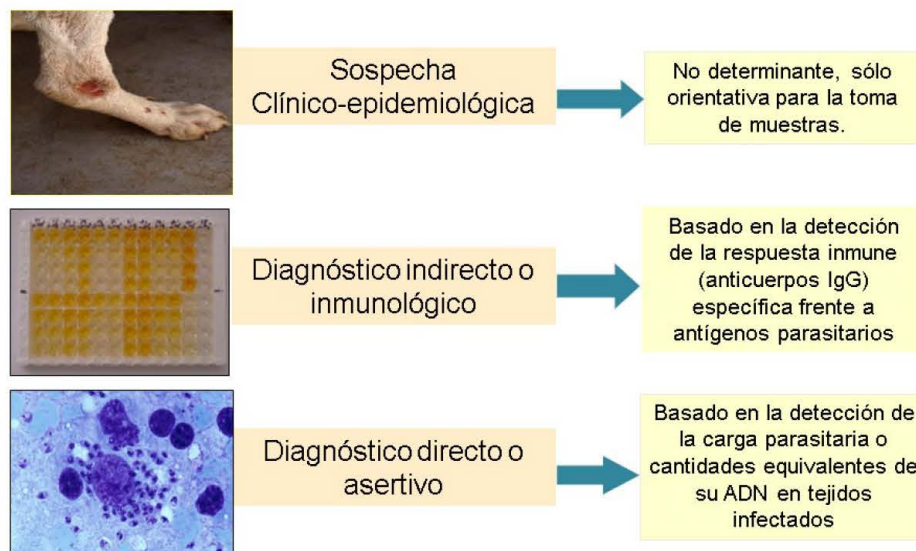


Figura 14: Tipos de métodos diagnósticos empleados en leishmaniosis canina

3.4. LA PIEL Y SU PAPEL EN LA LEISHMANIOSIS CANINA

La piel, órgano más grande de los mamíferos, es la principal vía de entrada y salida de parásitos transmitidos por vectores. Realiza varias funciones vitales destinadas a mantener el estado homeostático del cuerpo asegurando el funcionamiento de los órganos internos, ya que actúa como depósito de agua, electrolitos y macromoléculas. Además, la piel actúa como sistema de defensa inmunológica (natural y adquirida) gracias a la acción de distintos tipos de poblaciones celulares. Por último, también tiene funciones detoxificadoras de agentes químicos y biológicos, como es el caso de la eliminación de ADNk de *Leishmania* a través de la piel y anejos cutáneos.

El sistema inmune de la piel es la primera línea de defensa contra la leishmaniosis (Figura 15). Tras la inoculación de las formas promastigotes por parte del flebotomo vector, factores del complemento, células de Langerhans, neutrófilos, fibroblastos y queratinocitos activan la inmunidad innata de la piel. Además, los queratinocitos de la piel regulan la expresión de moléculas y receptores que favorecen la activación y migración de leucocitos al sitio de infección. En la piel los parásitos, ya en forma de amastigotes intracelulares, pueden permanecer hasta al menos 6 meses desde la primoinfección como dermatitis papular o en forma de chancro de inoculación.

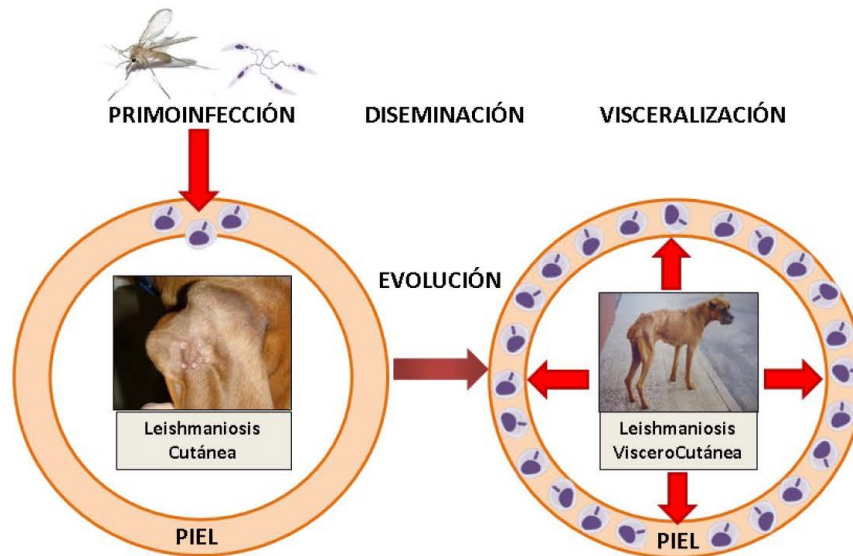
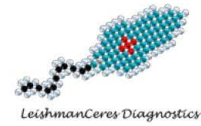


Figura 15: Evolución de la infección por *L. infantum* en el perro



La ineficacia en el control inmunológico determina la diseminación de *L. infantum* por todo el organismo (especie viscerotropa) siendo los órganos linfoides (bazo, médula ósea, ganglios linfáticos, etc.) y la propia piel los más parasitados. La diseminación orgánica y multiplicación de las formas amastigote (**Figura 15**) tiene como consecuencia el aumento de la carga parásita en todos los tejidos, donde la piel desempeña un papel decisivo como órgano reservorio y donante de *Leishmania* para los flebotomos transmisores de estos parásitos.

Existen resultados que reflejan que la carga parasitaria presente en la piel de los perros con leishmaniosis es elevada, siendo las zonas de piel lesionada y la piel de la oreja las más parasitadas, proponiéndose como muestras de elección para el diagnóstico molecular de la LCan.

Las lesiones cutáneas que desarrollan los animales infectados se han asociado con la capacidad de transmitir *L. infantum* a los flebotomos, debido a la presencia de gran cantidad de amastigotes observados mediante microscopía.

En este sentido nuestro laboratorio ha descubierto que el pelo y los queratinocitos epidérmicos son capaces de contener elevadas cantidades de ADNk de *L. infantum* (**Figura 16**) que pueden ser detectadas y cuantificadas por técnicas moleculares, tanto en la especie canina como en reservorios silvestres, y también para la leishmaniosis cutánea por la especie *L. major* en el modelo experimental ratón BALB/c.

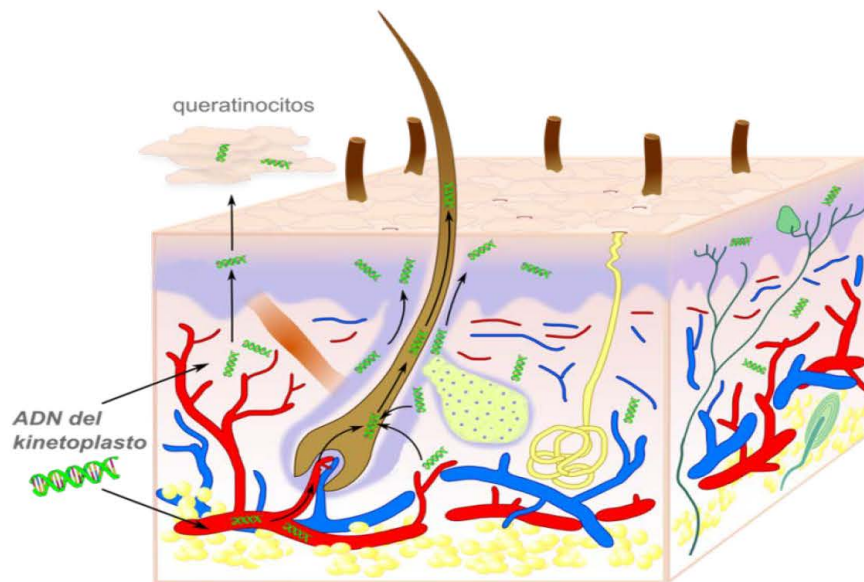
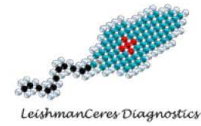


Figura 16: Estructura de la piel y el pelo. Origen de ADN de *Leishmania infantum* en los queratinocitos de perros infectados



3.5. DIAGNÓSTICO DE LA ENFERMEDAD

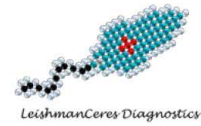
El diagnóstico de la leishmaniosis visceral es complejo y requiere la combinación de varios tipos de análisis laboratoriales específicos: inmunológicos, para detectar niveles de anticuerpos frente a distintos antígenos de *Leishmania*, y los parasitológicos moleculares para determinar la carga parásita mediante qPCR cuantitativa.

La información obtenida de cada uno de estos análisis debe interpretarse de manera conjunta para realizar un correcto diagnóstico de la infección, de la propia enfermedad y para el seguimiento de cada caso en particular.

3.5.1. DIAGNÓSTICO INMUNOLÓGICO

Todos los perros con leishmaniosis, independientemente de la presencia de signos clínicos, van a mostrar una respuesta inmune humoral específica contra el parásito. Los métodos inmunológicos permiten detectar los anticuerpos anti-*Leishmania* circulantes en el suero y otros fluidos si es necesario. Aunque el nivel de anticuerpos producido en la fase inicial o final de la enfermedad o en infecciones asintomáticas es bajo, los animales susceptibles desarrollan un incremento de anticuerpos específicos a lo largo del tiempo, demostrado en estudios de infección tanto de tipo natural como experimental.

En la actualidad, los métodos inmunológicos más utilizados para el diagnóstico de la LCan son el ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), la inmunofluorescencia indirecta (IFI) y los tests inmunocromatográficos. La **técnica ELISA** permite la detección de inmunoglobulinas séricas producidas específicamente frente a distintos antígenos de *Leishmania*. Se ha comprobado que este tipo de análisis muestra una gran sensibilidad tanto en animales sintomáticos como en asintomáticos, aunque la especificidad depende del antígeno utilizado. Mediante el uso del antígeno total soluble (SLA) elaborado a partir de promastigotes de *Leishmania* se obtienen sensibilidades del 80 al 100% y especificidades del 85 al 95%. Otros antígenos, como es el caso de las proteínas internas de *L. infantum*, suponen una excelente herramienta para el diagnóstico inmunológico de la LCan al proporcionar valores elevados de sensibilidad y especificidad. Estos antígenos también son útiles desde el punto de vista pronóstico, ya que permiten detectar incrementos o descensos de los anticuerpos relacionados con la carga parásita. Este hecho posibilita diagnosticar las recidivas de la LCan (fallos terapéuticos o reinfecciones) o, por el contrario, la eficacia de los tratamientos utilizados.



3.5.2. DIAGNÓSTICO MOLECULAR POR qPCR

La técnica de reacción en cadena de la polimerasa o PCR permite la amplificación de una secuencia de ADN problema (ADN diana) utilizando oligonucleótidos específicos o cebadores y la enzima ADN polimerasa.

Numerosos estudios han demostrado que, en comparación con el resto de métodos parasitológicos, la PCR es más sensible y específica para el diagnóstico de la LCan, siendo muy útil para el análisis de muestras con baja carga parasitaria, para confirmar el diagnóstico de los animales que muestren un bajo título de anticuerpos y para detectar ADN del parásito en animales recién infectados, incluso antes de la aparición de los anticuerpos específicos.

Otra ventaja de la técnica PCR es la capacidad de amplificar el ADN diana a partir del material genético extraído de una **gran variedad de muestras**, utilizando pequeñas cantidades de las mismas. Aunque la PCR es **muy sensible y específica**, es necesario valorar la información proporcionada por esta técnica junto con los datos obtenidos de los análisis inmunológicos de los pacientes infectados.

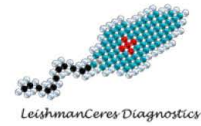
La técnica de PCR a Tiempo Real o PCR cuantitativa (qPCR) se considera actualmente uno de los métodos más fiables para el diagnóstico de la LCan. La posibilidad de cuantificar el ADN mitocondrial del parásito (ADN del kinetoplasto o ADNk) ha permitido que este método sea el elegido para monitorizar la carga parasitaria de los animales tras el tratamiento. Además, la qPCR es altamente sensible cuando existen cargas parasitarias bajas y que otras técnicas no permiten detectar.

Su sensibilidad es muy variable dependiendo del tejido utilizado, por lo que no existe un acuerdo sobre cuál es la muestra de elección para realizar el diagnóstico molecular de la LCan. A pesar de ello, varios autores coinciden en que la muestra ideal debe ser de obtención fácil, rápida y no invasiva, además de proporcionar una alta sensibilidad.

Las **muestras invasivas** más utilizadas para el diagnóstico molecular de la LCan son ganglio linfático, médula ósea, piel y sangre.

Leishmania infantum muestra un tropismo natural hacia los órganos linfoides. Varios estudios han demostrado la validez de estos tejidos como muestra de elección para el diagnóstico molecular de la LCan. Las biopsias de ganglio linfático proporcionan resultados muy sensibles, siendo muy útiles en perros. Sin embargo, si los perros no presentan linfadenomegalia, se recomienda analizar aspirados de médula ósea, los cuales también han demostrado ser una muestra adecuada en cuanto a sensibilidad se refiere. Varios estudios concluyen que las muestras de piel (órgano reservorio de parásitos para los flebotomos) proporcionan resultados muy sensibles y específicos independientemente de la presencia de lesiones. Por último, el empleo de la **sangre**, considerada la muestra menos invasiva dentro de este grupo, ha mostrado resultados contradictorios para el diagnóstico molecular de la LCan: varios estudios la proponen como muestra de elección debido a la facilidad con la que se obtiene;

LeishmanCeres Diagnostics



por el contrario, otros autores han alcanzado la sensibilidad más baja (50-60%) analizando sangre en comparación con otro tipo de muestras. Independientemente de ello, esta muestra permite diferenciar entre perros con ADN circulante y aquellos que no lo muestran.

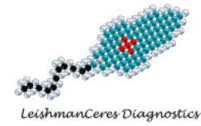
Todas las muestras descritas anteriormente son invasivas, por lo que a veces pueden existir inconvenientes en su colección, tales como dificultad de obtenerlas sin sedación del paciente, necesidad de manejo clínico, requerimiento de equipos ecográficos o cierta reticencia del cliente para realizarlas.

Al contrario que ocurre con las anteriores, la recogida de las **muestras no invasivas** no produce ningún daño al animal, siendo su obtención fácil y rápida.

Además del **pelo** y los queratinocitos, muestras no invasivas como descamaciones, **hisopados de heridas, de mucosas o de cerumen** presentan una sensibilidad por qPCR similar a las muestras obtenidas de forma invasiva (biopsias de médula ósea o de ganglio linfático) y muy superior a la proporcionada por las muestras de sangre. La utilización de hisopos de algodón como soporte para la toma de muestras está cobrando cada vez más importancia para el diagnóstico molecular de la LCan, tal y como hemos publicado en nuestras investigaciones.

En nuestro caso, los últimos estudios realizados en infecciones naturales de perros en diferentes estadios de la infección y enfermedad han demostrado que las muestras de hisopado de heridas en los casos de dermatitis ulcerativa, de conjuntiva en aquellos perros con distintas oculopatías y de cerumen, contienen altas cantidades de ADNk de *L. infantum* que pueden ser detectadas y cuantificadas por qPCR. Igualmente, el pelo de zonas lesionadas (alopécicas, descamadas, exudativas o ulceradas) y las propias descamaciones presentes en la LCan son otras muestras que contienen elevadas cantidades de ADN parasitario muy útiles para el diagnóstico de esta infección zoonótica y para el seguimiento de perros tratados.

LeishmanCeres Diagnostics



4. EJEMPLOS DE DIAGNÓSTICOS CON MultiLeish5D

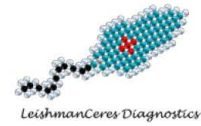
En el presente apartado queremos mostrar ejemplos de diferentes casos clínicos en los que se exponen los resultados obtenidos con el sistema multidiagnóstico de la LCan MultiLeish 5D.

Estos son los frecuentes casos de primoinfecciones con nula o escasa sospecha o LCan latente evolutiva (**Caso clínico 1**), las formas visceralizadas con diversa sintomatología compatible con la enfermedad (**Caso clínico 2**), así como los casos de perros tratados en los que MultiLeish-5D es capaz de detectar de forma totalmente fiable los resultados de la eficacia terapéutica (**Caso clínico 3**), o las recaídas o recidivas (**Caso clínico 4**).



RESULTADOS

LeishmanCeres Diagnostics



CASO CLÍNICO 1: LEISHMANIOSIS LATENTE EVOLUTIVA: CUTÁNEA LOCALIZADA

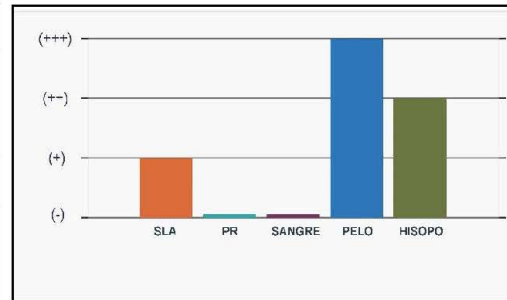
Boxer, macho, 6 meses de edad.

Exploración: signos inespecíficos de vómitos, diarreas e inapetencia y unas nodulaciones de pequeño tamaño no pruriginosas en pabellón auricular desde hace semanas.

Análisis clínicos: leve anemia macrocítica normocrómica (hematíes: $5,79 \times 10^6/\mu\text{l}$). Niveles de proteínas plasmáticas normales (6,4g/dl), bioquímica renal normal.



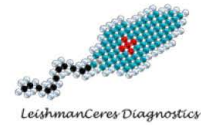
ANÁLISIS	TECNICA	RESULTADO
Inmunológicos (D.O.)	ELISA SLA IgG2	0,497 (+)
	ELISA PR IgG2	0,404 (-)
qPCR (Número de parásitos)	qPCR sangre	0 (-)
	qPCR pelo nódulo oreja	673.862 (+++)
	qPCR hisopo cerumen	521 (++)



Análisis complementarios: qPCR biopsia ganglionar: 88 parásitos (+)
qPCR hisopo conjuntival: 1.306 parásitos (+++)

COMENTARIOS: Caso de primoinfección y diseminación de *L. infantum* en un perro de corta edad. La respuesta inmune frente a antígenos totales es positiva baja y la carga parásita está especialmente localizada a nivel de la piel y mucosas. No existen repercusiones sobre la funcionalidad orgánica.

Conclusión: leishmaniosis latente evolutiva diagnosticada de forma muy precoz con pronóstico favorable.



CASO CLÍNICO 2: LEISHMANIOSIS EVOLUTIVA CRÓNICA: PATENTE O SINTOMÁTICA

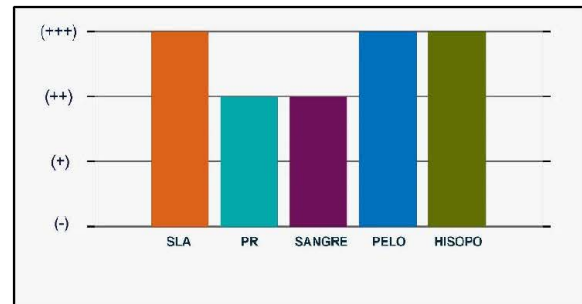
Pitbull, hembra, 2 años.

Exploración: Hace 15 días presenta adelgazamiento progresivo, conjuntivitis, blefaritis y dermatitis generalizada con hiperqueratosis y úlcera en carpo izquierdo, onicogriposis y linfadenitis múltiple, herida interdigital en extremidad delantera derecha. Mucosas pálidas.

Análisis clínicos: anemia (Eritrocitos: $3,41 \times 10^6/\mu\text{l}$, HGB: 7,5g/dl, HCT: 23,7%, hiperproteinemia (10,5g/dl), hipoalbuminemia (2,2g/dl), azoemia (106mg/dl).



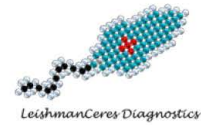
ANÁLISIS	TECNICA	RESULTADO
Inmunológicos	ELISA SLA IgG2	1,063 (+++)
{D.O.}	ELISA PR IgG2	0,833 (++)
qPCR	qPCR sangre	251 (++)
{Número de parásitos}	qPCR pelo úlcera	91.876 (+++)
	qPCR hisopo herida	103.015 (+++)



Análisis complementarios: qPCR biopsia ganglionar: 46.011 parásitos (+++)
 qPCR hisopo conjuntival: 1.182 parásitos (+++)
 qPCR hisopo cerumen: 4.853 parásitos (+++)

COMENTARIOS: Leishmaniosis evolutiva crónica visceralizada con respuesta inmune exacerbada tanto a proteínas totales (SLA) como internas del parásito (PR) y con altas cargas parásitas incluso con presencia de ADN circulante en sangre.

Conclusión: leishmaniosis crónica patente con pronóstico reservado derivado de la elevada respuesta inmune y altas cargas parásitas.



CASO CLÍNICO 3: LEISHMANIOSIS EN PERROS TRATADOS: EFICACIA TERAPEÚTICA

American Staffordshire, hembra, 2,5 años. Tratada con antimoniato de meglumina.

Exploración:

Pretratamiento: 19 kg, apatía, anorexia, conjuntivitis bilateral, alopecia facial con dermatitis descamativa e hiperqueratosis nasal, úlcera en corvejón derecho y linfadenitis generalizada desde hace 2 meses.

3 meses post tto.: Mejoría general de la piel y aumento de peso.

9 meses post tto.: Desaparición de todos los signos clínicos

Análisis clínicos: anemia ($4,30 \times 10^6/\mu\text{l}$), trombocitopenia ($52 \times 10^3/\mu\text{l}$) e hiperproteíнемia ($10,2\text{g/dl}$). 3 meses post tto: Se restablecen los valores hematológicos a excepción de las plaquetas ($109 \times 10^3/\mu\text{l}$). 9 meses post tratamiento: Hematología y bioquímica sérica normales.



ANALISIS	TECNICA	Pretratamiento	Post tratamiento 3 meses	Post tratamiento 9 meses
		RESULTADO	RESULTADO	RESULTADO
Inmunológicos (D.O.)	ELISA SLA IgG2	1,162 (+++)	1,134 (+++)	0,995 (+++)
	ELISA PR IgG2	0,853 (++)	0,483 (-)	0,308 (-)
qPCR (Número de parásitos)	qPCR sangre	228 (++)	0 (-)	0 (-)
	qPCR pelo oreja	44 (+)	3 (+)	0 (-)
	qPCR H. conjunt.	1.493 (+++)	0 (-)	0 (-)

Análisis complementarios qPCR descamaciones: $>10^6$ parásitos (+++) qPCR hisopo herida: 27.245 parásitos (+++) qPCR hisopo cerumen: 511 parásitos (++) y negativo a los 3 y 9 meses post-tto

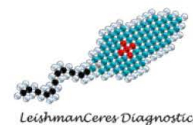


COMENTARIOS: Leishmaniosis evolutiva crónica visceralizada con respuesta inmune exacerbada tanto a proteínas totales (SLA) como recombinantes (PR) y con altas cargas parásitas en todas las muestras.

3 meses post tto: claro descenso de los anticuerpos frente a PR, aclaramiento parasitario en todas las muestras.

9 meses post tto: solo conserva la seropositividad frente a SLA, siendo el resto de los resultados negativos.

Conclusión: se evidencia una eficacia terapéutica, quedando el animal como portador seropositivo y mantenido con alopurinol hasta próxima revisión, con un pronóstico favorable.



CASO CLÍNICO 4: LEISHMANIOSIS EN PERROS TRATADOS: DETECCIÓN DE RECIDIVAS

Cruce dogo alemán, macho, 6 años, diagnosticado hace 3 años y tratado en 4 ocasiones con miltefosina.

Exploración: decaimiento, desmayos, engrosamiento costroso y úlceras en orejas y corvejones con alopecia y linfadenitis. Se recomienda un cambio de tratamiento con antimonio de meglumina+alopurinol.

6 meses post tto: cicatrización de lesiones en orejas y corvejones, no ha sufrido más síncope y su estado anímico ha mejorado.

10 meses post tto: recidiva de la dermatitis ulcerativa en punta de orejas y corvejones, linfadenitis preescapular. Ha adelgazado.

Análisis clínicos: pancitopenia (Eritrocitos: $4,38 \times 10^6/\mu\text{l}$; leucocitos: $4,74 \times 10^3/\mu\text{l}$; plaquetas: $113 \times 10^3/\mu\text{l}$).

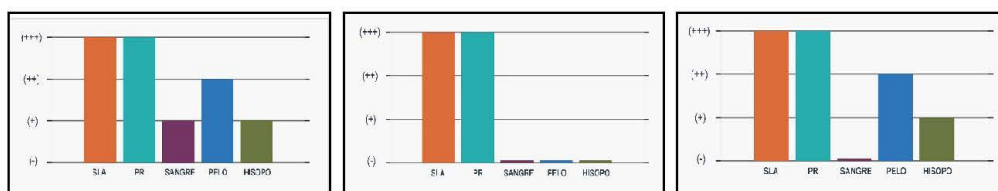
6 meses post tto: anemia ha mejorado ($5,79 \times 10^6/\mu\text{l}$), la leucopenia y trombocitopenia han desaparecido.

10 meses post tto: anemia normocítica normocrómica ($5,34 \times 10^6/\mu\text{l}$).



ANÁLISIS	TECNICA	Pretratamiento	Post tratamiento 6 meses	Post tratamiento 10 meses
Inmunológicos. (D.O.)	ELISA SLA IgG2	0,962 (+++)	0,884 (+++)	0,859 (+++)
	ELISA PR IgG2	1,001 (+++)	0,922 (+++)	1,051 (+++)
qPCR (Número de parásitos)	qPCR sangre	10 (+)	0 (-)	0 (-)
	qPCR Pelo herida	188 (++)	0 (-)	854 (++)
	qPCR H. cerumen	34 (+)	0 (-)	86 (+)

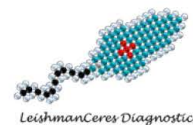
Análisis complementarios: qPCR hisopo conjuntival 1ª consulta: 14 parásitos (+)
qPCR hisopo conjuntival 3ª consulta: 2 parásitos (+)



COMENTARIOS: Leishmaniosis evolutiva crónica visceralizada con respuesta inmune exacerbada tanto a proteínas totales (SLA) como recombinantes (PR) y con altas cargas parásitas en todas las muestras analizadas.

A los 6 meses post tratamiento se detecta un aclaramiento parasitario en todas las muestras. A los 10 meses se detecta un aumento en el número de parásitos, manteniéndose los anticuerpos altos.

Conclusión: caso de leve y transitoria mejoría post tratamiento que recidiva a los pocos meses, y que es detectado por MultiLeish5D.



5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

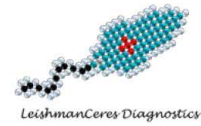
Publicaciones de divulgación

- Belinchón-Lorenzo, S., Iniesta, V., Fernández-Cotrina, J., Muñoz-Madrid, R., Monroy-Pérez, I., Baz-Agudo, V., Gómez-Blázquez, M., Sánchez-Díaz, J., Gómez-Luque, A., Parejo, J.C., Serrano, F., Gómez Nieto, L.C., 2013. **Nuevo método mediante análisis de muestras de pelo por PCR en tiempo real.** Argos 148, 50-54.
- Belinchón-Lorenzo, S., Parejo, J.C., Iniesta, V., Fernández-Cotrina, J., Muñoz-Madrid, R., Monroy-Pérez, I., Baz-Agudo, V., Gómez-Luque, A., Serrano Aguilera, F.J., Barneto, J.L., Sánchez, J., Gómez Nieto, L.C., 2016. **Diagnóstico de la leishmaniosis canina mediante análisis de cerumen por PCR a tiempo real.** Argos 183, 8-12.
- Carcelén, J., Molano, I., Cámara, C., Iniesta, V., Viñuelas, J., Mangas, M., Fernández-Cotrina, J., Gómez Nieto, L.C., 2004. **Correlación entre disproteinemia y respuesta inmune.** Argos 62, 54-58.
- Carcelén, J., Gómez Gordo, L., Iniesta, V., Molano, I., Corraliza, I., Mangas, M., Fernández-Cotrina, J., Monroy, I., Gómez Nieto, L.C., 2004. **Casos sobre la variabilidad clínica y lesional de la leishmaniosis canina.** Centro Veterinario 9, 4-16.
- Gómez Nieto, L.C., 1990. **Epidemiología y clínica de la leishmaniosis canina en Cáceres.** Tesis Doctoral. Facultad de Veterinaria, Universidad de Extremadura.
- Gómez Nieto, L.C., Molano, I., Iniesta, V., Carcelén, J., Corraliza, I., Mirón, C., Viñuelas, J., García-Alonso, M., 2003. **Enfermedad cerebral y leishmaniosis canina.** Argos 48, 26-30.
- Ramírez, L., Iborra, S., De Oliveira, C., Weber, M., Abádanes, D.R., González, V.M., Corvo, L., Gómez Nieto, L.C., Alonso, C., Bonay, P., Barral, A., Barral-Netto, M., Soto, M., 2009. **Las histonas de *Leishmania*.** Gazeta Médica da Bahia 79, 129-133.

Artículos científicos internacionales

- Belinchón-Lorenzo, S., Iniesta, V., Parejo, J.C., Fernández-Cotrina, J., Muñoz-Madrid, R., Soto, M., Alonso, C., Gómez Nieto, L.C., 2013. **Detection of *Leishmania infantum* kinetoplast minicircle DNA by Real Time PCR in hair of dogs with leishmaniosis.** Vet Parasitol 192, 43–50.
- Belinchón-Lorenzo, S., Parejo, J.C., Iniesta, V., Fernández-Cotrina, J., Muñoz-Madrid, R., Monroy, I., Baz, V., Gómez-Luque, A., Serrano-Aguilera, F.J., Barneto, J.L., Gómez-Nieto, L.C., 2016. **First detection of *Leishmania* kDNA in canine cerumen samples by qPCR.** Vet Parasitol 228, 65–68.
- Carcelén, J., Iniesta, V., Fernández-Cotrina, J., Serrano, F., Parejo, J.C., Corraliza, I., Gallardo-Soler, A., Marañón, F., Soto, M., Alonso, C., Gomez-Nieto, C., 2009. **The chimerical multi-component Q protein from *Leishmania* in the absence of adjuvant protects dogs against an experimental *Leishmania infantum* infection.** Vacc 27, 5964-5973.
- Coelho, E.A., Ramírez, L., Costa, M.A., Coelho, V.T., Martins, V.T., Chávez-Fumagalli, M.A., Oliveira, D.M., Tavares, C.A., Bonay, P., Nieto, C.G., Abádanes, D.R., Alonso, C., Soto, M., 2009. **Specific serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis using *Leishmania* species ribosomal protein extracts.** Clin Vaccine Immunol 16, 1774-1780.
- Fernández-Cotrina, J., Iniesta, V., Belinchón-Lorenzo, S., Muñoz-Madrid, R., Serrano, F., Parejo, J.C., Gómez-Gordo, L., Soto, M., Alonso, C., Gómez-Nieto, L.C., 2013. **Experimental model for reproduction of canine visceral leishmaniosis by *Leishmania infantum*.** Vet Parasitol 192, 118-128.
- Fernández-Cotrina, J., 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 leishmaniosis.** Vacc 36, 1972-1982.

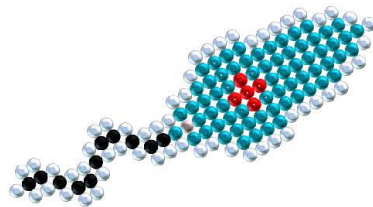
LeishmanCeres Diagnostics



- García-Alonso, M., Blanco, A., Reina, D., Serrano, F.J., Alonso, C., Nieto, C.G., 1996a. **Immunopathology of the uveitis in canine leishmaniasis.** Parasite Immunol 18, 617-623.
- García-Alonso, M., Nieto, C.G., Blanco, A., Requena, J.M., Alonso, C., Navarrete, I., 1996b. **Presence of antibodies in the aqueous humour and cerebrospinal fluid during *Leishmania* infections in dogs. Pathological features at the central nervous system.** Parasite Immunol 18, 539-546.
- Grano, F.G., Melo, G.D., Belinchón-Lorenzo, S., Gómez-Nieto, L.C., Machado, G.F., 2014. **First detection of *Leishmania infantum* DNA within the brain of naturally infected dogs.** Vet Parasitol 204, 376-380.
- Iniesta, V., Belinchón-Lorenzo, S., Soto, M., Fernández-Cotrina, J., Muñoz-Madrid, R., Monroy, I., Baz, V., Gómez-Luque, A., Parejo, J.C., Alonso, C., Gómez Nieto, L.C., 2013. **Detection and chronology of parasitic kinetoplast DNA presence in hair of experimental *Leishmania major* infected BALB/c mice by Real Time PCR.** Acta Trop 128, 468-472.
- Molano, I., Alonso, M.G., Mirón, C., Redondo, E., Requena, J.M., Soto, M., Nieto, C.G., Alonso, C., 2003. **A *Leishmania infantum* multi-component antigenic protein mixed with live BCG confers protection to dogs experimentally infected with *L. infantum*.** Vet Immunol Immunopathol 92, 1-13.
- Muñoz-Madrid, R., Belinchón-Lorenzo, S., Iniesta, V., Fernández-Cotrina, J., Parejo, J.C., Serrano, F., Monroy, I., Baz, V., Gómez-Luque, A., Gómez Nieto, L.C., 2013. **First detection of *Leishmania infantum* kinetoplast DNA in hair of wild mammals: Application of qPCR method to determine potential parasite reservoirs.** Acta Trop 180, 706-709.
- Nieto, C.G., Navarrete, I., Habela, M., Hernández-Rodríguez, S., 1992. **Seroprevalence of canine leishmaniasis around Cáceres, Spain.** Prev Vet Med 13, 173-178.
- Nieto, C.G., García-Alonso, M., Requena, J.M., Mirón, C., Soto, M., Alonso, C., Navarrete, I., 1999. **Analysis of the humoral immune response against total and recombinant antigens of *Leishmania infantum*: correlation with disease progression in canine experimental leishmaniasis.** Vet Immunol Immunopathol 67, 117-130.
- Rioux, J.A., Croset, H., Lanotte, G., 1977. **Ecologie d'un foyer méditerranéen de leishmaniose viscérale. Essai de modélisation.** Ecologie des Leishmanioses, Colloques Internationaux du CNRS, 239: 295-304.
- Soto, M., Requena, J.M., Quijada, L., Ángel, S.O., Gómez, L.C., Guzmán, F., Patarroyo, M.E., Alonso, C., 1995. **During active viscerocutaneous leishmaniasis the anti-P2 humoral response is specifically triggered by the parasite P proteins.** Clin exp Immunol 100, 246-252.
- Soto, M., Requena, J.M., Quijada, L., Pérez, M.J., Nieto, C.G., Guzmán, F., Patarroyo, M.E., 1999. **Antigenicity of the *Leishmania infantum* histones H2B and H4 during canine viscerocutaneous leishmaniasis.** Clin exp Immunol 115.
- World Health Organization, 2018. **Surveillance of leishmaniasis in the WHO European Region, 2016.** Weekly epidemiological record 40, 93, 521-540. <http://www.who.int/wer>

Distribuido por

Vet **ibérica**
soluciones *veterinarias*



LeishmanCeres Diagnostics

Laboratorio

ARGOS

Nº 218 - Mayo 2020

INFORMATIVO VETERINARIO

Síguenos en Facebook y Twitter  

Anestesia y analgesia

Procesionaria en un hurón

 **ASIS FORMACIÓN** Ver página 16
HEMATOLOGÍA E INMUNOLOGÍA CON SALVA CERVANTES

Especial **Iberzoo+Propet**



La intubación endotraqueal en gatos puede ser un procedimiento delicado.

DECHRA ANESTESIA Y ANALGESIA: todo lo que necesita, de la A a la Z

alen coco ekic nattie jack jamie
Burt Dexter george iggy kali roy
Millie violet Kena Yogi Zack
Uma Whiskers

Intubeaze 20 mg/ml solución para pulverización intrabucal para gatos. Cada ml contiene: Lidocaína clorhidrato monohidrato 20 mg (equivalente a lidocaína 16,2 mg). Cada pulverización (0,14 ml) contiene 2,8 mg de lidocaína clorhidrato monohidrato, que corresponde a 2,27 mg de lidocaína. Indicaciones de uso: especificando las especies de destino. Gatos. Anestesia local de la mucosa lingual del gato para facilitar la intubación endotraqueal preservando la estimulación del reflejo laringeo. Contraindicaciones: No usar en animales hipotérmicos o que presenten fibrilación cardíaca. No usar en caso de hiperactividad o a la administración a algún individuo. Advertencias especiales para cada especie de destino. También se puede estimular el reflejo laringeo retirando el tubo endotraqueal. Como se debe recibir el consentimiento del paciente antes de la anestesia. Reacciones adversas: frecuencia y gravedad. Ninguna conocida. Tiempo de espera: no conocido. Titular de la autorización de comercialización: Dechra Regulatory S.L.V. Hinderlingweg 25 5551 Aft-Bachem Palaise-Bayern. Número de la autorización de comercialización: 3700 ESP.



Intubeaze®
Una rápida pulverización, hace más fácil la intubación...

 Dechra

Dechra Veterinary Products SLU - c/ Balmes, 202 6ª planta - 08006 Barcelona info.es@dechra.com - www.dechra.es


Porque cada animal es único

Multileish-5d: un novedoso sistema multidiaagnóstico fiable de la leishmaniosis canina con valor pronóstico

Combina cinco diagnósticos específicos y sensibles en un solo sistema a partir de tres muestras obtenidas fácilmente y de forma no invasiva (sangre, pelo e hisopado dermomucoso), que permiten descartar o confirmar la magnitud de la infección (carga parasitaria) y de las respuestas inmunitarias.

Silvia Belinchón-Lorenzo, Adela Gómez-Luque, Isabel Monroy, Victoria Baz, Virginia Iniesta, Rubén Muñoz-Madrid, José Luis Barneto, Juan Carlos Parejo, Luis Carlos Gómez-Nieto, Javier Fernández-Cotrina.

Laboratorio LeishmanCeres Diagnósticos. Unidad de Parasitología y Enfermedades Parasitarias. Facultad de Veterinaria. Universidad de Extremadura, Cáceres. leishmanceresdiagnosticos@gmail.com Imágenes cedidas por los autores

El Sistema de Diagnóstico Múltiple de la leishmaniosis canina, o Multileish-5D, ha sido desarrollado con el objetivo de dar al veterinario clínico una herramienta fiable en su actividad diaria.

Dada la elevada enzootia de la leishmaniosis canina (LCan) en España y, por consiguiente, la alta casuística en la clínica, Multileish-5D permite el diagnóstico y seguimiento de perros con leishmaniosis como punto de partida para su profilaxis a través de su diagnóstico precoz y de su monitorización tras los tratamientos utilizados, ya que es capaz de determinar en el tiempo tanto la eficacia terapéutica como los casos de recaídas tan frecuentes en esta enfermedad. Además, la especificidad de Multileish-5D permite descartar esta infección de otras habitualmente compatibles o similares a la leishmaniosis canina.

Multileish-5D combina cinco diagnósticos específicos y sensibles en un solo sistema a partir de tres muestras obtenidas fácilmente y de forma no invasiva (sangre, pelo e hisopado dermomucoso), que permiten des-

cartar o, por el contrario, confirmar en los casos positivos, la magnitud de la infección (carga parasitaria) y de las respuestas inmunitarias frente a los distintos antígenos de *Leishmania infantum*. La estabilidad de las muestras, gracias al soporte utilizado, permite controlar la evolución de los pacientes a lo largo de los años al obtener resultados reproducibles y comparables en el tiempo.

A continuación se presentan los resultados de casos clínicos diagnosticados con Multileish-5D, correspondientes a distintos estadios de la enfermedad: 1) fase de incubación o de latencia, 2) casos patentes con signos clínicos compatibles, 3) seguimiento de perros tratados con eficacia terapéutica, 4) detección de posibles recaídas y 5) perros no infectados con signos compatibles de LCan en los que Multileish-5D no obtiene resultados dudosos o falsos positivos.

Introducción

Dentro del género *Leishmania*, *L. infantum* es probablemente la especie más extendida a nivel mundial en los mamíferos vertebrados, y el perro es su reservorio conocido más importante.

El control de esta grave enzootia que afecta a numerosos países, especialmente europeos como España, Portugal, Italia, Francia, etc., tiene como pilares básicos medidas para evitar la transmisión por parte de los flebotomos, la vacunación de los perros para reducir la prevalencia en este reservorio y el uso de sistemas de diagnóstico fiables que permitan la detección de los animales positivos en cualquier periodo de la infección (primoinfectados, latentes y patentes, así como en aquellos perros tratados con leishmanicidas y mantenidos con leishmanioestáticos),

como medida para disminuir la cantidad de reservorios para los flebotomos transmisores.

En la actualidad el diagnóstico de la LCan sigue siendo un tema muy controvertido en el que no existe unanimidad de criterios y de métodos de diagnóstico que permitan una total fiabilidad de resultados, tanto positivos como negativos, y más aún con valor pronóstico.

Las técnicas inmunológicas de detección de anticuerpos por IPI e inmunoenzimática ELISA, y en especial las inmunocromatográficas rápidas son las más utilizadas en las clínicas veterinarias y laboratorios. La sensibilidad y especificidad de estas son muy dispares y, en especial, las de los kits rápidos que, además de ser cualitativos, presentan resultados dudosos y falsos negativos.

como el pelo, hisopados de piel y mucosas lesionadas o de cerumen que han mostrado una alta sensibilidad, comparable a la obtenida con biopsias invasivas (médula ósea, ganglio linfático y piel) y a los inmunológicos de detección de anticuerpos en sangre (Belinchón-Lorenzo y col., 2013 y 2016).

En nuestro laboratorio (LeishmanCeres) hemos desarrollado el sistema multidiaagnóstico Multileish-5D (<https://multileish.es/>), que emplea técnicas inmunológicas (ELISA) y moleculares (qPCR) a partir de muestras de sangre, pelo e hisopados dermomucosos. En este trabajo presentamos 20 casos clínicos que incluyen diferentes formas y cursos de la LCan (cutánea localizada, latente evolutiva o patente sintomática) diagnosticados con Multileish-5D, así como de perros tra-

Es capaz de determinar en el tiempo tanto la eficacia terapéutica como los casos de recaídas tan frecuentes en esta enfermedad. Además, la especificidad de Multileish-5D permite descartar esta infección de otras habitualmente compatibles o similares a la leishmaniosis canina.

Las técnicas diagnósticas directas basadas en la observación microscópica de biopsias ganglionares, de médula ósea o piel teñidas, tienen el inconveniente de su baja sensibilidad, y no se pueden repetir en el tiempo por su carácter cruento o incluso son imposibles de realizar.

Actualmente, la técnica de Real Time PCR (qPCR) resulta de gran utilidad en la LCan ya que permite diagnósticos específicos y sensibles utilizando gran variedad de muestras obtenidas de forma no invasiva. Tal es el caso de muestras dermomucosas

tados para la comprobación de la eficacia terapéutica o, por el contrario, para la detección de posibles recaídas.

Material y métodos

Animales

En el estudio han sido recopilados un total de 20 casos clínicos de perros de distintas razas, sexo y edad que acudieron a clínicas veterinarias de diferentes localidades españolas tal y como muestra la *tabla 1*. Estos han sido distribuidos en cinco grupos en función de los resultados tanto inmunológicos como parasitológicos obtenidos con Multileish-5D.

Muestras

El sistema diagnóstico Multileish-5D utiliza la cepa de *Leishmania infantum*, cuyo código correspondiente a la OMS es M/CAN/ES/96/BGN 150 ZMON-1, aislada en nuestro laboratorio de un perro infectado de forma natural. Con esta cepa elaboramos los reactivos para el inmunodiagnóstico, como son las proteínas totales solubles (SLA) y las proteínas recombinantes (PR), y con ella realizamos también el diagnóstico molecular mediante una recta patrón de *L. infantum* para la cuantificación por qPCR del ADNk de las diferentes muestras obtenidas.

El sistema comprende la combinación de cinco diagnósticos, dos inmunológicos y tres moleculares, aplicados a tres muestras biológicas obtenidas de los perros sospechosos o enfermos (*figura 1*):

- Sangre seca adherida a papel Whatman para la determinación de la existencia y cuantificación en su caso de dos tipos de

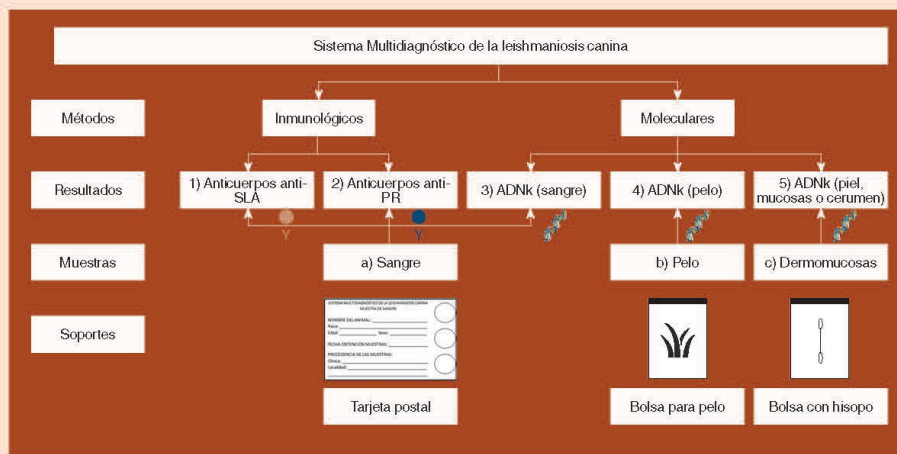


Figura 1. Métodos diagnósticos, muestras y soportes utilizados en el Sistema Multidiaagnóstico de la leishmaniosis canina Multileish-5D.

anticuerpos específicos anti-*Leishmania*, a) frente a antígenos totales y b) recombinantes internos, así como para la detección del ADNk circulante en sangre.

- Pelo, de zonas sanas o lesionadas, ya que contiene cantidades significativas de ADNk que puede ser cuantificado por qPCR.
- Muestras dermomucoas obtenidas con hisopo (piel, mucosa ocular y cerumen), ya que los perros infectados contienen cantidades significativas de ADNk parasitario.

Técnicas de diagnóstico

Multileish-5D conjuga cinco biomarcadores diagnósticos específicos en sus resultados, lo que permite conocer con exactitud los tipos y magnitud de las respuestas inmunitarias, así como la localización y carga parasitaria de los perros infectados.

Los rangos de positividad utilizados en las diferentes técnicas (ELISA y qPCR) aparecen descritos en la *tabla 1* de resultados.

Inmunológicas (ELISA)

La técnica inmunoenzimática ELISA se realiza a partir de la muestra de sangre seca adherida al papel whatman siguiendo el protocolo descrito por Belinchón-Lorenzo y col., (2019). Los resultados se expresan en valores de densidad óptica normalizados respecto a controles de análisis por duplicado para cada una de las muestras.

El sistema multidiagnóstico Multileish-5D (<https://multileish.es/>), emplea técnicas inmunológicas (ELISA) y moleculares (qPCR) a partir de muestras de sangre, pelo e hisopados dermomucoas.

Moleculares (qPCR)

La PCR cuantitativa o qPCR, permite cuantificar de manera absoluta mediante una recta patrón, la cantidad de parásitos del género *Leishmania* presente en discos de sangre seca, pelo e hisopos siguiendo el protocolo descrito por Belinchón-Lorenzo y col., (2016 y 2019).

Resultados

La *tabla 1* recoge los resultados de un total de 20 perros procedentes de clínicas de distintas localidades del territorio nacional, y diagnosticados con Multileish-5D. Las muestras fueron remitidas al laboratorio LeishmanCeres Diagnostics sin condiciones especiales

En función de los resultados inmunológicos (anticuerpos en sangre frente a antígenos totales-SLA y recombinantes-PR) y de qPCR obtenidos de las diferentes muestras (sangre, pelo y dermomucoas), los animales han sido distribuidos en cinco grupos de cuatro perros cada uno, tal y como se muestra en la tabla.

Grupo 1: leishmaniosis latente (evolutiva)

Caracterizados por su escasa o nula expresión clínica debida a una primoinfección reciente y/o a respuestas inmunitarias eficaces de control, estos perros muestran baja positividad de anticuerpos en sangre (anti-SLA) y presencia de ADNk de *L. infantum* en alguna de las muestras analizadas.

Tal es el caso del perro nº 4, con alta carga parasitaria en un nódulo de la oreja (posiblemente el punto de inoculación) o del perro nº 3 que, sin alteración ocular, presentó cantidades significativas de

de mantenimiento y sin historial clínico. Los historiales han sido recopilados con posterioridad a la obtención de los resultados para la realización del presente estudio. Como se puede observar en la *tabla 1*, existieron tanto perros con mayor o menor sospecha clínica de LCan como aparentemente sanos.

Tabla 1. Relación de grupos y animales, clínica de procedencia, resultados obtenidos con Multileish-5D y signos clínicos.

Grupo	Animal	Clínica Procedencia	ELISA SLA	ELISA PR	PCR Sangre	PCR Pelo	PCR Hisopo	Signos clínicos
1 Leishmaniosis latente	1	Hcv Fac. Veterinaria (Cáceres)	0,422 (-)	0,184 (-)	0 (-)	Lesión: 9 (+)	Conjuntiva: 9 (+)	DE
	2	Hcv Fac. Veterinaria (Cáceres)	0,586 (+)	0,374 (-)	0 (-)	Oreja: 0 (-)	Cerumen: 49 (+)	---
	3	Hcv Fac. Veterinaria (Cáceres)	0,455 (+)	0,128 (-)	23 (+)	Oreja: 1 (+)	Conjuntiva: 940 (++)	LI
	4	Hcv Fac. Veterinaria (Cáceres)	0,497 (+)	0,404 (-)	0 (-)	Nódulo: 673862 (+++)	Cerumen: 521 (++)	DE
2 Leishmaniosis patente	5	Motril (Granada)	0,881 (+++)	0,834 (++)	48 (+)	Lesión: 612 (++)	Lesión: 3422608 (+++)	DE, OC, HE
	6	Pelcondado (Huelva)	0,832 (+++)	0,601 (+)	41 (+)	Lesión: 1449 (+++)	Lesión: 110938 (+++)	AN, DE, OC, LI
	7	Chispu (Sevilla)	1,080 (+++)	0,523 (+)	72 (+)	Lesión: 289 (++)	Conjuntiva: 88716 (+++)	DE, OC, AD, NE
	8	Sanacan (Cáceres)	1,049 (+++)	0,938 (+++)	6 (+)	Lesión: 47 (+)	Lesión: 9911355 (+++)	DE, OC, NE, AR
3 Eficacia terapéutica	9 pre-tto	Medea (Badajoz)	0,656 (++)	1,241 (+++)	0 (-)	Lesión: 654 (++)	Cerumen: 0 (-)	DE, AR
	9 post-tto	Medea (Badajoz)	0,338 (-)	0,413 (-)	0 (-)	Oreja: 0 (-)	Cerumen: 0 (-)	---
	10 pre-tto	El Duque (Cádiz)	0,836 (+++)	0,353 (-)	0 (-)	Oreja: 140 (++)	Cerumen: 0 (-)	DE, AD
	10 post-tto	El Duque (Cádiz)	0,663 (++)	0,239 (-)	0 (-)	Oreja: 0 (-)	Cerumen: 0 (-)	---
	11 pre-tto	Seisdedos (Huelva)	0,826 (+++)	1,539 (+++)	0 (-)	Oreja: 12 (+)	Cerumen: 72 (+)	DE
	11 post-tto	Seisdedos (Huelva)	0,655 (++)	1,163 (+++)	0 (-)	Oreja: 0 (-)	Cerumen: 0 (-)	---
	12 pre-tto	El Duque (Cádiz)	1,007 (+++)	0,583 (+)	0 (-)	Lesión: 10977 (+++)	Cerumen: 0 (-)	DE, LI
	12 post-tto	El Duque (Cádiz)	0,797 (++)	0,264 (-)	0 (-)	Oreja: 0 (-)	Cerumen: 0 (-)	---
4 Recidivas	13 post-tto	Cauvet (Cáceres)	0,974 (+++)	0,451 (-)	0 (-)	Oreja: 0 (-)	Cerumen: 7 (+)	DE, EN
	13 recidiva	Cauvet (Cáceres)	1,943 (+++)	1,577 (+++)	0 (-)	Oreja: 0 (-)	Cerumen: 193 (++)	DE
	14 post-tto	Estivet (Sevilla)	0,531 (+)	0,436 (-)	0 (-)	Oreja: 0 (-)	Cerumen: 0 (-)	AR, FI
	14 recidiva	Estivet (Sevilla)	0,613 (++)	0,698 (+)	0 (-)	Oreja: 0 (-)	Cerumen: 42 (+)	NE
	15 post-tto	Isla Chica (Huelva)	1,067 (+++)	0,875 (++)	0 (-)	Oreja: 45 (+)	Cerumen: 0 (-)	OC
	15 recidiva	Isla Chica (Huelva)	1,262 (+++)	0,570 (+)	41 (+)	Oreja: 73 (+)	Lesión: 45776 (+++)	OC, AD, ANR
	16 post-tto	Seisdedos (Huelva)	1,028 (+++)	1,390 (+++)	0 (-)	Oreja: 139 (++)	Lesión: 12 (+)	DE
	16 recidiva	Seisdedos (Huelva)	1,086 (+++)	1,645 (+++)	17 (+)	Oreja: 20 (+)	Lesión: 8343 (+++)	DE
5 Negativos con clínica compatible	17	Los Cruces (Huelva)	0,156 (-)	0,236 (-)	0 (-)	Lesión: 0 (-)	Lesión: 0 (-)	DE
	18	Ayavet (Madrid)	0,245 (-)	0,211 (-)	0 (-)	Lesión: 0 (-)	Conjuntiva: 0 (-)	DE, OC
	19	Deli (Huelva)	0,136 (-)	0,223 (-)	0 (-)	Oreja: 0 (-)	Lesión: 0 (-)	ANR, DE, LI
	20	Hnas. Muñoz Jiménez (Sevilla)	0,128 (-)	0,140 (-)	0 (-)	Lesión: 0 (-)	Lesión: 0 (-)	DE

Rangos ELISA SLA: Negativo (-) <0,438; Positivo bajo (+) 0,438 – 0,600; Positivo moderado (++) 0,601 – 0,800; Positivo alto (+++) >0,800.

Rangos ELISA PR: Negativo (-) <0,508; Positivo bajo (+) 0,509 – 0,700; Positivo moderado (++) 0,701 – 0,900; Positivo alto (+++) >0,900.

Rangos qPCR: Negativo (-) <1 parásito; Positivo bajo (+) 1 – 100 parásitos; Positivo moderado (++) 101 – 1000 parásitos; Positivo alto (+++) >1000 parásitos.

Signos clínicos: DE: dermatitis; LI: linfadenopatía; OC: oculopatía; HE: hepatopatía; ANM: anemia; AD: adelgazamiento; NE: nefropatía; AR: artropatía; EN: enteritis; FI: fiebre; ANR: anorexia.

► ADNk en la muestra de hisopo conjuntival. (tabla 1, grupo 1, caso clínico nº 4).

Grupo 2: leishmaniosis patente

Caracterizadas por la variable y abundante expresión clínica, así como por las frecuentes alteraciones hematológicas y bioquímicas propias de la LCan. Estos casos suelen presentar elevada respuesta polyclonal de anticuerpos frente a antígenos totales (anti-SLA) y antígenos internos (anti-PR) y presencia de elevadas cantidades de parásitos (ADNk-qPCR) en las diferentes muestras analizadas. Tal es el ejemplo del perro polisintomático nº 8 en el que todas las muestras fueron altamente positivas y, en especial, la obtenida del hisopado dérmico de una úlcera (tabla 1, grupo 2, caso clínico nº 8).

Grupo 3: eficacia terapéutica

La eficacia de los tratamientos leishmanicidas (N-metilglucamina, miltefosina) y leishmaniotáticos (alopurinol) utilizados en LCan tiene como consecuencia un descenso de las cargas parasitarias y de su ADNk hasta niveles indetectables en las distintas muestras analizadas por la técnica de qPCR.

Como consecuencia de la eliminación de parásitos, la expresión de antígenos internos tiende a disminuir, igual que la respuesta de anticuerpos se reduce primero frente a antígenos internos recombinantes, que desaparecen al cabo de varias semanas, mientras que los anticuerpos anti-SLA disminuyen más lentamente

durante meses hasta alcanzar niveles basales próximos a la negatividad.

La eficacia de los tratamientos utilizados siempre está asociada a una mejoría clínica de los perros con leishmaniosis. Ejemplo de ello es el perro nº 12, con tendencia a la seronegatividad y ausencia de ADNk parasitario en las muestras analizadas (tabla 1, grupo 3, caso clínico nº 12).

En función de los resultados inmunológicos y de qPCR obtenidos de las diferentes muestras, los animales han sido distribuidos en cinco grupos de cuatro perros cada uno, tal y como se muestra en la tabla:

Grupo 4: fallo terapéutico

Las recidivas en LCan por ineficacia terapéutica tienen como consecuencia la recaída clínica de la enfermedad derivada de multiplicaciones de parásitos que no fueron eliminados y que a su vez inducen un incremento de la respuesta de anticuerpos frente a antígenos de *L. infantum*.

En estos casos Multileish-5D es capaz de detectar la reaparición del ADNk parasitario en las diferentes muestras analizadas, sangre, dermomicosas o pelo, así como el incremento de los niveles de anticuerpos, especialmente los dirigidos frente a antígenos internos de *L. infantum*.

Tal es el caso del perro nº 15, con aparición de ADNk en sangre o aumento de este en las muestras de pelo y de una nueva lesión de la piel (tabla 1, grupo 4, caso clínico nº 15).

Grupo 5: negativos con clínica compatible a LCan

Numerosas enfermedades de diferente origen presentan gran similitud con la LCan y pueden provocar errores diagnósticos si estos no han sido debidamente realizados. Enfermedades de la piel, del sistema inmunitario, renales y un largo etc., de patologías caninas, deben ser

durante el cual los signos clínicos son mínimos o inexistentes aunque la infección de la piel está presente y la diseminación parasitaria se está produciendo.

Este largo periodo de latencia determina, en ausencia de diagnósticos precisos, la viseralización de la leishmaniosis por *L. infantum* y la expresión de muy diferentes signos clínicos con afectación de órganos linforeticulares, riñón, hígado, etc. y de la propia piel, que supone el mayor donante de parásitos para los flebotomos transmisores.

Bajo nuestro punto de vista, los casos de perros positivos sin signos clínicos deben ser correctamente diagnosticados (y tratados si fuera necesario), en lugar de identificarlos como resistentes o que simplemente han tenido contacto con el parásito, ya que estos animales son portadores asintomáticos y, por lo tanto, donantes de parásitos (Saridomichelakis y Koutinas, 2014).

El modelo canino experimental de la leishmaniosis que desarrollamos hace dos décadas (Nieto y col., 1999) y que utilizamos desde entonces para el desarrollo de métodos de diagnóstico y estudio de fármacos (Fernández-Cotrino y col., 2013 y 2018) nos ha permitido determinar diferentes fenotipos evolutivos o patocrónicas de esta infección en función de la aparición y tipos de respuestas inmunitarias que se desarrollan en la LCan, así como de la detección de amastigotes de *L. infantum* o de su ADNk.

De tal forma en LCan, la aparición de los primeros anticuerpos específicos es detectable a partir de los 30 días posinfección

correctamente discriminadas de la LCan mediante precisos análisis diagnósticos que determinen la ausencia de anticuerpos anti-Leishmania y del ADNk en diferentes muestras orgánicas.

En estos casos, Multileish-5D resulta muy fiable ya que es capaz de descartar la existencia de infección por *L. infantum* (ADNk por qPCR) y de respuesta inmunitaria (ELISA SLA y PR) frente a los antígenos parasitarios como es el caso del perro nº 18, con alteraciones de la piel y ojo. (tabla 1, grupo 5, caso clínico nº 18).

Discusión

El diagnóstico de la LCan es uno de los pilares básicos de la profilaxis de esta enfermedad debido a su oculto y largo periodo de incubación (meses o años),

Figura 2. Grupo 1, animal 4: leishmaniosis latente.

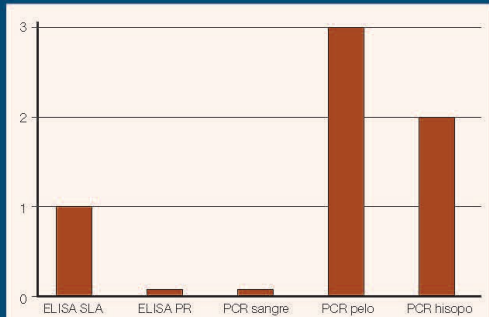


Figura 3. Grupo 2, animal 8: leishmaniosis patente.

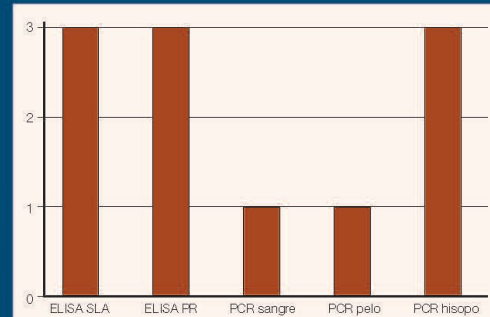


Figura 4. Grupo 3, animal 12: eficacia terapéutica.

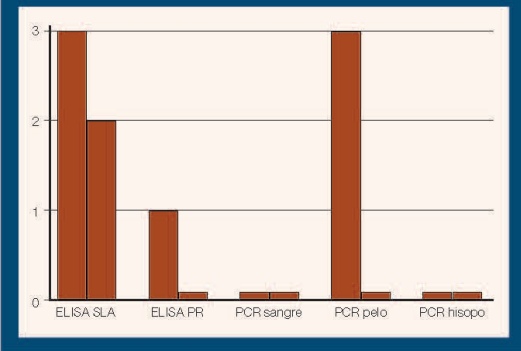
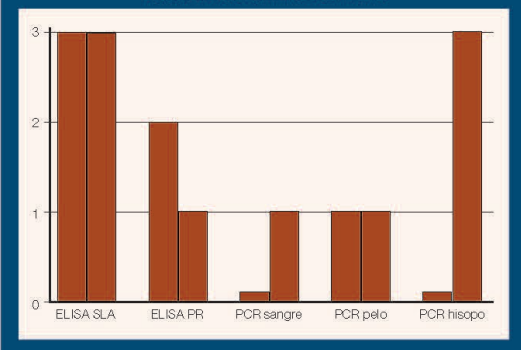


Figura 5. Grupo 4, animal 15: recidiva.



ción, es decir, durante el periodo de incubación o latencia en el que los perros son totalmente asintomáticos y con estado de salud aparentemente normal. Durante este periodo silente, que puede durar más de 6 meses, la infección se está diseminando y visceralizando a la práctica totalidad de los órganos, aparatos y sistemas, dando comienzo la fase de patencia y aparición de muy diferentes expresiones clínico-lesionales propias de esta enfermedad.

según individuos tendrá mayor o menor duración dependiendo del control inmunitario de la infección, pero que puede ser diagnosticada precozmente gracias al uso de este sistema múltiple de detección, tanto de los anticuerpos específicos frente a antígenos de *Leishmania*, como de la carga parasitaria (ADNk) en las diferentes muestras analizadas. En ocasiones es posible detectar perros primoinfectados y en fase de diseminación por la existencia de

una valiosa información diagnóstica y de pronóstico como punto de partida previo a los tratamientos que se utilicen por parte de los veterinarios clínicos.

El análisis de la eficacia terapéutica (Grupo 3) en LCan, es probablemente una de las mayores dificultades en la clínica. El seguimiento de los perros tratados con leishmanicidas y mantenidos en el tiempo con alopurinol u otros fármacos, supone un control preciso tanto de la disminución de la carga parasitaria como de la respuesta inmunitaria mediada por anticuerpos frente a los antígenos de *L. infantum* para la comprobación en el tiempo del éxito terapéutico. Hasta la actualidad, la mejoría clínica y la disminución del título de anticuerpos por IFI han sido los dos criterios más utilizados para este fin, pero resultan insuficientes e imprecisos a la hora de comprobar la eficacia de fármacos. En nuestro caso, Multileish-5D es capaz de detectar de forma precoz el descenso de la carga parasita y la desaparición del ADNk por qPCR en sangre y muestras dermo-mucosas, junto con la seroconversión de los anticuerpos hasta niveles basales (anticuerpos anti-SLA) e incluso negativos, los dirigidos frente a proteínas internas de *L. infantum* (anticuerpos anti-PR).

preúcticos y/o recidivas, ya que determina las nuevas apariciones del ADNk parasitario así como los incrementos de los niveles de anticuerpos frente a los antígenos de *L. infantum* (Grupo 4).

Finalmente, otra de las utilidades de Multileish-5D es su total especificidad de resultados en perros negativos con clínica compatible de LCan (Grupo 5) como dermatopatías, oculopatías, linfadenopatías, etc., por cuanto es capaz de descartar la presencia de parásitos y de anticuerpos frente a *L. infantum*. La precisión de Multileish-5D también posibilita descartar una falsa recidiva en perros tratados de leishmaniosis, porque determina si está existiendo o no un nuevo incremento de la parasitación y de la respuesta inmunitaria mediada por anticuerpos frente a *L. infantum*.

En conclusión, el uso diagnóstico de Multileish-5D está indicado en las siguientes situaciones: antes de la vacunación frente a la leishmaniosis o de administrar fármacos inmunosupresores, en otras enfermedades o con expresiones clínicas compatibles a LCan, en perras gestantes o en periodo de lactación y, finalmente, en el seguimiento de perros tratados frente a esta enfermedad. La fiabilidad diagnóstica otorga a Multileish-5D un importante valor pronóstico en cada caso. □

Multileish-5D resulta una herramienta precoz y muy precisa en la detección de los fallos terapéuticos y/o recidivas, ya que determina las nuevas apariciones del ADNk parasitario así como los incrementos de los niveles de anticuerpos frente a los antígenos de *L. infantum* (Grupo 4).

En este sentido, no podemos olvidar que esta enfermedad crónica (al igual que otras infectocontagiosas), no debe ser pronosticada erróneamente a partir de la existencia o no de signos clínicos, ya que estos en mayor o menor medida irán apareciendo en el tiempo producto de respuestas inmunitarias que además de ineficaces en el control parasitario resultan patológicas (García-Alonso y col., 1996; Fernández-Cotrina y col., 2013).

En nuestro caso, el desarrollo de Multileish-5D, nos ha permitido diagnosticar y evaluar la infección por *L. infantum* desde las primeras semanas determinando tanto la magnitud y tipos de respuestas de anticuerpos, como de la carga parasitaria y localizaciones.

Así, diagnosticamos y definimos en función de la patocronía de forma similar a la descrita por Lanotte y col., (1979), la LCan latente evolutiva en periodo de incubación y sin síntomas muy aparentes (que

una clara positividad a qPCR en el foco primario de la infección o chancro de inoculación, de forma que se detectan cargas parasitarias muy elevadas en pelo, costras o hisopados dermomucosos (Grupo 1).

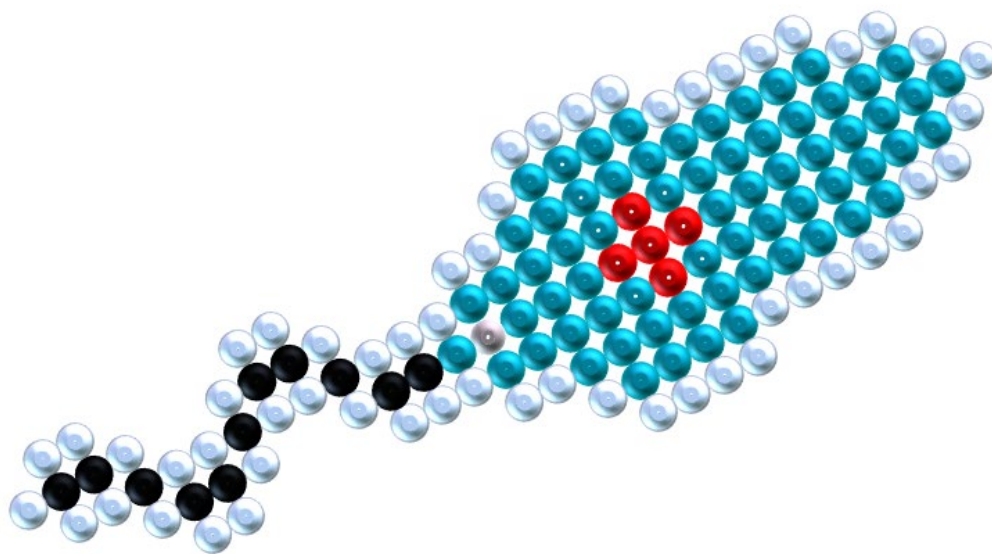
Una vez avanzada la infección en el tiempo, la expresión clínica de la LCan aparece bajo muy diferentes intensidades y formas. Las lesiones cutáneas, hematópoyéticas, renales, hepáticas, articulares y un largo etc., están presentes, determinando finalmente el mal pronóstico de esta enfermedad en un alto porcentaje de los casos. En este grupo de LCan patente, Multileish-5D determina de forma fiable y precisa los tipos y magnitudes de la respuesta de anticuerpos y de la carga parasitaria a partir de las muestras obtenidas de forma no invasiva (Grupo 2). Como se puede observar en la tabla 1, los resultados entre individuos en LCan son muy variables en cuanto a tipos de muestras y magnitudes de positividad, lo cual resulta

Agradecimientos:

A las Clínicas Veterinarias colaboradoras. A Velbérica por la difusión y distribución de Multileish-5D.

Bibliografía:

- Beinchón-Lorenzo, S., Iniesta, V., Parejo, J.C., Fernández-Cotrina, J., Muñoz-Madrid, R., Soto, M., Alonso, C., Gómez-Nieto, L.C., 2013. Detection of *Leishmania infantum* kinetoplast minicircle DNA by Real Time PCR in hair of dogs with leishmaniosis. *Vet Parasitol* 192, 43-50.
- Beinchón-Lorenzo, S., Parejo, J.C., Iniesta, V., Fernández-Cotrina, J., Muñoz-Madrid, R., Morroy, I., Baz, V., Gómez-Luque, A., Serrano-Aguilera, F.J., Barreto, J.L., Gómez-Nieto, L.C., 2016. First detection of *Leishmania* kDNA in canine cerum samples by qPCR. *Vet Parasitol* 228, 65-68.
- Beinchón-Lorenzo, S., Muñoz-Madrid, R., Grano, F.G., Iniesta, V., Fernández-Cotrina, J., Parejo, J.C., Morroy, I., Baz, V., Gómez-Luque, A., Bordini, C.G.G., Machado, G.F., Gómez-Nieto, L.C., 2019. Application of qPCR method to hair and cerum in samples for the diagnosis of canine leishmaniosis in Anápolis, Brazil. *Vet Parasitol Reg Stud Reports* 15, 100267.
- García-Alonso, M., Nieto, C.G., Blanco, A., Requena, J.M., Alonso, C., Navarrete, I., 1996. Presence of antibodies in the aqueous humour and cerebrospinal fluid during *Leishmania* infections in dogs. *Pathological features at the central nervous system. Parasite Immunol* 18, 539-546.
- Fernández-Cotrina, J., Iniesta, V., Beinchón-Lorenzo, S., Muñoz-Madrid, R., Serrano, F., Parejo, J.C., Gómez-Ordo, L., Soto, M., Alonso, C., Gómez-Nieto, L.C., 2013. Experimental model for reproduction of canine visceral leishmaniosis by *Leishmania infantum*. *Vet Parasitol* 192, 118-128.
- Fernández-Cotrina, J., Iniesta, V., Morroy, I., Baz, V., Hugnet, C., Marañón, F., Fabra, M., Gómez-Nieto, L.C., Alonso, C., 2018. A large-scale field randomised trial demonstrates safety and efficacy of the vaccine LeishFen® against canine leishmaniosis. *Vaccine* 36, 1972-1982.
- Iniesta, V., Beinchón-Lorenzo, S., Soto, M., Fernández-Cotrina, J., Muñoz-Madrid, R., Morroy, I., Baz, V., Gómez-Luque, A., Parejo, J.C., Alonso, C., Gómez-Nieto, L.C., 2013. Detection and chronology of parasitic kinetoplast DNA presence in hair of experimental *Leishmania* major infected BALB/c mice by Real Time PCR. *Acta Trop* 128, 468-472.
- Lanotte, C., Rioux, J.A., Perrier, J., Vollhardt, Y., 1979. Ecology of leishmaniosis in the south of France. 10. Developmental stages and clinical characterization of canine leishmaniosis in relation to epidemiology. *Ann Parasitol Hum Comp* 54, 277-285.
- Muñoz-Madrid, R., Beinchón-Lorenzo, S., Iniesta, V., Fernández-Cotrina, J., Parejo, J.C., Serrano, F., Morroy, I., Baz, V., Gómez-Luque, A., Gómez-Nieto, L.C., 2013. First detection of *Leishmania infantum* kinetoplast DNA in hair of wild mammals. Application of qPCR method to determine potential parasite reservoirs. *Acta Trop* 180, 706-709.
- Nieto, C.G., García-Alonso, M., Requena, J.M., Mirón, C., Soto, M., Alonso, C., Navarrete, I., 1999. Analysis of the humoral immune response against total and recombinant antigens of *Leishmania infantum*: correlation with disease progression in canine experimental leishmaniasis. *Vet Immunol Immunopathol* 67, 117-130.
- Sandoz-Mitelakis, M.N., Koutinas, A.F., 2014. Cutaneous involvement in canine leishmaniosis due to *Leishmania infantum* (syn. *L. chagasi*). *Vet Dermatol* 25, 61-62.



DISCUSIÓN

5. DISCUSIÓN

5.1. Cronobiología de la leishmaniosis canina

La cronobiología es una disciplina dentro de la biología que estudia los fenómenos periódicos o ritmos biológicos en los seres vivos, es decir, estudia la organización temporal de los seres vivos, sus modificaciones y los mecanismos implicados en su regulación (250,251).

En el caso del fenómeno del parasitismo, las interacciones entre ambos seres vivos, hospedador y parásito, tienen como consecuencia una serie de acontecimientos para ambos, desde la primoinfección parasitaria hasta su desenlace final, bien con la supervivencia del parásito y finalización de su ciclo de vida en el hospedador o, por el contrario, con el control parasitario mediante muy distintos mecanismos inmunitarios que logran evitar la reproducción parasitaria, el asentamiento definitivo en el hospedador vertebrado y la transmisión a los hospedadores intermediarios, en nuestro caso los flebotomos, vectores de esta zoonosis, a nuevos hospedadores mamíferos (252).

Si analizamos la cronobiología clínica, encargada de estudiar los ritmos biológicos en la salud y en la enfermedad de los seres vivos, observamos que en el fenómeno del parasitismo pueden intervenir multitud de factores en los tiempos y expresiones clínico-lesionales de los hospedadores infectados.

Los ritmos dependen del desarrollo y los rasgos de los parásitos, influyen en la respuesta inmune del hospedador y en la susceptibilidad a la enfermedad. Esto plantea la posibilidad de que el factor tiempo sea importante para la forma en que los hospedadores y los parásitos interactúan y, en consecuencia, para la gravedad y la transmisión de enfermedades (253).

Así, factores dependientes del parásito, del propio hospedador y también medioambientales relacionados en este caso con el vector (254), determinarán en gran medida las consecuencias patológicas y su temporalidad o patocronia.

DISCUSIÓN

En el caso de infecciones por el género *Leishmania*, especies, cepas, dosis infectante, reinfecciones o enfermedades concomitantes son, en gran medida, responsables no sólo de las consecuencias patológicas, sino también de los tiempos en los que se van produciendo alteraciones del estado de salud y apareciendo los signos de la enfermedad (115,139,183).

Respecto al hospedador vertebrado infectado por *Leishmania*, existen tres grandes factores que influyen en la cronobiología de la infección y sus consecuencias patológicas, como son la constitución genética de dicho hospedador, el estado inmunitario del mismo y, relacionado con ambos, el estado de salud y nutricional (255). Así, es bien conocido que una misma especie de *Leishmania* pueda causar cuadros clínicos diferentes tanto en el tiempo como en su expresión, tal y como reflejamos en la Tabla 1 de la presente memoria (página 40).

En el caso de la especie viscerotropa que nos interesa, *L. infantum*, es bien conocido que sus consecuencias pueden ser muy variables entre individuos, tanto desde el punto de vista del curso de la infección como de sus consecuencias clínicas. Así, en numerosas ocasiones son diagnosticadas formas cutáneas (LC) con diferentes expresiones y formas visceralizadas (LV) con distintos cursos o patocronias y expresiones clínicas, así como formas mixtas o leishmaniosis viscerocutáneas (LVC) (78).

Los perros infectados por *L. infantum*, al igual que sucede en medicina humana, dichos factores intrínsecos (dependientes del parásito y especialmente del hospedador) hacen que existan distintos patrones cronobiológicos en esta infección, pudiendo variar desde su control total o parcial en el punto de inoculación de la piel, durante su diseminación por el organismo, o una vez visceralizada en los distintos compartimientos y órganos infectados (159,196,256,257).

Así, tanto en infecciones naturales como experimentales, en ocasiones es posible detectar un “chancro de inoculación” a manera de nódulo dérmico, que también a veces puede ulcerarse y que contiene parásitos. Sin embargo, el chancro, aunque es

DISCUSIÓN

frecuente, es inconstante, transitorio y equívoco (258). Vidor y col. en 1991 (259) observaron que la mayoría de los animales que desarrollan chancro de inoculación terminan por visceralizar la infección (presencia de parásitos en médula ósea y seroconversión). No se sabe demasiado sobre la participación de la piel sobre el sistema inmunitario en las diferentes formas de leishmaniosis, pero se ha descrito que algunos de sus componentes están implicados en el control y la eliminación de las formas infecciosas producidas por promastigotes (260,261), desde la infección primaria hasta el final del proceso. Así, las células de Langerhans captan parásitos en la piel y los transportan al ganglio linfático de drenaje para presentarlos a las células T e iniciar la respuesta inmune específica, y se sabe que los mastocitos también contribuyen al control de las infecciones por *L. major*.

Actualmente, gracias a la existencia de técnicas moleculares de detección y amplificación del ADN parasitario o PCR, pueden detectarse fácilmente las infecciones cutáneas recientes (173,262) que, con el tiempo, días o semanas (98), tenderán a diseminarse por vía hemática y linfática al resto del organismo (258).

A diferencia de lo que ocurre en la leishmaniosis humana, en la LCan existe en mayor o menor grado una afectación visceral, con o sin presencia de lesiones cutáneas (263). Durante este primer periodo de la infección, la respuesta inmune mediada por IgG comienza a inducirse con diferente cronología, siendo los niveles o títulos de anticuerpos bajos o incluso negativos en algunos perros (97,145,264), y también dependiendo de la técnica utilizada, siendo el método ELISA el más sensible con el uso de antígenos totales solubles o SLA (265) a la hora de diagnosticar la infección, por lo que la Organización Mundial de Sanidad Animal recomienda el método ELISA para demostrar la ausencia de infección en una población y para determinar su prevalencia, es decir, para la vigilancia de la distribución del parásito (209).

Una vez asentada y diseminada la infección, las expresiones clínicas irán sucediéndose de muy diferente manera y tiempos en los perros, junto a incrementos de las cargas parasitarias y de los niveles de anticuerpos (97,145,264). Bajo estas condiciones de

DISCUSIÓN

respuestas inmunes, no del todo eficaces frente a *Leishmania*, y debido a las alteraciones en la práctica totalidad de los órganos y tejidos de los animales, especialmente linforreticulares como médula ósea, bazo, ganglios linfáticos, hígado, etc., el curso y pronóstico de la LCan será muy diferente entre los diferentes individuos afectados (97,263,266). Además, otros órganos y tejidos como la propia piel, las barreras de filtración como riñón, ojo y sistema nervioso central (plexo coroides), etc., suelen verse afectados tanto por el proceso inflamatorio celular como por depósitos de inmunocomplejos, muy característicos en esta enfermedad (136,160,171,267)

En infecciones de tipo experimental, el modelo de la LCan ha permitido un mejor conocimiento de la cronología de esta enfermedad, tanto desde el punto de vista clínico como de las respuestas inmunitarias y distribución de la carga parasitaria en el organismo. Así, el modelo propuesto por Nieto y col., en 1999 (145) y repetidamente utilizado en el desarrollo de una vacuna frente a la LCan (97,266,268), ha permitido, en parte, conocer la cronobiología clínica de esta enfermedad en relación con la respuesta inmunitaria frente a la infección por *L. infantum*. Con la utilización de antígenos totales y recombinantes, se determinaron las diferencias existentes en las respuestas de anticuerpos entre perros susceptibles y resistentes en relación con la patocronia de la enfermedad.

Bajo condiciones de seguimiento continuado durante un año de la LCan experimental, estos autores describen formas clínicas latentes de evolución lenta y escasa sintomatología, frente a otras de curso más rápido con una mayor rapidez y expresión de signos clínicos, tal y como fueron definidas desde el inicio para la LCan de tipo natural (159,269).

De igual forma, Carcelén y col., en el año 2009 (268), en una infección experimental con 7 perros utilizados como grupo control en el ensayo de vacunas frente a la LCan, comprueban desde el punto de vista clínico la existencia de infecciones asintomáticas (1 caso), y de perros con mayor (3 sintomáticos) o menor (3 oligosintomáticos) expresión

DISCUSIÓN

clínica tras un año de infección con la cepa de *L. infantum* M/CAN/ES/96/BCN 150, zimodema MON-1, aislada en Extremadura de un perro con leishmaniosis.

Finalmente, Fernández-Cotrina y col. en el año 2013 (97) describen, en un amplio estudio con 25 perros de raza Beagle infectados con esta cepa, un modelo experimental muy similar al acontecido en infecciones naturales en el que se correlaciona la expresión clínica con la respuesta inmunitaria y la propia infección, y en el que concluyen la existencia por un lado de cursos latentes con escasa o nula expresión clínica (8-14.28%) y por otro cursos con formas evolutivas patentes o sintomáticas, también a lo largo de un año de infección experimental. Estos estudios han permitido conocer la cronología de las respuestas inmunitarias y la evolución de la propia infección parasitaria gracias al uso de técnicas diagnósticas específicas para esta enfermedad, discutidas a continuación.

5.2. Diagnóstico inmunológico de la LCan

El diagnóstico indirecto de las leishmaniosis mediante la detección de la respuesta inmunitaria suscitada por la infección de *Leishmania* ha sido quizá la herramienta más importante utilizada en la detección de infecciones producidas por especies viscerotropas como es el caso de *L. infantum*. Además, en la mayoría de los ensayos experimentales de infección por *Leishmania*, la monitorización se realiza por métodos serológicos (97,266,268).

A diferencia de lo que ocurre en las formas cutáneas de esta enfermedad y especialmente las LC, el Kala-azar o LV, en la mayoría de las ocasiones se produce un estímulo antigénico fuerte que desencadena una positiva y progresiva respuesta de anticuerpos, fundamentalmente dependientes de IgG, que es posible detectar con diversas técnicas inmunodiagnósticas tales como IFI, ELISA, etc. (78,102).

En concreto, estos dos métodos citados fueron los primeros en utilizarse en estudios seroepidemiológicos para determinar la prevalencia de la LCan en aquellos países endémicos, tanto del Nuevo como del Viejo Mundo en donde Europa, especialmente los países mediterráneos, soportaban las mayores prevalencias (49,75,159,270).

DISCUSIÓN

Desde el punto de vista clínico, la aplicación de técnicas inmunológicas para el diagnóstico de LCan supuso un gran avance en la detección de casos de esta enfermedad y también en el conocimiento de las respuestas inmunitarias frente a la infección por *L. infantum* (57,73,145,157).

Diversos estudios de LCan natural y experimental han revelado la existencia de respuestas muy diferentes de anticuerpos entre perros infectados, tanto cuantitativamente (títulos de anticuerpos fluorescentes y densidades ópticas por ELISA) como cualitativamente frente a distintos antígenos de este parásito. En estos estudios se detectan perros con altas, moderadas y bajas concentraciones de distintos tipos de anticuerpos de los isotipos IgG, IgE e IgM, siendo las subclases IgG1 e IgG2 las más estudiadas (97,124,144,145,147,271).

Del análisis de los síntomas clínicos y patológicos que acompañan a la enfermedad causada por la LCan, se han evidenciado dos grupos principales de respuestas a la infección en perros infectados tanto natural como experimentalmente (94-96,132,145). Por un lado, un gran número de perros son susceptibles a la infección y desarrollan una forma activa de la enfermedad, mientras que un pequeño porcentaje se comporta como clínicamente resistente, ya que en ellos no se desarrolla la enfermedad o se resuelve espontáneamente (145,159,269,272).

Para desarrollar ensayos específicos para el serodiagnóstico de la LCan en búsqueda de antígenos parasitarios reconocidos por sueros de perros con LVC, en los años noventa, se aislaron y caracterizaron varios antígenos de *L. infantum*, entre los cuales cabe mencionar las proteínas ribosómicas ácidas LiP2a y LiP2b (273), la proteína ribosómica P0 (274), las histonas H2A (275) y H3 (276), las proteínas de choque térmico Hsp70 (277) y Hsp83 (278) y el KMP-11 (279).

La sensibilidad demostrada por los anticuerpos específicos contra esos antígenos recombinantes en LCan puso de manifiesto que estos antígenos representan una valiosa herramienta para el serodiagnóstico de esta enfermedad. Sin embargo, dado que los valores de prevalencia fueron determinados con el uso de sueros de perros con

DISCUSIÓN

enfermedad activa, una pregunta importante fue saber si estos antígenos podían usarse para el serodiagnóstico de infección temprana. Estas incógnitas fueron resueltas en 1999 por Nieto y colaboradores (145) en un estudio experimental, determinando las respuestas de anticuerpos IgG2 e IgG1 frente a antígenos recombinantes, los momentos en los que se inducen las primeras respuestas inmunitarias y su evolución durante un año de infección. Para ello, perros de varias razas fueron infectados de forma experimental con promastigotes de *L. infantum* y se monitoreó el curso de infección durante 343 días, observándose amastigotes en los ganglios linfáticos de todos los perros el día 75 después de la infección. Se observó mediante la técnica ELISA que, en aquellos animales que mostraban una forma regresiva o oligosintomática de la enfermedad, los anticuerpos anti-*Leishmania* IgG1 eran indetectables, mientras que aquellos animales que desarrollaban enfermedades activas mostraban altos niveles de anticuerpos anti-*Leishmania* IgG1. Además, se analizó la producción de anticuerpos contra el antígeno recombinante *L. infantum* HSP70, evidenciando que la reactividad contra la proteína de choque térmico puede utilizarse como marcador diagnóstico en las primeras etapas de la infección, y que la aparición de anticuerpos anti-histona se asocia con la progresión de la infección hacia el estado de la enfermedad (145).

Respecto a la cronología de la inducción de la respuesta inmune desde la primoinfección y su desarrollo en el tiempo, los modelos experimentales caninos y también murinos han conseguido aumentar el conocimiento sobre los orígenes de los estados de susceptibilidad y resistencia frente a *L. infantum* (94,95,97,132,145,224,280).

La mayoría de los estudios describen que, aproximadamente entre los 50-70 días de la primoinfección, los perros producen distintos tipos y cantidades de anticuerpos específicos (95) que pueden ser detectados por IFI y especialmente por ELISA debido a su mayor sensibilidad y que, además, pueden determinar frente a qué proteínas parasitarias se inducen estas respuestas de anticuerpos, específicas de los isotipos y subclases de inmunoglobulinas (48,97,145). Este último trabajo demuestra, en el modelo experimental de la LCan, que el método ELISA presenta una mayor precocidad

DISCUSIÓN

en el tiempo y sensibilidad que la técnica de IFI y que a lo largo de un año de infección existen distintas cinéticas en las respuestas de anticuerpos y concentraciones de éstos en los sueros analizados. Las respuestas hiperreactivas de base humoral dependientes de IgG están asociadas clásicamente a los estados de susceptibilidad en LV, mientras que bajas y balanceadas concentraciones de anticuerpos se asocian a estados de resistencia con menores expresiones clínicas en LCan (97).

La respuesta inmune inducida por la infección de este parásito en la especie canina presenta diferentes formas de expresión. Normalmente, la progresión de la enfermedad o susceptibilidad en el perro se asocia a una inmunidad celular deprimida y una fuerte y exagerada respuesta humoral (96,132-134), presentando altos niveles de Igs y complejos inmunes circulantes (114). Esto se respalda en el hecho de que, tras el tratamiento de perros enfermos, la inducción de una mejoría clínica temporal a menudo se acompaña por una disminución de los niveles de Ac específicos anti-*Leishmania* (159,191,264,281,282).

En la LV, la activación de la respuesta inmune tiene lugar como una estimulación policlonal de células B, que conlleva una elevada producción de Igs tanto específicas como inespecíficas (138,140,141), siendo estas últimas, anticuerpos dirigidos frente a ácidos nucleicos, tubulinas y factores reumatoides (283-285).

Generalmente los niveles de IgGs circulantes se encuentran correlacionados con la intensidad de la infección (132,145), reflejando el grado y la duración de la estimulación antigénica que causa la carga parasitaria. Mediante técnicas serológicas se consiguen detectar elevados títulos de anticuerpos específicos (95,145).

En cuanto a la producción de IgG1 e IgG2 específicas anti *Leishmania* en perros enfermos, tratados y asintomáticos, existen resultados contradictorios. En esta línea fueron Deplazes y col. en 1995 (144) quienes describieron por primera vez estas subclases de inmunoglobulinas en relación con la respuesta dicotómica de los perros a *L. infantum*. Los perros sintomáticos infectados naturalmente con *L. infantum* mostraron aumento de anticuerpos específicos de las subclases IgG1 e IgG2. Sin embargo, en

DISCUSIÓN

perros asintomáticos se produjo un aumento de IgG2. Este hallazgo pone en evidencia algo muy importante para la monitorización y la predicción de la gravedad de la enfermedad y es que la IgG2 está asociada con la resistencia a *L. infantum*, mientras que la IgG1 está asociada con la enfermedad. Esto se afirma gracias a las observaciones de que en los perros que se recuperan de la infección después de la quimioterapia, la IgG1 desaparece completamente del suero mientras que los niveles de IgG2 permanecen elevados, al contrario de los perros que permanecen crónicamente enfermos a pesar de la quimioterapia repetida, que mantienen altas concentraciones séricas de IgG1 específica del parásito.

Bourdoiseau y col. en 1997 (146) evidenció que los dos grupos de perros infectados por *L. infantum*, tanto asintomáticos como con enfermedad clínica patente y sometidos a tratamiento, tenían altos y muy altos los valores de IgG1 e IgG2 específicas de *Leishmania*; en cualquier caso, estos niveles siempre estuvieron por encima de los valores del grupo de perros no infectados. El nivel de IgG2 era casi el doble que el de IgG1, independientemente del grupo. El aumento en la relación IgG1: IgG2 a lo largo del tiempo fue muy leve para los perros asintomáticos, pero extremadamente pronunciado para el grupo con enfermedad clínica. Este aumento relacional se debió por un lado al aumento en el nivel de IgG1, pero más aún por una disminución muy marcada en el nivel de IgG2, y especialmente en los perros sintomáticos tratados. Estos resultados parecen contradecir los de Deplazes y col. en 1995 quienes (144), como se ha descrito anteriormente observaron en perros tratados una disminución de los niveles de IgG1 y un alto nivel de IgG2. Cabe señalar, sin embargo, que las observaciones de Deplazes et al. en 1995 se llevaron a cabo durante 2400 días, mientras que el estudio de Bourdoiseau y col. 1997 duró solo 90 días (146).

Para Nieto y col. en 1999 (145), el análisis de las subclases de IgGs en perros infectados experimentalmente muestra evidencias de una correlación directa entre la inducción de altos niveles IgG1 y la progresión de la enfermedad. Estos autores observaron que, en aquellos animales que mostraban una forma regresiva u oligosintomática de la

DISCUSIÓN

enfermedad, los niveles de IgG1 eran basales o indetectables, mientras que aquellos animales que desarrollaban una enfermedad activa mostraban altos niveles de ambas subclases de anticuerpos (IgG1 e IgG2).

Las subclases de IgGs representan marcadores de respuesta inmune Th1/Th2. Altos niveles de IgG1 en perros que desarrollan leishmaniosis indican la producción de significativos niveles de citocinas dependientes de Th2 (principalmente IL-4), que parecen inhibir el desarrollo de células protectoras de tipo Th1 (139). En la actualidad está muy aceptada la hipótesis de que la inmunidad primaria efectiva contra la infección, es decir, la resistencia al desarrollo de la enfermedad resulta del desarrollo de una respuesta de tipo Th1 frente al parásito impulsada por IL-12, lo que conduce a un aumento de la producción de IL-2 e IFN- γ (139,286-288). Otros autores, sin embargo, evidencian que el equilibrio entre Th1/Th2 tiene un papel regulador fundamental en el resultado de la infección por *Leishmania* en perros y humanos (234,268,289).

Estudios de infección experimental con *L. major* en ratones evidencian la predisposición genética a la susceptibilidad de la infección mediada por una respuesta Th2 de los ratones BALB/c que cursa con lesiones graves, ulceración, necrosis e inflamación y conduce al desarrollo de una enfermedad sistémica (280) con diseminación visceral hacia los ganglios linfáticos, hígado y bazo (290), frente a la resistencia que muestran los ratones C57BL/6, cuya respuesta inmune dominante es de tipo Th1 y consigue controlar la infección (280).

Diferentes autores han evidenciado también la existencia de respuesta inmune mediada por anticuerpos frente a antígenos internos de *Leishmania* y que pueden participar en el control de la enfermedad. Mediante varios estudios se ha demostrado que en el suero de perros infectados naturalmente con *L. infantum* hay anticuerpos que reaccionan específicamente contra diferentes proteínas internas del parásito, como las ribosómicas LiP2a, LiP2b, y LiP0 LiP0 y la histona H2A (100,268,274,275), que forman la Proteína Quimera o "PQ" (198). Posteriores trabajos en los modelos murino y canino mostraron que la proteína Q tenía un alto potencial inmunogénico intrínseco y que era capaz de

DISCUSIÓN

inducir una respuesta IgG duradera, por lo que se interpreta que la respuesta inmune humoral dirigida frente a proteínas internas de *L. infantum* puede estar fuertemente implicada en el control de la infección (145,266,268,291,292).

5.3. Diagnóstico parasitológico y molecular de la LCan

Las técnicas de diagnóstico directo microscópico permitieron hace más de un siglo el hallazgo e identificación de diferentes especies del género *Leishmania*.

Infecciones por *L. donovani* en la India (34), *L. infantum* en Europa (293) de tipo sistémico o de especies dermatropas del Viejo y Nuevo Mundo, *L. tropica* (294) o *L. brasiliensis* (295) respectivamente, han sido y actualmente también son, diagnosticadas a través de biopsias de muestras teñidas para la observación microscópica de formas amastigote de *Leishmania* procedentes de pacientes sospechosos.

Para las leishmaniosis cutáneas y mucocutáneas, así como para aquellas con expresiones cutáneas producidas por especies viscerotropas, *L. donovani*-LDPKA, *L. infantum*-LC, el diagnóstico microscópico y, en la actualidad, sobre todo molecular (PCR), requiere la obtención de muestras de piel obtenidas por diferentes técnicas (punción, raspado, quirúrgica) para su detección. Hasta hace pocos años, estas muestras eran exclusivamente destinadas a su tinción para el diagnóstico microscópico o bien, por su mayor sensibilidad, para su cultivo en medios específicos en determinados laboratorios.

En el caso de especies viscerotropas como *L. infantum* y *L. donovani*, el diagnóstico asertivo directo pasaba por la obtención de muestras a partir de biopsias cruentas de órganos linforreticulares como médula ósea, ganglios linfáticos, bazo, etc., y de la propia piel, para la detección de amastigotes por microscopía. En la actualidad, estas muestras también se utilizan para la detección de su ADN mediante PCR, método propuesto por Mathis y Deplazes en 1995 (296).

La gran ventaja de la microscopía aplicada al diagnóstico de las leishmaniosis es la especificidad, ya que la observación de formas amastigotes en el interior de macrófagos o extracelulares es signo inequívoco de una infección establecida. Debido a ello, en la

DISCUSIÓN

mayoría de las ocasiones, el desarrollo de alternativas diagnósticas ha sido posible gracias a la obtención de muestras de pacientes con diagnósticos directos positivos. Por el contrario, el desarrollo de nuevos métodos diagnósticos, indirectos o inmunológicos y directos de tipo genómico o molecular, ha demostrado a lo largo de pocos años que la microscopía tiene el inconveniente de su falta de sensibilidad y la emisión de resultados falsos negativos (148).

Hasta que se desarrollaron los primeros estudios que demostraron la detección de ADN de *Leishmania spp.* mediante técnicas de amplificación de una secuencia de su genoma por PCR, han sido muchos los cambios y mejoras en la sensibilidad de este tipo de diagnóstico directo, ya que, además de su total especificidad, permite determinar la carga parasitaria existente en una muestra por la técnica de qPCR (215,218,221,297,298).

El uso de qPCR en LV, LC y LMC ha supuesto, en definitiva, un gran avance en el diagnóstico de estas enfermedades desatendidas y de los animales, al permitir con diferentes muestras detectar las infecciones por *Leishmania spp.* con total especificidad y con altas sensibilidades que dependen de las muestras analizadas (208,223,234,262,299-301).

En formas de expresión cutáneas o mucocutáneas de las leishmaniosis, incluida la LCan, la piel resulta la muestra más sensible en el diagnóstico. Tanto en humana como en reservorios animales, la sensibilidad de la qPCR es muy elevada (27,173,231,232,262), permitiendo diagnósticos fiables y precoces en sus diferentes formas de expresión.

También en LCan, la utilización de hisopados dermomucosos permite diagnósticos con elevada sensibilidad, los cuales, además, son del todo incruentos, de fácil obtención y estables en el tiempo para su posterior análisis mediante qPCR (222,226,234,300).

En nuestro caso, y ya comentado en la presente memoria, las muestras de hisopado de lesiones cutáneas, de cerumen y de mucosas utilizadas en el desarrollo de MultiLeish 5D nos permiten diagnósticos totalmente fiables y del todo necesarios en el seguimiento

DISCUSIÓN

de perros tratados (301,302). Igualmente, las muestras de pelo usado en nuestro laboratorio desde 2013, han permitido diagnósticos específicos y altamente sensibles de la LCan (223,234).

En LV por *L. infantum*, tanto humana como canina, las biopsias cruentas de médula ósea y ganglio linfático principalmente, ha sido y siguen siendo las más utilizadas en diagnóstico por su mayor sensibilidad (208,234), siendo su principal inconveniente la necesidad de utilizarlas en repetidas ocasiones cuando se pretende determinar los resultados de la eficacia de las diferentes terapias utilizadas.

Respecto a la sangre como muestra para el diagnóstico de la LV, es la de menor sensibilidad, ya que solo es capaz de detectar, según un estudio reciente, un 10% de positivos frente al 57.1% de aspirados de médula ósea, 58.8% en aspirados de ganglios linfáticos y un 46.9% en hisopos conjuntivales (303).

A lo largo de los años, en nuestro laboratorio hemos determinado que la sangre de perros positivos contiene ADNk detectable en un 61,5% según el primer estudio realizado por Belinchón y col. (223), en un 57.6% en otra población canina utilizando también muestras de sangre fresca (234), y que nosotros hemos estimado en un 68,75% con la utilización de muestras de sangre seca adherida a papel Whatman (301) en perros con leishmaniosis patente.

A pesar de esto, creemos que resulta muy importante su uso ya que permite discriminar, entre poblaciones infectadas, aquellas con diseminación hematogena sistémica de aquellas negativas sin ADNk de *Leishmania* en sangre. Además, su uso en perros tratados posibilita su seguimiento (en los casos positivos) para la comprobación de la eficacia terapéutica y de las posibles recidivas, tal y como presentamos en dossier de MultiLeish 5D y del estudio publicado en la revista Argos.

Como comentaremos a continuación, el desarrollo y uso de análisis diagnósticos múltiples de tipo inmunológico y genético con diferentes muestras permite los diagnósticos más fiables y precisos de la LCan con un claro valor pronóstico.

DISCUSIÓN

5.3.1. Uso de muestras invasivas y no invasivas en LCan

La selección de las muestras para el diagnóstico de LCan por qPCR es un asunto muy importante para considerar en la práctica clínica. Las biopsias de ganglios linfáticos nos han proporcionado resultados del 100% de sensibilidad y especificidad, pero el muestreo puede ser difícil en perros sin linfadenomegalia (216,221). Los aspirados de médula ósea parecen una alternativa adecuada (cercano al 100% de sensibilidad y especificidad), pero la colección es invasiva y traumática para los animales (226). El análisis de PCR de biopsias de piel también proporciona una alta sensibilidad en el diagnóstico clínico de LCan, incluso en comparación con la médula ósea (221), debido a que la principal reserva del parásito en los perros es la piel (304).

Por otro lado, muchos autores sugieren que la sangre es la muestra elegida porque el método de recolección es simple y ligeramente invasivo, pero la sensibilidad obtenida es mucho menor en comparación con los otros tejidos anteriormente citados (221). Sin embargo, hoy en día la búsqueda de métodos no invasivos para el diagnóstico molecular de la LCan visceral, fiables y que faciliten el diagnóstico y seguimiento de animales tratados, es cada vez más importante. Las diferentes investigaciones que se discuten en este apartado evidencian la presencia de ADNk en el pelo y el cerumen de animales infectados con *Leishmania*, contrastando estos resultados o teniendo como referencia los métodos diagnósticos utilizados en la presente tesis doctoral.

Se sabe que la piel es el órgano más grande del cuerpo y que, junto con el pelo, se comporta como una barrera protectora contra agentes físicos, químicos y microbiológicos, siendo capaz de reflejar procesos patológicos que ocurren en otros órganos o tejidos del organismo (305,306). Numerosos estudios han evidenciado que el pelo puede acumular tóxicos ambientales y excretar sustancias exógenas, como trazas de metales en animales (307,308) y en humanos (309-311), y utilizan este tipo de muestra como indicador para la monitorización de la exposición ambiental. También se han detectado en el pelo drogas (312-314) y medicamentos (315,316), con importantes aplicaciones en la práctica clínica humana y animal. Los hallazgos experimentales

DISCUSIÓN

sugieren que estas sustancias pueden ingresar al pelo desde múltiples sitios, a través de múltiples mecanismos y en varios momentos durante el ciclo de crecimiento del pelo, es decir, durante la formación del tallo del pelo (a través de la difusión sanguínea al folículo piloso en crecimiento activo), después de la formación (a través de las secreciones de las glándulas apocrinas y sebáceas) y después de que el pelo ha surgido de la piel (317).

Respecto a *Leishmania*, se ha informado de la eliminación transepitelial de amastigotes a través de los poros entre las células de la epidermis, los folículos pilosos y las glándulas sudoríparas (318,319).

En base a la combinación de todos estos hallazgos, el grupo LeishmanCeres se propuso investigar, a partir del año 2010, sobre la presencia de ADNk de *Leishmania* en el pelo de animales infectados. Mediante la realización de diferentes trabajos, en los que hemos también participado, se ha conseguido detectar por primera vez, utilizando el método qPCR, ADNk de la especie *L. infantum* en el pelo y queratinocitos de perros con leishmaniosis confirmada (223) y en el pelo de diferentes especies de animales silvestres (27,225), siempre teniendo como referencia la presencia de anticuerpos contra los antígenos de *Leishmania* detectados mediante las técnicas inmunológicas ELISA e IFI, estandarizadas en el laboratorio y validadas como se muestra en la presente tesis doctoral.

En 2013, Belinchón y col. (223) demostraron por primera vez, mediante el método qPCR, la presencia de ADNk de *L. infantum* en el pelo de perros naturalmente infectados por *Leishmania*. Para llevar a cabo el estudio, se utilizó una población de 28 perros que vivían en Extremadura, zona endémica de *L. infantum*, 13 de ellos infectados de forma natural y 15 sanos, utilizando los métodos de referencia inmunológicos (ELISA e IFI) para confirmar los resultados. Mediante qPCR se analizaron muestras de sangre, ganglio linfático y pelo de la oreja. Los resultados confirmaron la presencia de ADNk de *L. infantum* en el pelo de 9 de los 13 perros positivos confirmados (69,2 % de sensibilidad), frente a los (8 de los 13 positivos confirmados en muestras de sangre

DISCUSIÓN

(61,5% de sensibilidad). Estos resultados de sensibilidad están en consonancia con los presentados en el trabajo de la presente tesis doctoral (301), en la que obtenemos una sensibilidad del 62,50% para el pelo de zonas sanas y del 78,57% para el pelo de zonas que rodeaban a las lesiones, datos similares a los obtenidos (80%) en el estudio realizado en Brasil y que incluimos en la presente tesis doctoral.

Al analizar el pelo de diferentes zonas corporales, así como de diferentes partes del propio pelo y queratinocitos epidérmicos, se confirmó la presencia de ADNk en el pelo de todas las zonas corporales (223), resultados que quedan apoyados con el trabajo presentado en la Tesis en el que detectamos ADNk en el pelo de diferentes áreas del cuerpo sanas (dorsal cervical, lateral abdominal y cabeza) (301) y en los queratinocitos epidérmicos, en los que se detectó una alta concentración de ADNk y de anticuerpos contra *L. infantum* por ELISA (223). La gran cantidad de ADNk presente en los queratinocitos epidérmicos de las lesiones puede explicar la mayor sensibilidad obtenida del pelo procedente zonas lesionadas con descamación o úlceras (78,57%) frente a zonas sanas (62,50%) (301).

Continuando con la línea de investigación, esta vez enfocada a la detección de ADNk del parásito en el pelo de animales silvestres de distintas especies y a comprobar la estabilidad del ADNk en pelo tras ser sometido a condiciones medioambientales extremas, Muñoz-Madrid y col. en el año 2013 (27) confirmaron la presencia de ADNk de *Leishmania* en 14 de las 68 muestras de pelo de orejas/patas analizadas por qPCR, pertenecientes a 5 especies silvestres diferentes (*Vulpes vulpes*, *Canis lupus*, *Martes foina*, *Rattus norvegicus* y *Erinaceus europaeus*) de varias áreas geográficas del oeste y el norte de España. La mayor cantidad de ADNk se observó en zorros y fue la primera vez que se informó de la presencia de *Leishmania* en el erizo (*Erinaceus europaeus*). Los resultados de estabilidad mostraron una alta tasa de conservación de ADNk de *Leishmania* en el pelo mantenido a -80 °C durante 10 meses, sometido a 56°C durante 4 meses y expuesto a rayos ultravioletas durante 72 horas o al tratamiento con sales de alumbre (utilizada para el curtido de pieles). Por todas estas ventajas en los procesos

DISCUSIÓN

de recolección, transporte y almacenamiento, el método 31 se propone como una alternativa para la búsqueda de reservorios salvajes de *Leishmania*, favoreciendo la vigilancia con análisis epidemiológicos y de prevalencia, que es un componente importante en las estrategias de control de la leishmaniosis según las recomendaciones de la Organización Mundial de la Salud (18).

El mismo grupo de investigación, para profundizar en el estudio del pelo como muestra no invasiva y comprobar si también se producía el mecanismo de excreción de ADN exógeno a través del pelo observado en los trabajos anteriores, llevó a cabo un estudio con 4 ratones BALB/c a los que se les inoculó en ambas orejas 1000 promastigotes metacíclicos de *L. major*, especie con tropismo cutáneo. Utilizaron también el método qPCR para analizar las muestras de pelo de las orejas, así de otras áreas del cuerpo separadas al sitio de inoculación, como fue la pata izquierda trasera de cada animal, monitorizando el proceso durante cinco semanas (35 días) y detectándose ADNk de *L. major* en el pelo de todos los ratones infectados. La incorporación de ADNk en el pelo fue progresiva, estando presente en el pelo de la oreja desde la primera semana post-infección (1 animal positivo), aumentando la cantidad estimada de parásitos a lo largo del estudio. A partir de la tercera semana post-infección el ADNk parasitario también se hizo evidente en el pelo de la pata en tres animales, siendo todos positivos al finalizar el estudio, lo que indica que se produce una diseminación hematogena de ADNk en zonas alejadas del sitio de inoculación. Sin embargo, la cantidad de ADNk en el pelo del sitio de inoculación fue 20 veces mayor que en zonas del organismo alejadas. Este hecho puede ser comprendido si se tienen en cuenta los dos mecanismos conocidos hasta la fecha por los que se incorpora ADNk exógeno en el pelo. El primero propone una incorporación directa del ADN del parásito entre los queratinocitos de la piel y el cabello en el sitio de la inoculación, lo que explicaría la mayor cantidad de ADNk asociada a una mayor eliminación transepidérmica (320), y el segundo propone que el ADNk se incorpora al pelo por la migración del torrente sanguíneo, lo que explicaría la presencia de ADNk en el pelo de zonas alejadas al sitio de inoculación (224).

DISCUSIÓN

La evidencia actual que propone nuestro Laboratorio sugiere que el pelo es un tejido especializado en el secuestro, acúmulo y eliminación de ADN exógeno parasitario y que además interviene en la detoxificación del organismo. El uso del pelo para análisis por PCR tiene muchas ventajas sobre otras muestras. Debe tenerse en cuenta que, si bien el muestreo frecuente de sangre durante la infección podría interferir en los resultados de los ensayos experimentales, la recolección de muestras de pelo no es invasiva, sencilla de almacenar y además la extracción del ADN es bastante fácil (321), la sensibilidad de la técnica es similar a la obtenida en muestras de sangre (223,224,322), es una alternativa para la búsqueda de reservorios salvajes (27) y cumple con los principios de bienestar animal.

Al igual que hemos comentado para el pelo, se han detectado pesticidas, metales e incluso el ADN del virus de la hepatitis B (323) en el cerumen humano (324). Estos estudios, con relación a *Leishmania*, también sugieren diferentes mecanismos de incorporación del ADNk de *Leishmania* a esta muestra. El primero se basa en la eliminación transepidérmica (234) de las formas amastigote de *Leishmania*, los cuales se encuentran presentes en todas las capas epidérmicas, folículos pilosos y glándulas sudoríparas ecrinas (319,320,325) y a que el cerumen se compone de células epiteliales producto de la descamación junto con las secreciones de estas glándulas ceruminosas y sebáceas (326). El segundo, otro método de incorporación del ADNk parasitario al cerumen que debe tenerse en cuenta es mediante la migración a través del torrente sanguíneo, porque el oído y el canal auditivo están irrigados por un gran número de arterias (327).

Considerando estos mecanismos de incorporación del ADNk de *Leishmania*, tras la descripción de la presencia de ADNk en el pelo de animales infectados y tras la publicación de evidencias recientes que sugieren el uso potencial de hisopos conjuntivales, orales, nasales, de oído y vulva para tomar muestras de células mucosas (222,226,328), Belinchón y col., en el año 2016 (234), plantearon por primera vez la hipótesis de que el ADNk de *Leishmania* también podía estar presente en el cerumen

DISCUSIÓN

de los perros infectados, debido a la alta carga de parásitos detectada en la piel de la oreja, y si éste podría ser detectado por qPCR. Para ello, analizaron mediante qPCR muestras de sangre, ganglio linfático, médula ósea y cerumen pertenecientes 38 perros (33 enfermos y 5 sanos), procedentes de zonas endémicas y confirmados mediante las técnicas inmunológicas ELISA e IFI validadas en la presente tesis doctoral. El cerumen, mostró una sensibilidad del 90,9% (30 de los 33 perros infectados), mayor a la obtenida analizando las muestras de médula ósea (88.5%, 23/26) y sangre (57.6%, 19/33), obteniendo la sensibilidad más alta en el análisis qPCR de ganglio linfático (100%, 32/32). Estos resultados de sensibilidad para muestras de cerumen apoyan el artículo de la presente tesis doctoral, cuyos valores son del 87,50%, también mayor que la de la sangre (68,75%) (301). Además, la cantidad de ADNk detectada en el cerumen, mostró una mejor correlación con la carga del parásito presente en la médula ósea y ganglios linfáticos, es decir, las concentraciones más altas de ADNk observadas en la médula ósea y/o ganglio linfático se correspondieron con las cantidades más altas detectadas en cerumen (234). Con estos resultados, se ha evidenciado por primera vez un nuevo método no invasivo y altamente sensible para el aislamiento, detección y cuantificación de ADNk de *Leishmania* mediante qPCR utilizando muestras de cerumen obtenidas con hisopos de algodón de perros con leishmaniosis.

El uso de método q PCR en muestras de médula ósea y ganglio linfático, reportados en la presente tesis doctoral, pone en evidencia la capacidad de realizar mediciones muy sensibles, precisas y reproducibles de ADN del parásito. Esto respalda la utilización de las muestras de pelo e hisopado dermatomucoso en estos estudios clínicos y epidemiológicos para el diagnóstico de la LCan.

5.4. Desarrollo de sistemas múltiples de diagnóstico de la LCan

El diagnóstico de LCan se basa actualmente en la combinación e integración de resultados inmunológicos por IFI o ELISA, y parasitológicos directos a través de la microscopía (cada vez más en desuso), junto con técnicas moleculares como PCR

DISCUSIÓN

convencional y en tiempo real (149,215,298,329), así como de análisis clínicos patológicos relacionados con el estado de salud.

Utilizar estas técnicas de forma aislada puede arrojar resultados poco fiables debido a que los métodos parasitológicos directos pueden mostrar resultados falsos negativos, ya sea por un bajo número de parásitos en las muestras de médula ósea y ganglio linfático o porque la identificación morfológica es difícil, además de ser métodos invasivos a la hora de la obtención de las muestras. Las técnicas serológicas convencionales están limitadas por la reactividad cruzada con otras enfermedades parasitarias, por la utilización de métodos no estandarizados (158) y por la baja sensibilidad y especificidad en infecciones tempranas o asintomáticas (330).

El diagnóstico precoz es uno de los pilares básicos de la profilaxis de esta enfermedad (15), debido a su oculto y largo periodo de incubación que puede ser de meses o años (331), durante el cual los signos clínicos son mínimos o inexistentes, aunque la infección de la piel esté presente y la diseminación parasitaria se esté produciendo (97,145,159,331). Igualmente, en la actualidad resulta muy importante el seguimiento diagnóstico de perros tratados (215), ya que los fármacos no son del todo eficaces y pueden quedar como reservorios para los flebotomos (152,169).

Bajo nuestro punto de vista, los casos de perros positivos sin signos clínicos deben ser correctamente diagnosticados (y tratados si fuera necesario), en lugar de identificarlos como resistentes o que simplemente han tenido contacto con el parásito, ya que estos animales son portadores asintomáticos y, por lo tanto, donantes de parásitos para los vectores.

El modelo canino experimental de la leishmaniosis que Nieto y col. desarrollaron en 1999 (145), y que el Grupo LeishmanCeres utiliza desde entonces para el desarrollo de métodos de diagnóstico y estudio de fármacos (97,100), nos ha permitido determinar diferentes fenotipos evolutivos o patocronia de esta infección en base a la aparición y tipos de respuestas inmunitarias que se desarrollan en la LCan, así como de la detección de amastigotes de *L. infantum* o de su ADNk.

DISCUSIÓN

De esta forma, en LCan la aparición de los primeros anticuerpos específicos es detectable a partir de los 30 días postinfección, es decir, durante el periodo de incubación o latencia en el que los perros son totalmente asintomáticos y con estado de salud aparentemente normal. Durante este periodo silente, que según animales puede durar más de 6 meses, la infección se está diseminando y visceralizando a la práctica totalidad de los órganos, aparatos y sistemas, dando comienzo la fase de patencia y aparición de muy diferentes expresiones clínico-lesionales propias de esta enfermedad. En este sentido, no podemos olvidar que esta enfermedad crónica (al igual que otras infectocontagiosas) no debe ser pronosticada erróneamente en base a la existencia o no de signos clínicos, ya que éstos, en mayor o menor medida, irán apareciendo en el tiempo producto de respuestas inmunitarias que, además de ineficaces en el control parasitario, resultan patológicas (97,171).

Los resultados reportados en la presente tesis doctoral evidencian la necesidad y la idoneidad del sistema de diagnóstico múltiple MultiLeish 5D, por su alta sensibilidad y especificidad en cualquier etapa de la enfermedad debido a la combinación de 5 diagnósticos a partir de 3 muestras (sangre, pelo e hisopado dermatomucoso). Este desarrollo ha sido posible gracias a diferentes trabajos que utilizan las técnicas de referencia validadas para comparar sus resultados con los reportados por otras muestras y soportes en diferentes etapas clínicas de la LCan.

Así, los primeros ensayos realizados por Iniesta y col, en el año 2013 (224) con ratones BALB/infectados experimentalmente por la especie del tropismo cutáneo *L. major*, se observó que el tamaño de la inflamación del sitio de inoculación, descrito por (332), estaba directamente relacionado con la detección de ADN del parásito en el pelo de las orejas, el cual aumentó de forma progresiva durante los 35 días del ensayo. Por esto, es muy probable que la detección y el aumento del ADNk en pelo de la piel lesionada de la oreja sea un reflejo de la tasa de infección.

Posteriormente, Belinchón-Lorenzo y col. en el año 2013 y 2016 (223,234), demostraron por primera vez la idoneidad de las muestras de pelo y cerumen para su análisis qPCR

DISCUSIÓN

y la detección de ADNk de *L. infantum*. La qPCR de pelo mostró una sensibilidad similar a la del método utilizando muestras de sangre, lo que apoya nuestros resultados más actuales y presentados en la memoria de la tesis, en los que la sensibilidad el método qPCR pelo de zonas que rodeaban a las lesiones es del 78,57%, y la del pelo de zonas sanas del 62.5%, nuevamente similar a la sangre seca adherida a papel Whatman (68,75%) (301). Siguiendo con el análisis de nuestros resultados, la sensibilidad el método qPCR de cerumen fue la mayor (87,5%), como ya se había informado anteriormente (90,9%) respecto a las muestras de médula ósea (234). Esto hace idónea la utilización de las muestras de cerumen para el diagnóstico de la LCan, la cual también está respaldada porque las concentraciones más altas de ADNk observadas en cerumen se corresponden a las cantidades más altas detectadas en médula ósea y/o ganglio linfático, muestras identificadas como 100% sensibles en estudios anteriores (234), y apoyado por nuestros resultados que validan la total sensibilidad y especificidad del método qPCR de MO y GL. Los resultados evidencian que mediante la qPCR de cerumen se detectan más positivos que mediante la qPCR de sangre. Sin embargo, las cantidades de ADNk del parásito son bajas (234). Se suman a los nuestros en los que en general método qPCR fue capaz de detectar ADNk en 14 de 16 perros (9 con resultados positivos en todas las muestras y 5 al menos en 2) y que en los falsos negativos fue posible el diagnóstico gracias a la presencia de respuesta de anticuerpos, justificando la idoneidad de una combinación de técnicas que aseguren un diagnóstico y pronóstico fiable, como recientemente se ha informado (149).

En términos generales, gracias a estos hallazgos y uso de los estándares de las técnicas diagnósticas inmunológicas (ELISA e IFI) y parasitológicas o moleculares (qPCR de médula ósea y ganglio linfático) ha sido posible el desarrollo de MultiLeish 5D, el cual nos ha permitido diagnosticar y evaluar la infección por *L. infantum* desde las primeras semanas determinando tanto la magnitud y tipos de respuestas de anticuerpos como de la carga parasitaria y localizaciones.

DISCUSIÓN

Así diagnosticamos y definimos en función de la patocronia, y de forma similar a la descrita por Lanotte y col., en 1979 (159), las primoinfecciones de la piel, la LCan latente evolutiva en periodo de incubación y sin síntomas muy aparentes (que según individuos tendrá mayor o menor duración dependiente del control inmunitario de la infección), pero que puede ser diagnosticada precozmente gracias al uso de este Sistema Múltiple de detección tanto de los anticuerpos específicos frente a antígenos de *Leishmania* presentes en las muestras de sangre seca depositada en papel Whatman como de la carga parasitaria (ADNk) presente en las muestras de pelo, cerumen y sangre seca analizadas. Tal es el caso de los 4 perros pertenecientes al Grupo 1 (leishmaniosis latente o evolutiva), en los que, pese a su baja positividad de anticuerpos en sangre, tienen resultados positivos en el método qPCR de al menos dos muestras del MultiLeish 5D.

Tal y como se había informado previamente (223,234), los resultados pertenecientes los perros 3 y 4 del Grupo 1 (leishmaniosis latente o evolutiva), en ocasiones es posible detectar perros primoinfectados y en fase de diseminación por la existencia de una clara positividad a qPCR en el foco primario de la infección o chancro de inoculación, detectándose cargas parasitarias muy elevadas en pelo, costras o hisopados dermomucosos (333).

Es ya conocido que las técnicas inmunológicas pueden dejar escapar a primoinfectados o asintomáticos (330), como ocurre con el perro 1 perteneciente al Grupo 1 (leishmaniosis latente o evolutiva), cuyo diagnóstico fue posible gracias a la realización de técnicas moleculares, en concreto qPCR de hisopado conjuntival (333).

Una vez avanzada la infección en el tiempo, la expresión clínica de la LCan aparece bajo muy diferentes intensidades y formas. Las lesiones cutáneas, hematopoyéticas, renales, hepáticas, articulares y un largo etc., están presentes, determinando finalmente el mal pronóstico de esta enfermedad en un alto porcentaje de los casos. En este grupo de LCan patente, MultiLeish 5D también determina de forma fiable y precisa los tipos y magnitudes de la respuesta de anticuerpos y de la carga parásita a partir de las muestras

DISCUSIÓN

obtenidas de forma no invasiva como el pelo y el hisopado dermatomucoso. Se ha evidenciado que la cantidad de ADNk de *Leishmania* obtenida por qPCR en las muestras de cerumen se ha correlacionado significativamente ($p < 0.01$) con los títulos de anticuerpos determinados por las pruebas inmunológicas (ELISA e IFI) ($r = 0.50-0.45$) y la presencia de signos clínicos ($r = 0.53$) (234), dato que confirman los resultados del Grupo 2 (leishmaniosis patente) que presentamos en la memoria de tesis.

Con todo esto observamos que los resultados entre individuos con LCan son muy variables en cuanto a tipos de muestras y magnitudes de positividad, lo cual resulta una valiosa información diagnóstica y de pronóstico como punto de partida previo a los tratamientos que se utilicen por parte de los veterinarios clínicos.

El análisis de la eficacia terapéutica en LCan es probablemente una de las mayores dificultades en la clínica. El seguimiento de los perros tratados con leishmanicidas y mantenidos en el tiempo con alopurinol u otros fármacos, supone un control preciso tanto de la disminución de la carga parasitaria como de la respuesta inmune mediada por anticuerpos frente a los antígenos de *L. infantum* para la comprobación en el tiempo del éxito terapéutico.

Hasta la actualidad, la mejoría clínica y la disminución del título de anticuerpos por IFI han sido los dos criterios más utilizados para este fin (334), pero resultan insuficientes e imprecisos a la hora de comprobar la eficacia de fármacos.

En nuestro caso, MultiLeish 5D es capaz de detectar de forma precoz el descenso de la carga parásita y desaparición del ADNk por qPCR en sangre y muestras dermomucosas, junto con la seroconversión de los anticuerpos hasta niveles basales (anticuerpos anti-SLA) e incluso negativos los dirigidos frente a proteínas internas de *L. infantum* (anticuerpos anti-PR), como se incluye en la presente memoria de tesis, en el Dossier del MultiLeish 5D y en los resultados pertenecientes al Grupo 3 (Eficacia terapéutica) publicados en la revista Argos.

Frecuentemente en LCan la eficacia terapéutica es temporal y se producen recidivas que son detectadas por la aparición de nuevos signos clínicos compatibles con la

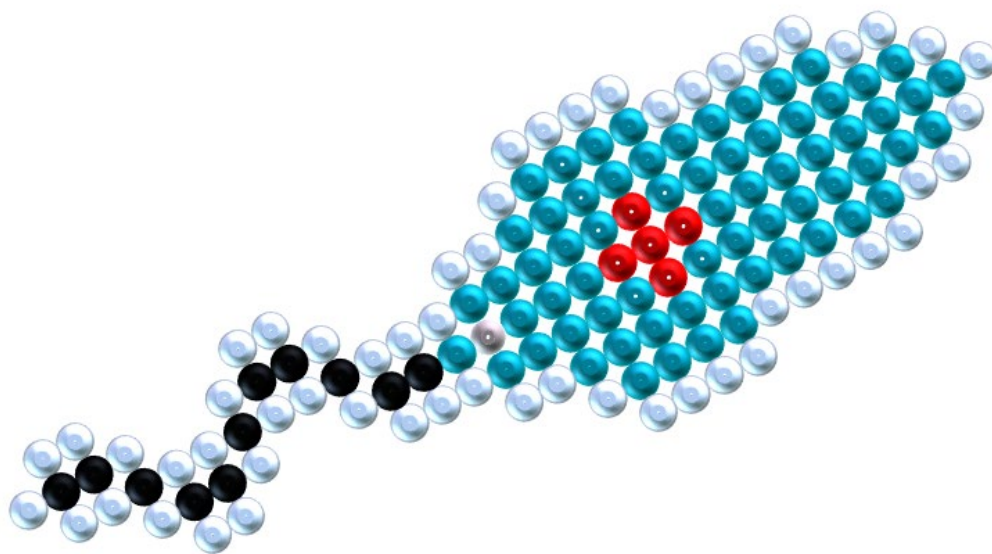
DISCUSIÓN

enfermedad, los cuales son siempre más tardíos que los cambios inmunológicos, y de las cargas parasitarias de los animales con estas recaídas. En estos casos MultiLeish 5D resulta una herramienta precoz y muy precisa en la detección de los fallos terapéuticos y/o recidivas, ya que determina las nuevas apariciones del ADNk parasitario y los incrementos de los niveles de anticuerpos frente a los antígenos de *L. infantum*, tal y como reflejamos en el Grupo 4 (Recidivas) del artículo publicado en la revista Argos.

Finalmente, otra de las utilidades de MultiLeish 5D es su total especificidad de resultados en perros negativos con clínica compatible de LCan como dermopatías, oculopatías, linfadenopatías, etc., tal y como muestran los resultados incluidos en la presente memoria de tesis y publicados en la revista Argos, del Grupo 5 (Negativos con clínica compatible), por cuanto es capaz de descartar la presencia de parásitos y de anticuerpos frente a *L. infantum*. La precisión de MultiLeish 5D también posibilita descartar una falsa recidiva en perros tratados de leishmaniosis porque determina si está existiendo o no un nuevo incremento de la parasitación y de la respuesta inmune mediada por anticuerpos frente a *L. infantum*.

Por todos estos motivos, el uso diagnóstico de MultiLeish 5D está indicado en las siguientes situaciones:

- El diagnóstico de perros infectados por *L. infantum* en cualquier fase de la enfermedad.
- El seguimiento de perros positivos tratados. Ayuda a la completa monitorización y evaluación de la eficacia terapéutica (disminución tanto del nivel de anticuerpos como de la carga parasitaria).
- La detección de posibles recidivas a lo largo de la vida del perro.
- El análisis anual (recomendado entre los meses de diciembre a marzo) previo de los animales que vayan a ser vacunados frente a la leishmaniosis, posibilitando descartar de manera totalmente precisa la infección por este parásito.



CONCLUSIONES

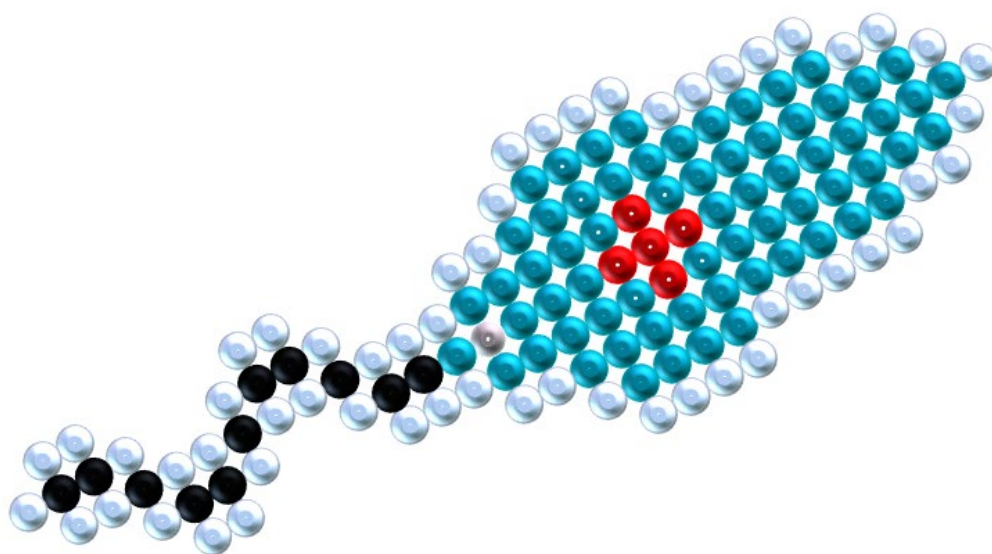
6. CONCLUSIONES

1. Las validaciones realizadas de las técnicas inmunológicas IFI y ELISA SLA IgG2 para el diagnóstico de la leishmaniosis canina demuestran que los procedimientos de estandarización de estas dos técnicas utilizadas en el laboratorio desde hace casi tres décadas son altamente sensibles y específicas para el diagnóstico de perros infectados por *Leishmania infantum*.
2. El método inmunoenzimático ELISA SLA, desarrollado para determinar la presencia de anticuerpos IgG2 en sueros caninos, ha sido validado con resultados aceptables en cuanto a los atributos de linealidad, especificidad, sensibilidad, precisión y estabilidad. Sin embargo, el análisis de robustez reveló que no deben ser modificados los estándares de la técnica en cuanto a los cambios de la temperatura, tiempo de incubación y el lote de antígeno, ya que se producen diferencias de reactividad y, en consecuencia, de su fiabilidad diagnóstica.
3. El método IFI, estandarizado para determinar la presencia y título de anticuerpos IgG totales anti-*L. infantum* utilizando sueros caninos, ha mostrado resultados aceptables en la validación de cada uno de los parámetros estudiados: especificidad, sensibilidad, precisión, robustez y estabilidad.
4. El método qPCR, estandarizado en nuestro laboratorio para determinar la presencia y concentración de ADN del kinetoplasto (ADNk) de *Leishmania infantum* en las muestras de médula ósea y ganglio linfático, obtiene resultados aceptables en la validación de cada uno de los parámetros estudiados: linealidad, precisión, especificidad, sensibilidad, límite de detección, límite de cuantificación y en la estabilidad del ADN extraído. Sin embargo, el análisis de robustez reveló que no deben ser modificados los estándares de la técnica en cuanto a los cambios del tiempo de incubación y concentración de LeishTaq-ADN.

CONCLUSIONES

Gracias a la consecución de los objetivos específicos anteriormente descritos, y empleando estas técnicas estandarizadas como métodos de referencia en el diagnóstico de la leishmaniosis canina:

5. Hemos desarrollado un “Sistema de Diagnóstico Múltiple para la detección y seguimiento de perros infectados por *Leishmania infantum*” registrado como MultiLeish 5D, que permite a los profesionales de clínicas veterinarias el diagnóstico de la leishmaniosis canina en las diferentes fases y estados de la patocronia: primoinfectados, latentes evolutivos y patentes.
6. MultiLeish 5D, además, resulta una importante herramienta diagnóstica aplicada al seguimiento de perros tratados, por cuanto es capaz de detectar la regresión de la infección y de las respuestas inmunitarias en los casos de éxito terapéutico o, por el contrario, los casos de recidivas tan frecuentes en leishmaniosis canina. Igualmente, resulta un diagnóstico fiable para descartar casos clínicos con signos compatibles con leishmaniosis canina pero negativos a MultiLeish 5D.
7. En estudios epidemiológicos de campo, MultiLeish 5D es igualmente una herramienta diagnóstica muy fiable, sensible y específica para la detección de perros portadores de *L. infantum* sin necesidad del uso de muestras cruentas para su análisis parasitológico y evitando los resultados falsos negativos y positivos que se pueden producir en las técnicas inmunológicas utilizadas en los estudios de seroprevalencia para esta enfermedad.
8. El uso de muestras no invasivas, sangre seca, pelo e hisopados dermomucosos utilizadas en MultiLeish 5D, supone una nueva herramienta destinada para el control de la enzootia canina, y por consiguiente, de esta zoonosis parasitaria.



BIBLIOGRAFÍA

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Maslov Dmitri A, Podlipaev Sergei A, Lukes Julius. Phylogeny of the kinetoplastida: taxonomic problems and insights into the evolution of parasitism. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2001;96(3):397–402. doi: [10.1590/s0074-02762001000300021](https://doi.org/10.1590/s0074-02762001000300021).
2. Momen H, Cupolillo E. Speculations on the origin and evolution of the genus *Leishmania*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 2000;95(4):583–588. doi: <https://doi.org/10.1590/S0074-02762000000400023>.
3. Zink AR, Spigelman M, Schraut B, Greenblatt CL, Nerlich AG, Donoghue HD. Leishmaniasis in ancient Egypt and Upper Nubia. *Emerg Infect Dis.* 2006;12(10):1616-1617. doi: [10.3201/eid1210.060169](https://doi.org/10.3201/eid1210.060169).
4. Steverding D. The history of leishmaniasis. *Parasit Vectors.* 2017;10(1):1–10. doi: 10.1186/s13071-017-2028-5.
5. Altamirano-Enciso Alfredo J, Marzochi Mauro CA, Moreira João S, Schubach Armando O, Marzochi Keyla BF. On the origin and spread of cutaneous and mucosal leishmaniasis, based on pre- and post- colombian historical source. *Hist Cienc Saude Manguinhos.* 2003;852–882. doi: <https://doi.org/10.1590/S0104-59702003000300004>.
6. Cox FEG. History of Human Parasitology. *Clin Microbiol Rev.* 2002;15(4):595–612. doi: <https://doi.org/10.1002/9780470688618.taw0166>.
7. Costa MA, Matheson C, Iachetta L, Llagostera A, Appenzeller O. Ancient Leishmaniasis in a Highland Desert of Northern Chile. *PLoS One.* 2009; 10;4(9):e6983. doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006983>.
8. Lainson R. The Neotropical *Leishmania* species: a brief historical review of their discovery, ecology and taxonomy. *Amaz Saude.* 2010;1(2):13–32. doi: <http://dx.doi.org/10.5123/S2176-62232010000200002>.
9. Cunningham DD. On the presence of peculiar parasitic organisms in the tissue of a specimen of Delhi boil. 5th ed. Calcutta: Printed by the Superintendent of government printing; 1885.
10. Leishman WB. On the possibility of the occurrence of trypanosomiasis in India. 1903. *Natl Med J India.* 1994;7(4):196-200. PMID: 7950960.
11. Donovan C. On the possibility of the occurrence of trypanosomiasis in India. 1903. *Natl Med J India.* 1994;7(4):196, 201–2. PMID: 7950961.
12. Ross R. Note on the bodies recently described by leishman and donovan. *Br Med J.* 1903; 2:1261–2. doi: <https://doi.org/10.1136/bmj.2.2237.1261>.

BIBLIOGRAFÍA

13. Hotez PJ, Remme JHF, Buss P, Alleyne G, Morel C, Breman JG. Combating tropical infectious diseases : report of the disease control priorities in developing countries project priorities using. *Clin Infect Dis*. 2004;38(6):871–8. doi: <https://doi.org/10.1086/382077>.
14. Hotez PJ, Molyneux DH, Fenwick A, Ottesen E, Sachs SE, Sachs JD. Incorporating a rapid-impact package for neglected tropical diseases with programs for HVI/AIDS, Tuberculosis , and Malaria. A comprehensive pro-poor health policy and strategy for the developing world. *PLoS Med*. 2006;3(5):576–84. doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.0030102>.
15. Alvar J, Yactayo S, Bern C. Leishmaniasis and poverty. *Trends Parasitol*. 2006; 22(12). doi: <https://doi.org/10.1016/j.pt.2006.09.004>.
16. Bern C, Maguire JH, Alvar J. Complexities of Assessing the Disease Burden Attributable to Leishmaniasis. *PLoS Negl Trop Dis*. 2008; 2(10). doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000313>.
17. World Health Organization. 60ª Asamblea Mundial de la Salud. Resolución WHASS1/2006-WHA60/2007/REC/1. Ginebra (Suiza); 2007. Disponible en: https://apps.who.int/gb/ebwha/pdf_files/WHASSA_WHA60-Rec1/S/WHASS1_WHA60REC1-sp.pdf.
18. WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis y World Health Organization. Control of the leishmaniasis. Ginebra (Suiza); 2010. Disponible en: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/44412>.
19. Organización Mundial de la Salud. 67ª Asamblea Mundial de la Salud. Ginebra (Suiza); 2014. Informe Nro.: WHA67/2014/REC/1. Disponible en: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/260341>.
20. Asamblea Mundial de la Salud, 60. Control de la leishmaniasis: informe de la Secretaría. Organización Mundial de la Salud; 2007. Informe Nro.:AS/10. Disponible en: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/25315>
21. Roque ALR, Jansen AM. Parasites and wildlife wild and synanthropic reservoirs of Leishmania species in the Americas. *Int J Parasitol Parasites Wildl*. 2014; 3(3):251–62. doi:[10.1186/s13071-015-0976-1](https://doi.org/10.1186/s13071-015-0976-1).
22. Marin Iniesta F, Marin Iniesta E, Martin Luengo F. Papel de perros y zorros como reservorio de leishmaniosis en la región murciana. Resultados preliminares. *Rev Ibérica Parasitol*. 1982; 42: 307-313.
23. Morillas-Márquez F, Benavides-Delgado I, González-Castro J, Reyes-Magaña A, Valero-López A. Occurrence of Leishmania sp. In *Rattus rattus* in the province of Granada. *Ann Parasitol Hum Comp*. 1985;60:768–770.

BIBLIOGRAFÍA

24. Fisa R, Gállego M, Castillejo S, Aisa MJ, Serra T, Riera C, et al. Epidemiology of canine leishmaniasis in Catalonia (Spain) the example of the priorat focus. *Vet Parasitol.* 1999;83(2):87–97. doi: [https://doi.org/10.1016/S0304-4017\(99\)00040-0](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(99)00040-0).
25. Portús M, Gállego M, Riera C, Aisa M, Fisa R, Castillejo S. Wild and domestic mammals in the life cycle of *Leishmania infantum* in Southwest Europe. A literature review and studies performed in Catalonia (Spain). *Rev Iber Parasitol.* 2002;(62):72–76.
26. Quinnell RJ, Courtanay O. Transmission, reservoir hosts and control of zoonotic visceral leishmaniasis. *Parasitology.* 2009;136(14):1915. doi: <https://doi.org/10.1017/S0031182009991156>.
27. Muñoz-Madrid R, Belinchón-Lorenzo S, Iniesta V, Fernández-Cotrina J, Parejo JC, Serrano FJ, et al. First detection of *Leishmania infantum* kinetoplast DNA in hair of wild mammals: Application of qPCR method to determine potential parasite reservoirs. *Acta Trop.* 2013;128(3):706–9. doi: [10.1016/j.actatropica.2013.08.009](https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2013.08.009).
28. Dye C. Epidemiological significance of vector–parasite interactions. *Parasitology.* 1990;101(03):409-15. doi:[10.1017/s0031182000060601](https://doi.org/10.1017/s0031182000060601).
29. Amela C, Suarez B, Isidoro B, Sierra MJ, Santos SS, Simón F. Evaluación del riesgo de transmisión de *Leishmania infantum* en España. Madrid. Centro de Coordinación de Alertas y Emergencias sanitarias. Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad; 2012. Informe Nro. (CCAES0). Disponible en: <https://www.mscbs.gob.es/profesionales/saludPublica/ccayes/analisisituacion/doc/leishmania.pdf>.
30. Hommel M. Visceral leishmaniasis: biology of the parasite. *J Infect.* 1999;39(2):101–11. doi:[https://doi.org/10.1016/S0163-4453\(99\)90000-2](https://doi.org/10.1016/S0163-4453(99)90000-2).
31. Rioux JA, Lanotte G, Serres E, Pratlong F, Bastien P, Perieres J. Taxonomy of *Leishmania*. Use of isoenzymes. Suggestions for a new classification. *Ann Parasitol Hum.* 1990; 65(3):doi:[10.1051/parasite/1990653111](https://doi.org/10.1051/parasite/1990653111)
32. Akhoundi M, Kuhls K, Cannet A, Votýpka J, Marty P, Delaunay P, et al. A historical overview of the classification, evolution, and dispersion of *Leishmania* parasites and sandflies. *PLoS Negl Trop Dis.* 2016;10(3):e0004349. doi:[10.1371/journal.pntd.0004349](https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004349)
33. Fraga J, Montalvo AM, De Doncker S, Dujardin J-C, Van der Auwera G. Phylogeny of *Leishmania* species based on the heat-shock protein 70 gene. *Infect Genet Evol.* 2010;10(2):238–45. doi:[10.1016/j.meegid.2009.11.007](https://doi.org/10.1016/j.meegid.2009.11.007)

BIBLIOGRAFÍA

34. Ross R. Note on the bodies recently described by Leishman and Donovan. *Br Med J.* 1903;2:1261–2. doi:<https://doi.org/10.1136/bmj.2.2237.1261>.
35. Lainson R, Shaw JJ. Evolution, classification and geographical distribution. In: Peters W, Killick-kendrick R. *The leishmaniasis in biology and medicine. Volume I. Biology and epidemiology.* Londres: Academic Press; 1987. p. 1-120. ISBN : 0125521014.
36. Kaufer A, Ellis J, Stark D, Barratt J. The evolution of trypanosomatid taxonomy. *Parasit Vectors.* 2017;10(1):287. doi: <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2204-7>
37. Ashford RW. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. *Int J Parasitol.* 2000;30(12–13):1269–81. doi: [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(00\)00136-3](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(00)00136-3).
38. Alexeieff A. Mitochondries et corps parabasal chez les flagellés. *Comptes. Comptes Rendus la Société Biol.* 1917;80:358–61.
39. Vickerman K. The diversity of the kinetoplastid flagellates. En: WHR Lumsden, DA Evans. *Biology of the Kinetoplastida.* London/New York/San Francisco: Academic Press; 1976. p. 1-34.
40. Vickerman K. The mechanism of cyclical development in trypanosomes of the *Trypanosoma brucei* sub-group: An hypothesis based on ultrastructural observations. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1962;56(6):487–95. doi: [https://doi.org/10.1016/0035-9203\(62\)90072-X](https://doi.org/10.1016/0035-9203(62)90072-X).
41. Steinert M. L'absence d'histone dans le kinétonucléus des trypanosomes. Etude cytochimique. *Exp Cell Res.* 1965;39(1):69–73. doi: [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(65\)90008-X](https://doi.org/10.1016/0014-4827(65)90008-X).
42. Teixeira DE, Benchimol M, Rodrigues JCF, Crepaldi PH, Pimenta PFP, de Souza W. The cell biology of *Leishmania*: how to teach using animations. *PLoS Pathog.* 2013;9(10):e1003594. doi: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003594>.
43. Centers for Disease Control and Prevention. *Leishmaniasis.* 2017. Disponible en: <https://www.cdc.gov/dpdx/leishmaniasis/index.html>.
44. Bogdan C, Röllinghoff M. The immune response to *Leishmania*: Mechanisms of parasite control and evasion. *International Journal for Parasitology.* 1998;28(1):121–34. doi: [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(97\)00169-0](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(97)00169-0).
45. Lewis DH, Peters W. The resistance of intracellular *Leishmania* parasites to digestion by lysosomal enzymes. *Ann Trop Med Parasitol.* 1977;71(3):295–312. doi: <https://doi.org/10.1080/00034983.1977.11687192>.

BIBLIOGRAFÍA

46. Liese J, Schleicher U, Bogdan C. The innate immune response against *Leishmania* parasites. *Immunobiology*. 2008;213(3–4):377–87. doi: [10.1016/j.imbio.2007.12.005](https://doi.org/10.1016/j.imbio.2007.12.005).
47. Gállego Berenguer J. Manual de Parasitología. Barcelona U, editor. Morfología y Biología de los parásitos de interés sanitario. 2ª ed. Barcelona: Universidad de Barcelona; 2006. 491 p.
48. Ruiz-Postigo JA, Grout L, Jain S. World Health Organization [Internet]. Global leishmaniasis surveillance, 2017–2018, and first report on 5 additional indicators. Geneva; 2020. Informe Nro.25, 265–280. Disponible en: <https://www.who.int/publications/i/item/who-wer9525>.
49. Alvar J, Vélez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS One*. 2012;7(5). doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035671>.
50. World Health Organization. Leishmaniasis fact sheet. 2020. Disponible en: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>.
51. Melby PC, Sacks DL. Identification of antigens recognized by T Cells in human Leishmaniasis: Analysis of T-Cell Clones by Immunoblotting. *Infect Immun*. 1989; 57(10): 2971–2976.
52. Badaró R. Progress of research in visceral leishmaniasis in the endemic area of Jacobina-Bahia 1934-1989. *Rev Soc Bras Med Trop*. 1988;21(4):159–64. doi: [10.1590/S0037-86821988000400001](https://doi.org/10.1590/S0037-86821988000400001).
53. Desjeux P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. 2004;27(5):305–18. doi: [10.1016/j.cimid.2004.03.004](https://doi.org/10.1016/j.cimid.2004.03.004).
54. Malla N, Mahajan RC. Pathophysiology of visceral leishmaniasis - some recent concepts. *Indian J Med Res*. 2006;123(3):267–74.
55. Burza S, Croft SL, Boelaert M. Leishmaniasis. *Lancet*. 2018;392(10151):951–70. doi: [10.1016/S0140-6736\(18\)31204-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)31204-2).
56. Red de Vigilancia Epidemiológica de la Comunidad de Madrid. Protocolo de vigilancia de la Leishmaniasis. Madrid; 2018. Disponible en: https://www.comunidad.madrid/sites/default/files/doc/sanidad/epid/leishmaniasis_protocolo_de_vigilancia_rev_mayo_2019.pdf.
57. Gálvez R, Montoya A, Cruz I, Fernández C, Martín O, Checa R, et al. Latest trends in *Leishmania infantum* infection in dogs in Spain, Part I: mapped seroprevalence and sand fly distributions. *Parasit Vectors*. 2020;13(1):204. doi: [10.1186/s13071-020-04081-7](https://doi.org/10.1186/s13071-020-04081-7).
58. Encinas Aragón J, Fernández Gómez F, Lasheras Carbajo M, Barbas de Buey F.

BIBLIOGRAFÍA

- Leishmaniosis canina y humana: una visión en conjunto. Zoonosis. 2006. Disponible en: <https://studylib.es/doc/5883399/leishmaniosis-canina-y-humana--una-visi%C3%B3n-de-conjunto>.
59. Gil-Prieto R, Walter S, Alvar J, de Miguel AG. Epidemiology of Leishmaniasis in Spain based on hospitalization records (1997–2008). *Am J Trop Med Hyg.* 2011;85(5):820–5. doi: [10.4269/ajtmh.2011.11-0310](https://doi.org/10.4269/ajtmh.2011.11-0310).
60. Suárez Rodríguez B, Isidro Fernández B, Santos Sanz S, Sierra Moros MJ, Molina Moreno R, Astray Mochales J, et al. Situación epidemiológica y de los factores de riesgo de transmisión de *Leishmania infantum* en España. *Rev Esp Salud Publica* . 2012;86(6):555–64. Disponible en: http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1135-57272012000600002&lng=es.
61. Arce A, Estirado A, Ordobas M, Sevilla S, García N, Moratilla L, et al. Re-emergence of leishmaniasis in Spain: community outbreak in Madrid, Spain, 2009 to 2012. *Euro Surveill.* 2013;18(30):20546. doi: [10.2807/1560-7917.es2013.18.30.20546](https://doi.org/10.2807/1560-7917.es2013.18.30.20546)
62. Ministerio de Sanidad. BOE. Núm. 65: Orden SSI/445/2015, de 9 de marzo, por la que se modifican los anexos I, II y III del Real Decreto 2210/1995, de 28 de diciembre, por el que se crea la Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica, relativos a la lista de enfermedades de declarar. B.O.E. Madrid; 2015 p. 24012–5.
63. Dirección General de Salud Pública (Consejería de Sanidad. Comunidad de Madrid). Brote de leishmaniasis en Fuenlabrada y otros municipios de la Comunidad de Madrid: El papel de las liebres y los conejos como reservorios. Colegio Oficial de Veterinarios de Madrid, editor. Madrid; 2017.
64. Olmedo Lucerón C, Pérez Meixeira AM, Iriso Calle A, Aránguez Ruiz E, Abad Sanz I. Evolución y análisis espacial de los casos de leishmaniasis en una zona rural colindante al brote comunitario de Madrid: 2001-2017. *Rev Esp Salud Pública.* 2018; 92: e201811084. Disponible en: http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1135-57272018000100436&lng=es.
65. Molina R, Jiménez MI, Cruz I, Iriso A, Martín-Martín I, Sevillano O, et al. The hare (*Lepus granatensis*) as potential sylvatic reservoir of *Leishmania infantum* in Spain. *Vet Parasitol.* 2012;190(1–2):268–71. doi: <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.05.006>
66. Jiménez M, González E, Martín-Martín I, Hernández S, Molina R. Could wild rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) be reservoirs for *Leishmania infantum* in the focus of Madrid, Spain? *Vet Parasitol [Internet]*. 2014 [cited 2020 Aug 20];202(3–

BIBLIOGRAFÍA

- 4):296–300. doi: [10.1016/j.vetpar.2014.03.027](https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.03.027).
67. Miró G, Müller A, Montoya A, Checa R, Marino V, Marino E, et al. Epidemiological role of dogs since the human leishmaniosis outbreak in Madrid. 2017;10(1):209. doi: [10.1186/s13071-017-2147-z](https://doi.org/10.1186/s13071-017-2147-z).
68. Short EE, Caminade C, Thomas BN. Climate change contribution to the emergence or re-emergence of parasitic diseases. *Infect Dis Res Treat*. 2017;10:117863361773229. doi: [10.1177/1178633617732296](https://doi.org/10.1177/1178633617732296).
69. Moreno J, Alvar J. Canine leishmaniasis: epidemiological risk and the experimental model. *Trends Parasitol*. 2002;18(9):399–405. doi: [https://doi.org/10.1016/S1471-4922\(02\)02347-4](https://doi.org/10.1016/S1471-4922(02)02347-4).
70. Maroli M, Rossi L, Baldelli R, Capelli G, Ferroglio E, Genchi C, et al. The northward spread of leishmaniasis in Italy: evidence from retrospective and ongoing studies on the canine reservoir and phlebotomine vectors. *Trop Med Int Heal*. 2008;13(2):256–64. doi: [10.1111/j.1365-3156.2007.01998.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-3156.2007.01998.x)
71. Gradoni L. Epidemiological surveillance of leishmaniasis in the European Union: operational and research challenges. *Eurosurveillance*. 2013;18(30):20539. doi: [10.2807/1560-7917.ES2013.18.30.20539](https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES2013.18.30.20539).
72. Morales-Yuste M, Morillas-Márquez F, Díaz-Sáez V, Barón-López S, Acedo-Sánchez C, Martín-Sánchez J. Epidemiological implications of the use of various methods for the diagnosis of canine leishmaniasis in dogs with different characteristics and in differing prevalence scenarios. *Parasitol Res*. 2012;111(1):155–64. doi: [10.1007/s00436-011-2812-7](https://doi.org/10.1007/s00436-011-2812-7).
73. Miró G, Checa R, Montoya A, Hernández L, Dado D, Gálvez R. Current situation of *Leishmania infantum* infection in shelter dogs in northern Spain. *Parasit Vectors*. 2012;5:60. doi: [10.1186/1756-3305-5-60](https://doi.org/10.1186/1756-3305-5-60).
74. Ready PD. Leishmaniasis emergence in Europe. *Euro Surveill*. European; 2010. 15(10)29–39. doi: <https://doi.org/10.2807/ese.15.10.19505-en>.
75. Nieto CG, Navarrete I, Habela M, Hernández-Rodríguez S. Seroprevalence of canine leishmaniasis around Cáceres, Spain. *Prev Vet Med*. 1992;13(3):173–8. doi: [https://doi.org/10.1016/0167-5877\(92\)90101-K](https://doi.org/10.1016/0167-5877(92)90101-K).
76. Rosado D, Arrieta E, Verdugo S, García Alonso M, Pérez Martín E. Estado actual de la Leishmaniosis canina en la ciudad de Cáceres. *Rev Exp Anim*. 1995;6(93).
77. Ashford RW. Leishmaniasis reservoirs and their significance in control. *Clin Dermatol*. 1996;14(5):523-5321. doi: [https://doi.org/10.1016/0738-081X\(96\)00041-7](https://doi.org/10.1016/0738-081X(96)00041-7).
78. Alvar J, Cañavate C, Molina R, Moreno J, Nieto J. Canine Leishmaniasis. *Adv Parasitol*. 2004;57:1–88. doi: [10.1016/S0065-308X\(04\)57001-X](https://doi.org/10.1016/S0065-308X(04)57001-X).

BIBLIOGRAFÍA

79. Otranto D, Dantas-Torres F. The prevention of canine leishmaniasis and its impact on public health. Vol. 29, Trends in Parasitology. Elsevier Current Trends; 2013. 29(7):339-45. doi: [10.1016/j.pt.2013.05.003](https://doi.org/10.1016/j.pt.2013.05.003).
80. Abbate JM, Arfuso F, Napoli E, Gaglio G, Giannetto S, Latrofa MS, et al. Leishmania infantum in wild animals in endemic areas of southern Italy. Comp Immunol Microbiol Infect Dis. 2019;67. doi: <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2019.101374>.
81. Millán J, Ferroglio E, Solano-Gallego L. Role of wildlife in the epidemiology of Leishmania infantum infection in Europe. Parasitol Res. 2014;113(6):2005–14. doi: [10.1007/s00436-014-3929-2](https://doi.org/10.1007/s00436-014-3929-2).
82. Risueño J, Ortuño M, Pérez-Cutillas P, Goyena E, Maia C, Cortes S, et al. Epidemiological and genetic studies suggest a common Leishmania infantum transmission cycle in wildlife, dogs and humans associated to vector abundance in Southeast Spain. Vet Parasitol. 2018;259:61–7. doi: [10.1016/j.vetpar.2018.05.012](https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2018.05.012).
83. Gramiccia M, Gradoni L. The current status of zoonotic leishmaniasis and approaches to disease control. Int J Parasitol. 2005;35(11-12):1169–80. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2005.07.001>.
84. Sobrino R, Ferroglio E, Oleaga A, Romano A, Millan J, Revilla M, et al. Characterization of widespread canine leishmaniasis among wild carnivores from Spain. Vet Parasitol. 2008;155(3–4):198–203. doi: [10.1016/j.vetpar.2008.05.003](https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2008.05.003).
85. Martín-Sánchez J, Acedo C, Muñoz-Pérez M, Pesson B, Marchal O, Morillas-Márquez F. Infection by Leishmania infantum in cats: Epidemiological study in Spain. Vet Parasitol. 2007;145(3–4):267–73. doi: [10.1016/j.vetpar.2006.11.005](https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.11.005).
86. Maia C, Campino L. Can domestic cats be considered reservoir hosts of zoonotic leishmaniasis? Trends Parasitol. 2011;27(8):341–4. doi: [10.1016/j.pt.2011.03.008](https://doi.org/10.1016/j.pt.2011.03.008).
87. Díaz-Sáez V, Merino-Espinosa G, Morales-Yuste M, Corpas-López V, Pratlong F, Morillas-Márquez F, et al. High rates of Leishmania infantum and Trypanosoma nabiasi infection in wild rabbits (Oryctolagus cuniculus) in sympatric and syntrophic conditions in an endemic canine leishmaniasis area: Epidemiological consequences. Vet Parasitol. 2014;202(3–4):119–27. doi: <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.03.029>.
88. Conceição-Silva F, Morgado FN. Leishmania Spp-Host Interaction: There is always an onset, but is there an end? Front Cell Infect Microbiol. 2019;9:330. doi: [10.3389/fcimb.2019.00330](https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00330).
89. Conceição-Silva F, Leite-Silva J, Morgado FN. The binomial parasite-host

BIBLIOGRAFÍA

- immunity in the healing process and in reactivation of human Tegumentary leishmaniasis. *Front Microbiol.* 2018; 19;9:1308. doi: [10.3389/fmicb.2018.01308](https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01308).
90. Akuffo H, Costa C, van Griensven J, Burza S, Moreno J, Herrero M. New insights into leishmaniasis in the immunosuppressed. *PLoS Negl Trop Dis.* 2018;12(5). doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006375>.
91. Nasser M, Modabber FZ. Generalized infection and lack of delayed hypersensitivity in BALB/c mice infected with *Leishmania tropica* major. *Infect Immun.* 1979;26(2):611–4. doi: [10.1128/IAI.26.2.611-614.1979](https://doi.org/10.1128/IAI.26.2.611-614.1979).
92. Howard JG, Hale C, Liew FY. Immunological regulation of experimental cutaneous leishmaniasis. IV. Prophylactic effect of sublethal irradiation as a result of abrogation of suppressor T cell generation in mice genetically susceptible to *Leishmania tropica*. *J Exp Med.* 1981;153(3):557–68. doi: [10.1084/jem.153.3.557](https://doi.org/10.1084/jem.153.3.557).
93. Melby PC. Experimental leishmaniasis in humans: review. *Rev Infect Dis.* 1991;13(5):1009–17. doi: [10.1093/clinids/13.5.1009](https://doi.org/10.1093/clinids/13.5.1009).
94. Abranches P, Santos-Gomes G, Rachamim N, Campino L, Schnur LF, Jaffe CL. An experimental model for canine visceral leishmaniasis. *Parasite Immunol.* 1991;13(5):537–50. doi: [10.1111/j.1365-3024.1991.tb00550.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-3024.1991.tb00550.x).
95. Martínez-Moreno A, Moreno T, Martínez-Moreno FJJ, Acosta I, Hernández S. Humoral and cell-mediated immunity in natural and experimental canine leishmaniasis. *Vet Immunol Immunopathol.* 1995;48(3–4):209–20. doi: [https://doi.org/10.1016/0165-2427\(95\)05434-8](https://doi.org/10.1016/0165-2427(95)05434-8).
96. Carrera L, Fermín ML, Tesouro M, García P, Rollán E, González JL, et al. Antibody response in dogs experimentally infected with *leishmania infantum*: infection course antigen markers. *Exp Parasitol.* 1996;82(2):139–46. doi: <https://doi.org/10.1006/expr.1996.0018>.
97. Fernández-Cotrina J, Iniesta V, Belinchón-Lorenzo S, Muñoz-Madrid R, Serrano F, Parejo JC, et al. Experimental model for reproduction of canine visceral leishmaniosis by *Leishmania infantum*. *Vet Parasitol.* 2013;192(1–3):118–28. doi: [10.1016/j.vetpar.2012.10.002](https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.10.002).
98. Cruz-Chan JV, Aguilar-Cetina A del C, Villanueva-Lizama LE, Martínez-Vega PP, Ramírez-Sierra MJ, Rosado-Vallado ME, et al. A canine model of experimental infection with *Leishmania (L.) mexicana*. *Parasit Vectors.* 2014;7:361. doi: [10.1186/1756-3305-7-361](https://doi.org/10.1186/1756-3305-7-361).
99. Hommel M, Jaffe CL, Travi B, Milon G. Experimental models for leishmaniasis and for testing anti-leishmanial vaccines. *Ann Trop Med Parasitol.* 1995;89 Suppl 1:55–73. doi: [10.1080/00034983.1995.11813015](https://doi.org/10.1080/00034983.1995.11813015).
100. Fernández Cotrina J, Iniesta V, Monroy I, Baz V, Hugnet C, Marañón F, et al. A

BIBLIOGRAFÍA

- large-scale field randomized trial demonstrates safety and efficacy of the vaccine LetiFend® against canine leishmaniasis. *Vaccine* . 2018;36(15):1972–82. doi: [10.1016/j.vaccine.2018.02.111](https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2018.02.111).
101. Roberts MTM. Current understandings on the immunology of leishmaniasis and recent developments in prevention and treatment. *Br Med Bull*. 2006;75:115–30. doi: [10.1093/bmb/ldl003](https://doi.org/10.1093/bmb/ldl003).
 102. Alvar J. *Las Leishmaniasis: de la Biología al Control*. 2ª. Salamanca: Laboratorios Intervent; 2001. 200 p.
 103. Kaye P, Scott P. Leishmaniasis: complexity at the host–pathogen interface. *Nat Rev Microbiol*. 2011;9(8):604–15. doi: [10.1038/nrmicro2608](https://doi.org/10.1038/nrmicro2608).
 104. Mosser DM, Edelson PJ. The third component of complement (C3) is responsible for the intracellular survival of *Leishmania major*. *Nature*. 1987;327(6120):329–31. doi: [10.1038/327329b0](https://doi.org/10.1038/327329b0).
 105. McConville MJ, Turco SJ, Ferguson MA, Sacks DL. Developmental modification of lipophosphoglycan during the differentiation of *Leishmania major* promastigotes to an infectious stage. *EMBO J*. 1992;11(10):3593–600. doi: <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1992.tb05443.x>.
 106. Brittingham A, Morrison CJ, McMaster WR, McGwire BS, Chang KP, Mosser DM. Role of the *Leishmania* surface protease gp63 in complement fixation, cell adhesion, and resistance to complement-mediated lysis. *J Immunol*. 1995;155(6):3102–11.
 107. Handman E. Cell Biology of *Leishmania*. *Adv Parasitol*. 1999;44:1–39. doi: [10.1016/s0065-308x\(08\)60229-8](https://doi.org/10.1016/s0065-308x(08)60229-8).
 108. Kautz-Neu K, Schwonberg K, Fischer MR, Schermann AI, von Stebut E. Dendritic cells in *Leishmania major* infections: mechanisms of parasite uptake, cell activation and evidence for physiological relevance. *Med Microbiol Immunol*. 2012;201(4):581–92. doi: [10.1007/s00430-012-0261-2](https://doi.org/10.1007/s00430-012-0261-2).
 109. Wright EP, el Amin ER. *Leishmania* infection: surfaces and immunity. *Biochem Cell Biol*. 1989;67(9):525–36. doi: [10.1139/o89-084](https://doi.org/10.1139/o89-084).
 110. Courret N, Fréhel C, Gouhier N, Pouchelet M, Prina E, Roux P, et al. Biogenesis of *Leishmania*-harbouring parasitophorous vacuoles following phagocytosis of the metacyclic promastigote or amastigote stages of the parasites. *J Cell Sci*. 2002;87(1):113–9.
 111. Dermine JF, Scianimanico S, Privé C, Descoteaux A, Desjardins M. *Leishmania* promastigotes require lipophosphoglycan to actively modulate the fusion properties of phagosomes at an early step of phagocytosis. *Cell Microbiol*. 2000;2(2):115–26. doi: [10.1046/j.1462-5822.2000.00037.x](https://doi.org/10.1046/j.1462-5822.2000.00037.x).

BIBLIOGRAFÍA

112. Moore KJ, Labrecque S, Matlashewski G. Alteration of *Leishmania donovani* infection levels by selective impairment of macrophage signal transduction. *J Immunol.* 1993;150(10):4457–65.
113. Bogdan C. Natural killer cells in experimental and human leishmaniasis. *Front Cell Infect Microbiol.* 2012;2:69. doi: [10.3389/fcimb.2012.00069](https://doi.org/10.3389/fcimb.2012.00069).
114. Liew FY, O'Donnell CA. Immunology of Leishmaniasis. *Adv Parasitol.* 1993;32:161–259. doi: [10.1016/s0065-308x\(08\)60208-0](https://doi.org/10.1016/s0065-308x(08)60208-0).
115. Almeida M de, Vilhena V, Barral A, Barral-Netto M. Leishmanial infection: analysis of its first steps. A review. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2003;98(7):861–70. doi: [10.1590/s0074-02762003000700001](https://doi.org/10.1590/s0074-02762003000700001).
116. Gurung P, Kanneganti TD. Innate immunity against *Leishmania* infections. *Cell Microbiol.* 2015;17(9):1286-94. doi: [10.1111/cmi.12484](https://doi.org/10.1111/cmi.12484)
117. Blank C, Fuchs H, Rappersberger K, Röllinghoff M, Moll H. Parasitism of epidermal Langerhans cells in experimental cutaneous leishmaniasis with *Leishmania major*. *J Infect Dis.* 1993;167(2):418–25. doi: [10.1093/infdis/167.2.418](https://doi.org/10.1093/infdis/167.2.418).
118. Sher A, Coffman RL. Regulation of Immunity to Parasites by T Cells and T Cell-Derived Cytokines. *Annu Rev Immunol.* 1992;10(1):385–409. doi: [10.1146/annurev.iy.10.040192.002125](https://doi.org/10.1146/annurev.iy.10.040192.002125).
119. Liu D, Uzonna JE. The early interaction of *Leishmania* with macrophages and dendritic cells and its influence on the host immune response. *Front Cell Infect Microbiol.* 2012;2:83. doi: [10.3389/fcimb.2012.00083](https://doi.org/10.3389/fcimb.2012.00083).
120. Tripathi P, Singh V, Naik S. Immune response to leishmania: paradox rather than paradigm. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2007;51(2):229-42. doi: [10.1111/j.1574-695X.2007.00311.x](https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2007.00311.x).
121. Alexander J, Bryson K. T helper (h)1/Th2 and *Leishmania*: Paradox rather than paradigm. *Immunol Lett.* 2005;99(1):17-23.. doi: [10.1016/j.imlet.2005.01.009](https://doi.org/10.1016/j.imlet.2005.01.009).
122. Iniesta V, Corraliza I, Carcelén J, Gómez Gordo L, Fernández-Cotrina J, Parejo JC, et al. *Leishmania major* infection in susceptible and resistant mice elicit a differential humoral response against a total soluble fraction and defined recombinant antigens of the parasite. *Parasitol Res.* 2008;102(5):887–93. doi: [10.1007/s00436-007-0844-9](https://doi.org/10.1007/s00436-007-0844-9).
123. Reis AB, Martins-Filho OA, Teixeira-Carvalho A, Giunchetti RC, Carneiro CM, Mayrink W, et al. Systemic and compartmentalized immune response in canine visceral leishmaniasis. *Vet Immunol Immunopathol.* 2009;128(1–3):87–95. doi: [10.1016/j.vetimm.2008.10.307](https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2008.10.307)
124. Strauss-Ayali D, Baneth G, Jaffe C, Jaffe CL. Splenic immune responses during

BIBLIOGRAFÍA

- canine visceral leishmaniasis. *Vet Res.* 2007;38(4):547–64. doi: [10.1051/vetres:2007015](https://doi.org/10.1051/vetres:2007015).
125. Travi BL, Osorio EY, Saldarriaga OA, Cadena H, Tabares CJ, Peniche A, et al. Clinical, parasitologic, and immunologic evolution in dogs experimentally infected with sand fly-derived *Leishmania chagasi* promastigotes. *Am J Trop Med Hyg.* 2009;81(6):994–1003. doi: [10.4269/ajtmh.2009.09-0229](https://doi.org/10.4269/ajtmh.2009.09-0229).
126. Boggiatto PM, Ramer-Tait AE, Metz K, Kramer EE, Gibson-Corley K, Mullin K, et al. Immunologic indicators of clinical progression during canine *Leishmania infantum* infection. *Clin Vaccine Immunol.* 2010;17(2):267–73. doi: [10.1128/CVI.00456-09](https://doi.org/10.1128/CVI.00456-09).
127. Maia C, Campino L. Cytokine and phenotypic cell profiles of *leishmania infantum* infection in the dog. *J Trop Med.* 2012;2012:541571. doi: [10.1155/2012/541571](https://doi.org/10.1155/2012/541571).
128. Palatnik De Sousa CB, Santos WR, Casas CP, Paraguai De Souza E, Tinoco LW, Da Silva BP, et al. Protective vaccination against murine visceral leishmaniasis using aldehyde-containing *Quillaja saponaria* sapogenins. *Vaccine*; 2004;22(19):2470-9. doi: [10.1016/j.vaccine.2004.01.072](https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2004.01.072).
129. Reis AB, Teixeira-Carvalho A, Giunchetti RC, Guerra LL, Carvalho MG, Mayrink W, et al. 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.* 2006;146(2):303–11. doi: [10.1111/j.1365-2249.2006.03206.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2006.03206.x).
130. Liew FY, Dhaliwal JS. Distinctive cellular immunity in genetically susceptible BALB/c mice recovered from *Leishmania major* infection or after subcutaneous immunization with killed parasites. *J Immunol.* 1987;138(12):4450–6.
131. Müller I, Kropf P, Louis JA, Milon G. Expansion of gamma interferon-producing CD8+ T cells following secondary infection of mice immune to *Leishmania major*. *Infect Immun.* 1994;62(6):2575–81. doi: [10.1128/IAI.62.6.2575-2581.1994](https://doi.org/10.1128/IAI.62.6.2575-2581.1994).
132. Pinelli E, Killick-Kendrick R, Wagenaar J, Bernadina W, del Real G, Ruitenber J. Cellular and humoral immune responses in dogs experimentally and naturally infected with *Leishmania infantum*. *Infect Immun.* 1994;62(1):229–35. doi: [10.1128/IAI.62.1.229-235.1994](https://doi.org/10.1128/IAI.62.1.229-235.1994).
133. Cabral M, O'Grady JE, Gomes S, Sousa JC, Thompson H, Alexander J. The immunology of canine leishmaniasis: strong evidence for a developing disease spectrum from asymptomatic dogs. *Vet Parasitol.* 1998;76(3):173–80. doi: [10.1016/s0304-4017\(97\)00208-2](https://doi.org/10.1016/s0304-4017(97)00208-2).
134. Leandro C, Santos-Gomes GM, Campino L, Romão P, Cortes S, Rolão N, et al. Cell mediated immunity and specific IgG1 and IgG2 antibody response in natural

BIBLIOGRAFÍA

- and experimental canine leishmaniosis. *Vet Immunol Immunopathol.* 2001;79(3–4):273–84. doi: [10.1016/s0165-2427\(01\)00270-7](https://doi.org/10.1016/s0165-2427(01)00270-7).
135. Nieto CG, Navarrete I, Habela MA, Serrano F, Redondo E. Pathological changes in kidneys of dogs with natural *Leishmania* infection. *Vet Parasitol.* 1992;45(1–2):33–47. doi: [10.1016/0304-4017\(92\)90025-5](https://doi.org/10.1016/0304-4017(92)90025-5).
136. Nieto CG, Viñuelas J, Blanco A, Garcia-Alonso M, Verdugo SG, Navarrete I. Detection of *Leishmania infantum* amastigotes in canine choroid plexus. *Vet Rec.* 1996;139(14):346–7. doi: [10.1136/vr.139.14.346](https://doi.org/10.1136/vr.139.14.346).
137. Melby PC, Yang YZ, Cheng J, Zhao W. Regional differences in the cellular immune response to experimental cutaneous or visceral infection with *Leishmania donovani*. *Infect Immun.* 1998;66(1):18–27. doi: [10.1128/IAI.66.1.18-27.1998](https://doi.org/10.1128/IAI.66.1.18-27.1998)
138. Campos-Neto A, Bunn-Moreno MM. Polyclonal B cell activation in hamsters infected with parasites of the genus *Leishmania*. *Infect Immun.* 1982;38(3):871–6. 1982;38(3). doi: [10.1128/IAI.38.3.871-876.1982](https://doi.org/10.1128/IAI.38.3.871-876.1982).
139. Requena JM, Alonso C, Soto M. Evolutionarily conserved proteins as prominent immunogens during *Leishmania* infections. *Parasitol Today.* 2000;16(6):246–50. doi: [10.1016/s0169-4758\(00\)01651-3](https://doi.org/10.1016/s0169-4758(00)01651-3)
140. Galvão-Castro B, Sá Ferreira JA, Marzochi KF, Marzochi MC, Coutinho SG, Lambert PH. Polyclonal B cell activation, circulating immune complexes and autoimmunity in human american visceral leishmaniasis. *Clin Exp Immunol.* 1984;56(1):58–66.
141. Bunn-Moreno MM, Madeira ED, Miller K, Menezes JA, Campos-Neto A. Hypergammaglobulinaemia in *Leishmania donovani* infected hamsters: possible association with a polyclonal activator of B cells and with suppression of T cell function. *Clin Exp Immunol.* 1985;59(2):427–34.
142. Day MJ. Immunoglobulin G subclass distribution in canine leishmaniosis: A review and analysis of pitfalls in interpretation. *Vet Parasitol.* 2007;147(1–2):2–8. doi: [10.1016/j.vetpar.2007.03.037](https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2007.03.037).
143. Iniesta V, Gómez-Nieto LC, Molano I, Mohedano A, Carcelén J, Mirón C, et al. Arginase I induction in macrophages, triggered by Th2-type cytokines, supports the growth of intracellular *Leishmania* parasites. *Parasite Immunol.* 2002;24(3):113–8. doi: [10.1046/j.1365-3024.2002.00444.x](https://doi.org/10.1046/j.1365-3024.2002.00444.x).
144. Deplazes P, Smith NC, Arnold P, Lutz H, Eckert J. Specific IgG1 and IgG2 antibody responses of dogs to *Leishmania infantum* and other parasites. *Parasite Immunol.* 1995;17(9):451–8. doi: [10.1111/j.1365-3024.1995.tb00914.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-3024.1995.tb00914.x).
145. Nieto CG, García-Alonso M, Requena JM, Mirón C, Soto M, Alonso C, et al.

BIBLIOGRAFÍA

- Analysis of the humoral immune response against total and recombinant antigens of *Leishmania infantum*: correlation with disease progression in canine experimental leishmaniasis. *Vet Immunol Immunopathol.* 1999;67(2):117–30. doi: [10.1016/s0165-2427\(98\)00213-x](https://doi.org/10.1016/s0165-2427(98)00213-x).
146. Bourdoiseau G, Bonnefont C, Hoareau E, Boehringer C, Stolle T, Chabanne L. Specific IgG1 and IgG2 antibody and lymphocyte subset levels in naturally *Leishmania infantum*-infected treated and untreated dogs. *Vet Immunol Immunopathol.* 1997;59(1–2):21–30. doi: [10.1016/s0165-2427\(97\)00072-x](https://doi.org/10.1016/s0165-2427(97)00072-x).
 147. Iniesta L, Gállego M, Portús M. Idiotype expression of IgG1 and IgG2 in dogs naturally infected with *Leishmania infantum*. *Vet Immunol Immunopathol.* 2007;119(3–4):189–97. doi: [10.1016/j.vetimm.2007.05.006](https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2007.05.006).
 148. Solano-Gallego L, Cardoso L, Pennisi MG, Petersen C, Bourdeau P, Oliva G, et al. Diagnostic Challenges in the Era of Canine *Leishmania infantum* Vaccines. *Trends Parasitol.* 2017;33(9):706–717.. doi: [10.1016/j.pt.2017.06.004](https://doi.org/10.1016/j.pt.2017.06.004).
 149. Maurelli MP, Bosco A, Manzillo VF, Vitale F, Giaquinto D, Ciuca L, et al. Clinical, Molecular and Serological Diagnosis of Canine Leishmaniasis: An integrated approach. *Vet Sci.* 2020;7(2):43. doi: [10.3390/vetsci7020043](https://doi.org/10.3390/vetsci7020043).
 150. Solano-Gallego L, Koutinas A, Miró G, Cardoso L, Pennisi MG, Ferrer L, et al. Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniasis. *Vet Parasitol.* 2009;165(1–2):1–18. doi: [10.1016/j.vetpar.2009.05.022](https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.05.022).
 151. Solano-Gallego L, Miró G, Koutinas A, Cardoso L, Pennisi MG, Ferrer L, et al. LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniasis. *Parasit Vectors.* 2011;4:86. doi: [10.1186/1756-3305-4-86](https://doi.org/10.1186/1756-3305-4-86).
 152. Noli C, Saridomichelakis MN. An update on the diagnosis and treatment of canine leishmaniasis caused by *Leishmania infantum* (syn. *L.-chagasi*). *Vet J.* 2014;202(3):425–35. doi: [10.1016/j.tvjl.2014.09.002](https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2014.09.002).
 153. Paltrinieri S, Gradoni L, Roura X, Zatelli A, Zini E. Laboratory tests for diagnosing and monitoring canine leishmaniasis. *Vet Clin Pathol.* 2016;45(4):552–578. doi: [10.1111/vcp.12413](https://doi.org/10.1111/vcp.12413).
 154. Villanueva-Saz S, Basurco A, Martín V, Fernández A, Loste A, Verde MT. Comparison of a qualitative immunochromatographic test with two quantitative serological assays for the detection of antibodies to *Leishmania infantum* in dogs. *Acta Vet Scand.* 2019;61(1):38. doi: [10.1186/s13028-019-0473-1](https://doi.org/10.1186/s13028-019-0473-1).
 155. Albuquerque A, Campino L, Cardoso L, Cortes S. Evaluation of four molecular methods to detect *Leishmania* infection in dogs. *Parasit Vectors.* 2017;10(1):57. doi: [10.1186/s13071-017-2002-2](https://doi.org/10.1186/s13071-017-2002-2).

BIBLIOGRAFÍA

156. Maia C, Campino L. Biomarkers Associated with *Leishmania infantum* Exposure, Infection, and Disease in Dogs. *Front Cell Infect Microbiol.* 2018;8:302. doi: [10.3389/fcimb.2018.00302](https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00302).
157. Velez R, Ballart C, Domenech E, Abras A, Fernández-Arévalo A, Gómez SA, et al. Seroprevalence of canine *Leishmania infantum* infection in the Mediterranean region and identification of risk factors: The example of North-Eastern and Pyrenean areas of Spain. *Prev Vet Med.* 2019;162:67–75. doi: [10.1016/j.prevetmed.2018.10.015](https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2018.10.015).
158. Gomes YM, Paiva Cavalcanti M, Lira RA, Abath FGCC, Alves LC. Diagnosis of canine visceral leishmaniasis: Biotechnological advances. *Vet J.* 2008 Jan;175(1):45-52. doi: [10.1016/j.tvjl.2006.10.019](https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2006.10.019).
159. Lanotte G, Rioux JA, Perieres J, Vollhardt Y. [Ecology of leishmaniasis in the south of France. 10. Developmental stages and clinical characterization of canine leishmaniasis in relation to epidemiology. (author's transl)]. *Ann Parasitol Hum Comp.* 1979;54(3):277–95.
160. García-Alonso M, Blanco A, Reina D, Serrano FJ, Alonso C, Nieto CG. Immunopathology of the uveitis in canine leishmaniasis. *Parasite Immunol.* 1996;18(12):617–23. doi: [10.1046/j.1365-3024.1996.d01-39.x](https://doi.org/10.1046/j.1365-3024.1996.d01-39.x).
161. Porcino GN, Carvalho KSS, Braz DC, Silva VC, Costa CHN, De Miranda Santos IKF. Evaluation of methods for detection of asymptomatic individuals infected with *Leishmania infantum* in the state of Piauí, Brazil. *PLoS Negl Trop Dis.* 2019;13(7). doi: [10.1371/journal.pntd.0007493](https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007493)
162. Romero-Peñuela MH, Alberto Sánchez-Valencia J. El diagnóstico de la leishmaniasis visceral canina (*Leishmania infantum*). *vet.zootec.* 2007;1(1):51–9.
163. The LeishVet Group. Estadificación clínica, tratamiento y pronóstico. 2019. Recuperado de: <http://www.leishvet.org/fact-sheet/clinical-staging/>.
164. Ciaramella P, Corona M. Canine Leishmaniasis: clinical and diagnostic aspects. *Comp Cont Educ Pr.* 2003;25(5):358–69.
165. Ciaramella P, Oliva G, Luna RD, Gradoni L, Ambrosio R, Cortese L, et al. A retrospective clinical study of canine leishmaniasis in 150 dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. *Vet Rec.* 1997;141(21):539–43. doi: [10.1136/vr.141.21.539](https://doi.org/10.1136/vr.141.21.539).
166. Baneth G, Koutinas AF, Solano-Gallego L, Bourdeau P, Ferrer L. Canine leishmaniosis - new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. *Trends Parasitol.* 2008;24(7):324–30. doi: [10.1016/j.pt.2008.04.001](https://doi.org/10.1016/j.pt.2008.04.001).
167. Slappendel RJ. Prize-winning paper Jubilee Competition: Canine leishmaniasis. *Vet Q.* 1988;10(1):1–16. doi: [10.1080/01652176.1988.9694140](https://doi.org/10.1080/01652176.1988.9694140).

BIBLIOGRAFÍA

168. Gómez-Nieto LC. Epidemiología y clínica de la Leishmaniosis canina en Cáceres. Universidad de Extremadura; 1990. Recuperado de: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=202723>.
169. Baneth G, Itamar A. Canine leishmaniasis: A diagnostic and clinical challenge. *Vet J*. 2008;175:14–5. doi: [10.1016/j.tvjl.2006.11.011](https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2006.11.011).
170. Lima T, Martínez-Sogues L, Montserrat-Sangrà S, Solano-Gallego L, Ordeix L. Diagnostic performance of a qPCR for *Leishmania* on stained cytological specimens and on filter paper impressions obtained from cutaneous lesions suggestive of canine leishmaniosis. *Vet Dermatol*. 2019;30(4):318-e89.doi: [10.1111/vde.12757](https://doi.org/10.1111/vde.12757).
171. Garcia-Alonso M, Nieto CG, Blanco A, Requena JM, Alonso C, Navarrete I. Presence of antibodies in the aqueous humour and cerebrospinal fluid during *Leishmania* infections in dogs. Pathological features at the central nervous system. *Parasite Immunol*. 1996;18(11):539–46. doi: [10.1046/j.1365-3024.1996.d01-28.x](https://doi.org/10.1046/j.1365-3024.1996.d01-28.x).
172. Tavares Veras PS, Moth Fraga DB, Silva Solc M da, Sampaio Guedes CE. New Advances in the Diagnosis of Canine Visceral Leishmaniasis. En: David MC. *Leishmaniasis - Trends in Epidemiology, Diagnosis and Treatment*. 1 ed. InTech; 2014. doi: [10.5772/57573](https://doi.org/10.5772/57573).
173. Moreira OC, Yadon ZE, Cupolillo E. The applicability of real-time PCR in the diagnostic of cutaneous leishmaniasis and parasite quantification for clinical management: Current status and perspectives. *Acta Trop*. 2018 Aug;184:29-37. doi: [10.1016/j.actatropica.2017.09.020](https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.09.020).
174. Morgado FN, Cavalcanti ADS, Miranda LH de, O'Dwyer LH, Silva MRL da, Menezes RC, et al. Hepatozoon canis and Leishmania spp. coinfection in dogs diagnosed with visceral leishmaniasis. *Rev Bras Parasitol Vet*. 2016;25(4):450–8. doi: [10.1590/S1984-29612016065](https://doi.org/10.1590/S1984-29612016065)
175. Groulade P, Groulade J, Ollivier G. Serum Protein Electrophoresis in Canine Practice. *J Small Anim Pract*. 1969;10(12):705–24. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1748-5827.1969.tb04012.x>.
176. Silva JL, Oliveira VVG, Silva LAMT, e Silva RP, Alves LC, Cavalcanti MP, et al. Evaluation of Serum Biochemical Parameters, Structural Changes, Immunohistochemistry and Parasite Load in the Urinary System of Dogs Infected Naturally by *Leishmania infantum*. *J Comp Pathol*. 2019;167:26–31. doi: [10.1016/j.jcpa.2018.11.007](https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2018.11.007).
177. Vamvakidis CD, Koutinas AF, Kanakoudis G, Georgiadis G, Saridomichelakis M. Masticatory and skeletal muscle myositis in canine leishmaniasis (*Leishmania*

BIBLIOGRAFÍA

- infantum). *Vet Rec.* 2000;146(24):698–703. doi: [10.1136/vr.146.24.698](https://doi.org/10.1136/vr.146.24.698).
178. Koutinas AF, Saridomichelakis MN, Mylonakis ME, Leontides L, Polizopoulou Z, Billinis C, et al. A randomised, blinded, placebo-controlled clinical trial with allopurinol in canine leishmaniosis. *Vet Parasitol.* 2001;98(4):247–61. doi: [10.1016/s0304-4017\(01\)00399-5](https://doi.org/10.1016/s0304-4017(01)00399-5).
179. Gaskin AA, Schantz P, Jackson J, Birkenheuer A, Tomlinson L, Gramiccia M, et al. Visceral Leishmaniasis in a New York Foxhound Kennel. *J Vet Intern Med.* 2002;16(1):34. doi: [10.1892/0891-6640\(2002\)016<0034:vliany>2.3.co;2](https://doi.org/10.1892/0891-6640(2002)016<0034:vliany>2.3.co;2).
180. Martinez-Subiela S, Tecles F, Ceron JJ, Eckersall PD. Serum concentrations of acute phase proteins in dogs with leishmaniasis. *Vet Rec.* 2002;150(8):241–4. doi: [10.1136/vr.150.8.241](https://doi.org/10.1136/vr.150.8.241).
181. Corona M, Ciaramella P, Pelagalli A, Cortese L, Pero ME, Santoro D, et al. Haemostatic disorders in dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. *Vet Res Commun.* 2004;28 Suppl 1:331–4. doi: [10.1023/b:verc.0000045439.46994.1f](https://doi.org/10.1023/b:verc.0000045439.46994.1f).
182. Rallis T, Day MJ, Saridomichelakis MN, Adamama-Moraitou KK, Papazoglou L, Fytianou A, et al. Chronic hepatitis associated with canine leishmaniosis (*Leishmania infantum*): a clinicopathological study of 26 cases. *J Comp Pathol.* 2005;132(2–3):145–52. doi: [10.1016/j.jcpa.2004.09.004](https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2004.09.004).
183. Petanides TA, Koutinas AF, Mylonakis ME, Day MJ, Saridomichelakis MN, Leontides LS, et al. Factors associated with the occurrence of epistaxis in natural canine leishmaniasis (*Leishmania infantum*). *J Vet Intern Med.* 2008;22(4):866–72. doi: [10.1111/j.1939-1676.2008.0129.x](https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2008.0129.x).
184. Silvestrini P, Piviani M, Alberola J, Rodríguez-Cortés A, Planellas M, Roura X, et al. Serum cardiac troponin I concentrations in dogs with leishmaniasis: correlation with age and clinicopathologic abnormalities. *Vet Clin Pathol.* 2012;41(4):568–74. doi: [10.1111/j.1939-165X.2012.00467.x](https://doi.org/10.1111/j.1939-165X.2012.00467.x).
185. Silvestrini P, Zoia A, Planellas M, Roura X, Pastor J, Cerón JJ, et al. Iron status and C-reactive protein in canine leishmaniasis. *J Small Anim Pract.* 2014;55(2):95–101. doi: [10.1111/jsap.12172](https://doi.org/10.1111/jsap.12172)
186. Herwaldt BL. Leishmaniasis. *Lancet.* 1999;354(9185):1191-9. doi: [10.1016/S0140-6736\(98\)10178-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(98)10178-2).
187. Srivastava P, Dayama A, Mehrotra S, Sundar S. Diagnosis of visceral leishmaniasis Pankaj. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2011;105(1):1–6. doi: [10.1016/j.trstmh.2010.09.006](https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2010.09.006).
188. Santarém N, Silvestre R, Cardoso L, Schallig H, Reed SG, Cordeiro-da-Silva A. Application of an improved enzyme-linked immunosorbent assay method for

BIBLIOGRAFÍA

- serological diagnosis of canine leishmaniasis. *J Clin Microbiol.* 2010;48(5):1866–74. doi: [10.1128/JCM.02402-09](https://doi.org/10.1128/JCM.02402-09).
189. Campino L, Cortes S, Dionisio L, Neto L, Afonso MO, Maia C. The first detection of *Leishmania major* in naturally infected *Sergentomyia minuta* in Portugal. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2013;108(4):516–8. doi: [10.1590/S0074-02762013000400020](https://doi.org/10.1590/S0074-02762013000400020).
190. Ferrer L, Aisa MJ, Roura X, Portus M. Serological diagnosis and treatment of canine leishmaniasis. *Vet Rec.* 1995;136(20):514–6. doi: [10.1136/vr.136.20.514](https://doi.org/10.1136/vr.136.20.514).
191. Solano-Gallego L, Di Filippo L, Ordeix L, Planellas M, Roura X, Altet L, et al. Early reduction of *Leishmania infantum*-specific antibodies and blood parasitemia during treatment in dogs with moderate or severe disease. *Parasites and Vectors.* 2016;9(1). doi: [10.1186/s13071-016-1519-0](https://doi.org/10.1186/s13071-016-1519-0).
192. Liu F, Wu X, Li L, Ge S, Liu Z, Wang Z. Virus-like particles: Promising platforms with characteristics of DIVA for veterinary vaccine design. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 2013;36(4):343-52 doi: [10.1016/j.cimid.2013.02.002](https://doi.org/10.1016/j.cimid.2013.02.002).
193. Boelaert M, Aoun K, Liinev J, Goetghebeur E, Van Der Stuyft P. The potential of Latent Class Analysis in diagnostic test validation for canine *Leishmania infantum* infection. *Epidemiol Infect.* 1999;123(3):499-506. doi: [10.1017/s0950268899003040](https://doi.org/10.1017/s0950268899003040).
194. Ponte-Sucre A, Gamarro F, Dujardin JC, Barrett MP, López-Vélez R, García-Hernández R, et al. Drug resistance and treatment failure in leishmaniasis: A 21st century challenge. *PLoS Negl Trop Dis.* 2017;11(12):e0006052. doi: [10.1371/journal.pntd.0006052](https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006052).
195. Maia C, Campino L. Methods for diagnosis of canine leishmaniasis and immune response to infection. *Vet Parasitol.* 2008;158(4):274–87. doi: [10.1016/j.vetpar.2008.07.028](https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2008.07.028).
196. Hommel M, Kien Truong T, Bidwell DE. [Immuno-enzymatic technic (E.L.I.S.A.) applied to the serological diagnosis of human candidiasis and aspergillosis. Preliminary results]. *Nouv Presse Med.* 1976;5(41):2789–91.
197. Singh S, Dey A, Sivakumar R. Applications of molecular methods for *Leishmania* control. *Expert Rev Mol Diagn.* 2005;5(2):251–65. doi: [10.1586/14737159.5.2.251](https://doi.org/10.1586/14737159.5.2.251).
198. Soto M, Requena JM, Quijada L, Alonso C. Multicomponent chimeric antigen for serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. *J Clin Microbiol.* 1998;36(1):58–63. doi: [10.1128/JCM.36.1.58-63.1998](https://doi.org/10.1128/JCM.36.1.58-63.1998).
199. Ledesma D, Berriatua E, Thomas MC, Bernal LJ, Ortuño M, Benitez C, et al.

BIBLIOGRAFÍA

- Performance of Leishmania PFR1 recombinant antigen in serological diagnosis of asymptomatic canine leishmaniasis by ELISA. *BMC Vet Res.* 2017;13(1):304. doi: [10.1186/s12917-017-1224-z](https://doi.org/10.1186/s12917-017-1224-z).
200. Duxbury RE, Sadun EH. Fluorescent Antibody Test for the Serodiagnosis of Visceral Leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg.* 1964;13(4):525–9. doi: [10.4269/ajtmh.1964.13.525](https://doi.org/10.4269/ajtmh.1964.13.525).
201. Vercammen F, DeDeken R. Antibody kinetics during allopurinol treatment in canine leishmaniasis. *Vet Rec.* 1996;139(11):264. doi: [10.1136/vr.139.11.264-a](https://doi.org/10.1136/vr.139.11.264-a).
202. Poli A, Sozzi S, Guidi G, Bandinelli P, Mancianti F. Comparison of aminosidine (paromomycin) and sodium stibogluconate for treatment of canine leishmaniasis. *Vet Parasitol.* 1997;71(4):263–71. doi: [10.1016/s0304-4017\(97\)00014-9](https://doi.org/10.1016/s0304-4017(97)00014-9).
203. Pasa S, Toz SO, Voyvoda H, Ozbel Y. Clinical and serological follow-up in dogs with visceral leishmaniasis treated with allopurinol and sodium stibogluconate. *Vet Parasitol.* 2005;128(3–4):243–9. doi: [10.1016/j.vetpar.2004.12.002](https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2004.12.002).
204. Faria TCP. Estudo sero-epidemiológico da infecção por *Leishmania infantum* em cães e gatos do município de Vila Franca de Xira (Ribatejo, Portugal) utilizando o teste de imunofluorescência indirecta. 2008.
205. Cantos-Barreda A, Escribano D, Bernal LJ, Cerón JJ, Martínez-Subiela S. Quantification of anti-*Leishmania* antibodies in saliva of dogs. *Vet Parasitol.* 2017;242:54–8. doi: [10.1016/j.vetpar.2017.05.017](https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2017.05.017).
206. Cantos-Barreda A, Escribano D, Egui A, Thomas MC, López MC, Tecles F, et al. One-year follow-up of anti-*Leishmania* antibody concentrations in serum and saliva from experimentally infected dogs. *Int J Parasitol.* 2019;49(11):893–900. doi: [10.1016/j.ijpara.2019.06.002](https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2019.06.002).
207. Izadi S, Mirhendi H, Jalalizand N, Khodadadi H, Mohebbali M, Nekoeian S, et al. Molecular Epidemiological Survey of Cutaneous Leishmaniasis in Two Highly Endemic Metropolises of Iran, Application of FTA Cards for DNA Extraction From Giemsa-Stained Slides. *Jundishapur J Microbiol.* 2016;9(2):e32885. doi: [10.5812/jjm.32885](https://doi.org/10.5812/jjm.32885).
208. Santos TR, Carreira VS, Ferrari HF, Moreira MAB, Luvizotto MCR. Comparison of PCR with stained slides of bone marrow and lymph nodes aspirates with suspect diagnosis for leishmaniasis. *Acta Trop.* 2014;140:137–40. doi: [10.1016/j.actatropica.2014.08.016](https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2014.08.016).
209. Organización Mundial de Sanidad Animal. Leishmaniasis. In: *Manual de las Pruebas de Diagnóstico y de las Vacunas para los Animales Terrestres*. 9ª edición. 2019. Disponible en: <https://www.oie.int/es/normas/manual-terrestre/acceso-en-linea/>.

BIBLIOGRAFÍA

210. Cantacessi C, Dantas-Torres F, Nolan MJ, Otranto D. The past, present, and future of *Leishmania* genomics and transcriptomics. *Trends Parasitol.* 2015;31(3):100–8. doi: [10.1016/j.pt.2014.12.012](https://doi.org/10.1016/j.pt.2014.12.012).
211. Simpson L. Kinetoplast DNA in Trypanosomid Flagellates. *Int Rev Cytol.* 1986;99(C):119–79. doi: [10.1016/s0074-7696\(08\)61426-6](https://doi.org/10.1016/s0074-7696(08)61426-6).
212. Lukeš J, Guilbride DL, Votýpka J, Zíková A, Benne R, Englund PT. Kinetoplast DNA network: Evolution of an improbable structure [Internet]. Vol. 1, *Eukaryotic Cell. Eukaryot Cell*; 2002. p. 495–502. doi: [10.1128/ec.1.4.495-502.2002](https://doi.org/10.1128/ec.1.4.495-502.2002).
213. Akhoundi M, Downing T, Votýpka J, Kuhls K, Lukeš J, Cannet A, et al. *Leishmania* infections: Molecular targets and diagnosis. Vol. 57, *Molecular Aspects of Medicine. Mol Aspects Med.* 2017;57:1-29. doi: [10.1016/j.mam.2016.11.012](https://doi.org/10.1016/j.mam.2016.11.012).
214. Roze M. Polymerase chain reaction: A revolution in diagnosis of ocular Leishmaniasis? *Vet Q.* 1995;17 Suppl 1:S47-8. PMID: 7571315.1995;17.
215. Francino O, Altet L, Sánchez-Robert E, Rodríguez A, Solano-Gallego L, Alberola J, et al. Advantages of real-time PCR assay for diagnosis and monitoring of canine leishmaniasis. *Vet Parasitol.* 2006;137(3–4):214–21. doi: [10.1016/j.vetpar.2006.01.011](https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.01.011).
216. Maia C, Ramada J, Cristóvão JM, Gonçalves L, Campino L. Diagnosis of canine leishmaniasis: Conventional and molecular techniques using different tissues. *Vet J.* 2009;179(1):142–4. doi: [10.1016/j.tvjl.2007.08.009](https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2007.08.009).
217. Reis LES, Coura-Vital W, Roatt BM, Bouillet LÉM, Ker HG, Fortes de Brito RC, et al. Molecular diagnosis of canine visceral leishmaniasis: A comparative study of three methods using skin and spleen from dogs with natural *Leishmania infantum* infection. *Vet Parasitol.* 2013 [;197(3–4):498–503. doi: [10.1016/j.vetpar.2013.07.006](https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2013.07.006).
218. Nicolas L, Prina E, Lang T, Milon G. Real-time PCR for detection and quantitation of *Leishmania* in mouse tissues. *J Clin Microbiol.* 2002;40(5):1666–9. doi: [10.1128/jcm.40.5.1666-1669.2002](https://doi.org/10.1128/jcm.40.5.1666-1669.2002).
219. Rutledge RG, Côté C. Mathematics of quantitative kinetic PCR and the application of standard curves. *Nucleic Acids Res.* 2003;31(16):e93. doi: [10.1093/nar/gng093](https://doi.org/10.1093/nar/gng093).
220. Dantas-Torres F, Stefania Latrofa M, Otranto D. Quantification of *Leishmania infantum* DNA in females, eggs and larvae of *Rhipicephalus sanguineus*. *Parasit Vectors.* 2011;4(1):56. doi: [10.1186/1756-3305-4-56](https://doi.org/10.1186/1756-3305-4-56).
221. Manna L, Vitale F, Reale S, Caracappa S, Pavone LM, Morte R Della, et al. Comparison of different tissue sampling for PCR-based diagnosis and follow-up

BIBLIOGRAFÍA

- of canine visceral leishmaniosis. *Vet Parasitol.* 2004;125(3–4):251–62. doi: [10.1016/j.vetpar.2004.07.019](https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2004.07.019).
222. Ferreira S de A, Almeida GG, Silva S de O, Vogas GP, Fujiwara RT, de Andrade ASR, et al. Nasal, oral and ear swabs for canine visceral leishmaniasis diagnosis: new practical approaches for detection of *Leishmania infantum* DNA. *PLoS Negl Trop Dis.* 2013;7(4):e2150. doi: [10.1371/journal.pntd.0002150](https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002150).
223. Belinchón-Lorenzo S, Iniesta V, Parejo JC, Fernández-Cotrino J, Muñoz-Madrid R, Soto M, et al. Detection of *Leishmania infantum* kinetoplast minicircle DNA by Real Time PCR in hair of dogs with leishmaniosis. *Vet Parasitol.* 2013;192(1–3):43–50. doi: [10.1016/j.vetpar.2012.11.007](https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.11.007).
224. Iniesta V, Belinchón-Lorenzo S, Soto M, Fernández-Cotrino J, Muñoz-Madrid R, Monroy I, et al. Detection and chronology of parasitic kinetoplast DNA presence in hair of experimental *Leishmania major* infected BALB/c mice by Real Time PCR. *Acta Trop.* 2013;128(3):468–72. doi: [10.1016/j.actatropica.2013.07.007](https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2013.07.007).
225. Ortega MV, Moreno I, Domínguez M, de la Cruz ML, Martín AB, Rodríguez-Bertos A, et al. Application of a specific quantitative real-time PCR (qPCR) to identify *Leishmania infantum* DNA in spleen, skin and hair samples of wild Leporidae. *Vet Parasitol.* 2017;243:92–9. doi: [10.1016/j.vetpar.2017.05.015](https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2017.05.015).
226. de Almeida Ferreira S, Leite RS, Ituassu LT, Almeida GG, Souza DM, Fujiwara RT, et al. Canine skin and conjunctival swab samples for the detection and quantification of *Leishmania infantum* DNA in an endemic urban area in Brazil. *PLoS Negl Trop Dis.* 2012;6(4):e1596. doi: [10.1371/journal.pntd.0001596](https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001596).
227. Smit PW, Elliott I, Peeling RW, Mabey D, Newton PN. An overview of the clinical use of filter paper in the diagnosis of tropical diseases. *Am J Trop Med Hyg.* 2014;90(2):195–210. doi: [10.4269/ajtmh.13-0463](https://doi.org/10.4269/ajtmh.13-0463).
228. Boggild AK, Valencia BM, Espinosa D, Veland N, Ramos AP, Arevalo J, et al. Detection and Species Identification of *Leishmania* DNA from Filter Paper Lesion impressions for patients with american cutaneous Leishmaniasis. *Clin Infect Dis.* 2010;50(1):e1–6. doi: [10.1086/648730](https://doi.org/10.1086/648730).
229. García-Cisneros S, Olamendi-Portugal ML, Herrera-Ortiz A, Conde-González CJ, López-Gatell H, Sánchez-Alemán MA. Detección de anticuerpos contra VIH a partir de muestras de sangre seca en papel filtro. *Salud Publica Mex.* 2017; 59(6):602-603. doi: [10.21149/8751](https://doi.org/10.21149/8751).
230. Miranda A, Saldaña A, González K, Paz H, Santamaría G, Samudio F, et al. Evaluation of PCR for cutaneous leishmaniasis diagnosis and species identification using filter paper samples in Panama, Central America. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2012;106(9):544–8. doi: [10.1016/j.trstmh.2012.05.005](https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2012.05.005)

BIBLIOGRAFÍA

231. Kitchen M, Marti H, Schmuth M. Cutaneous leishmaniasis: PCR of filter paper blots from an ulcer base is an alternative to biopsy. *J Dtsch Dermatol Ges.* 2018;16(6):772-774. doi: [10.1111/ddg.13537](https://doi.org/10.1111/ddg.13537).
232. Gomes CM, de Paula NA, Cesetti M V., Roselino AM, Sampaio RNR. Mucocutaneous leishmaniasis: Accuracy and molecular validation of noninvasive procedures in a L. (V.) braziliensis-endemic area. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2014;79(4):413–8. doi: [10.1016/j.diagmicrobio.2014.05.002](https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2014.05.002).
233. Camaró-Sala ML, Martínez-García R, Olmos-Martínez P, Catalá-Cuenca V, Ocete-Mochón MD, Gimeno-Cardona C. Validación y verificación analítica de los métodos microbiológicos. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2015;33(7):e31–6. doi: [10.1016/j.eimc.2013.11.010](https://doi.org/10.1016/j.eimc.2013.11.010).
234. Belinchón-Lorenzo S, Parejo JC, Iniesta V, Fernández-Cotrina J, Muñoz-Madrid R, Monroy I, et al. First detection of Leishmania kDNA in canine cerumen samples by qPCR. *Vet Parasitol.* 2016;228:65–8. doi: [10.1016/j.vetpar.2016.05.021](https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2016.05.021).
235. España. Real Decreto 1369/2000, de 19 de julio, por el que se modifica el Real Decreto 822/1993, de 28 de mayo, por el que se establecen los principios de buenas prácticas de laboratorio y su aplicación en la realización de estudios no clínicos sobre sustancias y productos químicos. *Boletón Oficial del estado. BOE-A-2000-13702.* 2000;25832-25838. Disponible en: <https://www.boe.es/eli/es/rd/2000/07/19/1369>.
236. Europa. Directiva 2004/10/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 11 de febrero de 2004, sobre la aproximación de las disposiciones legales, reglamentarias y administrativas relativas a la aplicación de los principios de buenas prácticas de laboratorio y al control de su aplicación para las pruebas sobre las sustancias químicas. *Oficina de Publicaciones de la Unión Europea.* 2004;(L 050 de 20/02/2004):0044–59. Disponible en: <https://op.europa.eu/es/publication-detail/-/publication/b78b6aee-a9b4-468e-b21e-0d5e54acbe91>.
237. Europa. Directiva 2010/63/UE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 22 de septiembre de 2010 , relativa a la protección de los animales utilizados para fines científicos. *Eur-Lex.* 2010;33–79. Disponible en: <http://data.europa.eu/eli/dir/2010/63/oj>.
238. España. LEY 14/2007, de 3 de julio, de Investigación biomédica. *Boletín Oficial del Estado. BOE-A-2007-12945.* 2007;28826 -28848 Disponible en: <https://www.boe.es/eli/es/l/2007/07/03/14>.
239. España. Real Decreto 53/2013, de 1 de febrero, por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en

BIBLIOGRAFÍA

- experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia. Boletín Oficial del Estado. BOE-A-2013-13372013. 2013;11370–1142. Disponible en: <https://www.boe.es/eli/es/rd/2013/02/01/53>.
240. Cabo-Gautier J, Nivet J. Guide de validation analytique : rapport d'une commission SFSTP - I: méthodologie. STP Pharma Pract Reglem Técnicas. 1992;2(4):205–26. Disponible en: <http://bdsp-ehesp.inist.fr/vibad/index.php?action=getRecordDetail&idt=65159>.
241. European Medicines Agency. ICH Topic Q2(R1) Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology. 1995. CPMP/ICH/381/95. Disponible en: <https://www.ema.europa.eu/en/ich-q2-r1-validation-analytical-procedures-text-methodology>.
242. European Medicines Agency. ICH Topic Q2(R1). Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology. 2005. EMEA/CHMP/EWP/192217/200. Disponible en: https://database.ich.org/sites/default/files/Q2_R1_Guideline.pdf.
243. Liaison S. General Chapters: <1225> Validation of Compendial Methods. Disponible en: http://ftp.uspbpep.com/v29240/usp29nf24s0_c1225.html.
244. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration. Administration F and D, Center for Drug Evaluation and Research. Analytical Procedures and Methods Validation for Drugs and Biologics Guidance for Industry. 2015. FDA-2015-N-0007. Disponible en: <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/analytical-procedures-and-methods-validation-drugs-and-biologics>.
245. Organización Internacional de Normalización/ Comisión Electrotécnica Internacional. ISO/IEC 17025. Requisitos Generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y de calibración. 2017. Report No.: ISO/IEC 17025:2017(ES). Disponible en: <https://www.iso.org/obp/ui/#iso:std:iso-iec:17025:ed-3:v2:es>
246. Thermo Scientific Pierce. Cell Lysis Technical Handbook. 2009. Disponible en: <http://tools.thermofisher.com/content/sfs/brochures/1601757-Cell-Lysis-Handbook.pdf>
247. Pedras MJ, de Gouvêa Viana L, de Oliveira EJ, Rabello A. Comparative evaluation of direct agglutination test, rK39 and soluble antigen ELISA and IFAT for the diagnosis of visceral leishmaniasis. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2008;102(2):172–8. doi: [10.1016/j.trstmh.2007.11.004](https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2007.11.004)
248. Applied Biosystems. Amplification Efficiency of TaqMan® Gene Expression Assays. 2006. Disponible en: https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/Application-Notes/cms_040377.pdf.

BIBLIOGRAFÍA

249. Currie LA. Limits for qualitative detection and quantitative determination. Application to radiochemistry. *Anal Chem.* 1968;40(3):586–93. doi: <https://doi.org/10.1021/ac60259a007>.
250. Halberg F. Chronobiology. *Annu Rev Physiol.* 1969;31:675–725. doi: [10.1146/annurev.ph.31.030169.003331](https://doi.org/10.1146/annurev.ph.31.030169.003331).
251. Moreno CRC. The recognition of chronobiology in science. *Sleep Sci.* 2018;11(1):1. doi: [10.5935/1984-0063.20180001](https://doi.org/10.5935/1984-0063.20180001).
252. Cox FEG. *Modern Parasitology: A Textbook of Parasitology.* 2^{ed}. Oxford.; Blackwell Science Ltd; 1993. doi: <https://doi.org/10.1002/9781444313963.index>.
253. Reece SE, Prior KF, Mideo N. The life and times of parasites: rhythms in strategies for within-host survival and between-host transmission. *J Biol Rhythms.* 2017;32(6):516–33. doi: [10.1177/0748730417718904](https://doi.org/10.1177/0748730417718904).
254. Rivas GB, De Souza NA, Peixoto AA, Bruno R V. Effects of temperature and photoperiod on daily activity rhythms of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). *Parasites and Vectors.* 2014;7(1):278. doi: [10.1186/1756-3305-7-278](https://doi.org/10.1186/1756-3305-7-278).
255. Baker JR. The biology of *Trypanosoma* and *Leishmania*, parasites of man and domestic animals. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1983;77(5):698. doi: [https://doi.org/10.1016/0035-9203\(83\)90208-0](https://doi.org/10.1016/0035-9203(83)90208-0).
256. Hosein S, Blake DP, Solano-Gallego L. Insights on adaptive and innate immunity in canine leishmaniosis. *Parasitology.* 2017 [;144(1):95–115. doi: [10.1017/S003118201600055X](https://doi.org/10.1017/S003118201600055X).
257. Schönian G. Genetics and Evolution of *Leishmania* parasites. *Infect Genet Evol.* 2017;50:93–4. doi: [10.1016/j.meegid.2017.03.016](https://doi.org/10.1016/j.meegid.2017.03.016).
258. Bourdoiseau G. *La leishmaniose canine.* Rhone Merieux. 1993.
259. Vidor E, Dereure J, Pratlong F, Dobreuil N, Bissuel O, Moroau Y, et al. Le chancre d'inoculation dans la leishmaniose canine à *Leishmania infantum*. Estudio de cohorte en región regional. *Prat Médicale Chir l'Animal Cie.* 1991;26(2):133–7.
260. Moll H. Epidermal Langerhans cells are critical for immunoregulation of cutaneous leishmaniasis. *Immunol Today.* 1993;14(8):383-7. doi: [10.1016/0167-5699\(93\)90138-B](https://doi.org/10.1016/0167-5699(93)90138-B).
261. Maurer M, Lopez Kostka S, Siebenhaar F, Moelle K, Metz M, Knop J, et al. Skin mast cells control T cell-dependent host defense in *Leishmania major* infections . 2006;20(14):2460–7. doi: [10.1096/fj.06-5860com](https://doi.org/10.1096/fj.06-5860com).
262. Jara M, Adai V, Valencia BM, Martinez D, Alba M, Castrillon C, et al. Real-time PCR assay for detection and quantification of *Leishmania* (*Viannia*) organisms in skin and mucosal lesions: Exploratory study of parasite load and clinical

BIBLIOGRAFÍA

- parameters. *J Clin Microbiol.* 2013;51(6):1826–33. doi: [10.1128/JCM.00208-13](https://doi.org/10.1128/JCM.00208-13).
263. Cairó Vilagran J, Font Grau J. Leishmaniosis canina. Aspectos clínicos. *Clínica Vet pequeños Anim.* 1991;11(2):73–81. Disponible en: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=6723684>.
264. Solano-Gallego L, Riera C, Roura X, Iniesta L, Gallego M, Valladares JE, et al. Leishmania infantum-specific IgG, IgG1 and IgG2 antibody responses in healthy and ill dogs from endemic areas. Evolution in the course of infection and after treatment. *Vet Parasitol.* 2001;96(4):265–76. doi: [10.1016/s0304-4017\(00\)00446-5](https://doi.org/10.1016/s0304-4017(00)00446-5).
265. Mettler M, Grimm F, Capelli G, Camp H, Deplazes P. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assays, an immunofluorescent- antibody test, and two rapid tests (immunochromatographic-dipstick and gel tests) for serological diagnosis of symptomatic and asymptomatic Leishmania infections in dogs. *J Clin Microbiol.* 2005;43(11):5515–9. doi: [10.1128/JCM.43.11.5515-5519.2005](https://doi.org/10.1128/JCM.43.11.5515-5519.2005).
266. Molano I, García Alonso M, Mirón C, Redondo E, Requena JM, Soto M, et al. A Leishmania infantum multi-component antigenic protein mixed with live BCG confers protection to dogs experimentally infected with L. infantum. *Vet Immunol Immunopathol.* 2003;92(1–2):1–13. doi: [10.1016/s0165-2427\(02\)00315-x](https://doi.org/10.1016/s0165-2427(02)00315-x).
267. Viñuelas J, García-Alonso M, Ferrando L, Navarrete I, Molano I, Mirón C, et al. Meningeal leishmaniosis induced by Leishmania infantum in naturally infected dogs. *Vet Parasitol.* 2001;101(1):23–7. doi: [10.1016/s0304-4017\(01\)00413-7](https://doi.org/10.1016/s0304-4017(01)00413-7).
268. Carcelén J, Iniesta V, Fernández-Cotrina J, Serrano F, Parejo JC, Corraliza I, et al. The Chimerical Multi-Component Q protein from Leishmania in the absence of adjuvant protects dogs against an experimental Leishmania infantum infection. *Vaccine.* 2009;27(43):5964–73. doi: [10.1016/j.vaccine.2009.07.069](https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2009.07.069).
269. Bettini S, Gradoni L. Canine leishmaniasis in the Mediterranean area and its implications for human leishmaniasis. *Int J Trop Insect Sci.* 1986;7(02):241–5. doi: <https://doi.org/10.1017/S1742758400009024>.
270. Martínez-Cruz S, Martínez-Moreno A, Martínez-Moreno F, Martínez-Gómez F, Hernández-Rodríguez S. Epidemiología de la leishmaniosis canina en Córdoba. *Rev Iber Parasitol.* 1990;(50):1–7.
271. Quinnell RJ, Courtenay O, Garcez LM, Kaye PM, Shaw MA, Dye C, et al. IgG subclass responses in a longitudinal study of canine visceral leishmaniasis. *Vet Immunol Immunopathol.* 2003;91(3–4):161–8. doi: [10.1016/s0165-2427\(02\)00311-2](https://doi.org/10.1016/s0165-2427(02)00311-2).
272. Berrahal F, Mary C, Roze M, Berenger A, Escoffier K, Lamouroux D, et al. Canine leishmaniasis: Identification of asymptomatic carriers by polymerase chain

BIBLIOGRAFÍA

- reaction and immunoblotting. *Am J Trop Med Hyg.* 1996;55(3):273–7. doi: [10.4269/ajtmh.1996.55.273](https://doi.org/10.4269/ajtmh.1996.55.273).
273. Soto M, Requena JM, Quijada L, Ángel SO, Gómez LC, Guzman F, et al. During active viscerocutaneous leishmaniasis the anti-P2 humoral response is specifically triggered by the parasite P proteins. *Clin Exp Immunol.* 1995;100(2):246–52. doi: [10.1111/j.1365-2249.1995.tb03661.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.1995.tb03661.x).
274. Soto M, Requena JM, Quijada L, Guzman F, Patarroyo ME, Alonso C. Identification of the *Leishmania infantum* P0 ribosomal protein epitope in canine visceral leishmaniasis. *Immunol Lett.* 1995;48(1):23–8. doi: [10.1016/0165-2478\(95\)02436-0](https://doi.org/10.1016/0165-2478(95)02436-0).
275. Soto M, Requena JM, Quijada L, García M, Guzman F, Patarroyo ME, et al. Mapping of the linear antigenic determinants from the *Leishmania infantum* histone H2A recognized by sera from dogs with leishmaniasis. *Immunol Lett.* 1995;48(3):209–14. doi: [10.1016/0165-2478\(95\)02473-5](https://doi.org/10.1016/0165-2478(95)02473-5).
276. Soto M, Requena JM, Quijada L, Gomez LC, Guzman F, Patarroyo ME, et al. Characterization of the antigenic determinants of the *Leishmania infantum* histone H3 recognized by antibodies elicited during canine visceral leishmaniasis. *Clin Exp Immunol.* 1996;106(3):454–61. doi: [10.1046/j.1365-2249.1996.d01-865.x](https://doi.org/10.1046/j.1365-2249.1996.d01-865.x).
277. Quijada L, Requena JM, Soto M, Gómez LC, Guzman F, Patarroyo ME, et al. Mapping of the linear antigenic determinants of the *Leishmania infantum* Hsp70 recognized by leishmaniasis sera. *Immunol Lett.* 1996;52(2–3):73–9. doi: [10.1016/0165-2478\(96\)02585-0](https://doi.org/10.1016/0165-2478(96)02585-0).
278. Angel SO, Requena JM, Soto M, Criado D, Alonso C. During canine leishmaniasis a protein belonging to the 83-kDa heat-shock protein family elicits a strong humoral response. *Acta Trop.* 1996;62(1):45–56. doi: [10.1016/s0001-706x\(96\)00020-4](https://doi.org/10.1016/s0001-706x(96)00020-4).
279. Berberich C, Requena JM, Alonso C. Cloning of genes and expression and antigenicity analysis of the *Leishmania infantum* KMP-11 protein. *Exp Parasitol.* 1997;85(1):105–8. doi: [10.1006/expr.1996.4120](https://doi.org/10.1006/expr.1996.4120).
280. Sacks D, Noben-Trauth N. The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. *Nat Rev Immunol.* 2002;2(11):845–58. doi: [10.1038/nri933](https://doi.org/10.1038/nri933).
281. Mancianti F, Gramiccia M, Gradoni L, Pieri S. Studies on canine leishmaniasis control. 1. Evolution of infection of different clinical forms of canine leishmaniasis following antimonial treatment. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1988;82(4):566–7. doi: [10.1016/0035-9203\(88\)90510-x](https://doi.org/10.1016/0035-9203(88)90510-x).

BIBLIOGRAFÍA

282. Riera C, Valladares JE, Gállego M, Aisa MJ, Castillejo S, Fisa R, et al. Serological and parasitological follow-up in dogs experimentally infected with *Leishmania infantum* and treated with meglumine antimoniate. *Vet Parasitol.* 1999;84(1–2):33–47. doi: [10.1016/s0304-4017\(99\)00084-9](https://doi.org/10.1016/s0304-4017(99)00084-9).
283. Moriearty PL, Grimaldi G, Galvão-Castro B, de Oliveira Neto MP, Marzochi MC. Intralesional plasma cells and serological responses in human cutaneous leishmaniasis. *Clin Exp Immunol.* 1982;47(1):59–64. PMID: 7047025; PMCID: PMC1536351.
284. Ridley MJ, Ridley DS. Cutaneous leishmaniasis: immune complex formation and necrosis in the acute phase. *Br J Exp Pathol.* 1984;65(3):327–36. PMID: 6378241; PMCID: PMC2040980.
285. Ray R, Ghose AC. Elisa titres to polysaccharide antigens of *leishmania donovani* promastigotes in kala-azar. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1986;80(6):998. doi: [10.1016/0035-9203\(86\)90292-0](https://doi.org/10.1016/0035-9203(86)90292-0).
286. Martins VT, Chávez-Fumagalli MA, Costa LE, Canavaci AMC, Lage PS, Lage DP, et al. Correction: Antigenicity and Protective Efficacy of a *Leishmania* Amastigote-specific Protein, Member of the Super-oxygenase Family, against Visceral Leishmaniasis. *PLoS Negl Trop Dis.* 2013;7(4). doi: [10.1371/annotation/427655ac-c278-41f5-95ca-6279c562752f](https://doi.org/10.1371/annotation/427655ac-c278-41f5-95ca-6279c562752f).
287. Martins VT, Chávez-Fumagalli MA, Lage DP, Duarte MC, Garde E, Costa LE, et al. Antigenicity, immunogenicity and protective efficacy of three proteins expressed in the promastigote and amastigote stages of *leishmania infantum* against visceral leishmaniasis. *PLoS One.* 2015;10(9). doi: [10.1371/journal.pone.0137683](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0137683).
288. Moreno J. Assessment of vaccine-induced immunity against canine visceral leishmaniasis. *Front Vet Sci.* 2019 Jun 4;6:168. doi: [10.3389/fvets.2019.00168](https://doi.org/10.3389/fvets.2019.00168).
289. De Oliveira Mendes C, Paraguai De Souza E, Borja-Cabrera GP, Melo Batista LM, Aparecida Dos Santos M, Parra LE, et al. IgG1/IgG2 antibody dichotomy in sera of vaccinated or naturally infected dogs with visceral leishmaniosis. *Vaccine.* 2003;21(19–20):2589–97. doi: [10.1016/s0264-410x\(03\)00046-x](https://doi.org/10.1016/s0264-410x(03)00046-x).
290. Kurey I, Kobets T, Havelková H, Slapničková M, Quan L, Trtková K, et al. Distinct genetic control of parasite elimination, dissemination, and disease after *Leishmania major* infection. *Immunogenetics.* 2009;61(9):619–33. doi: [10.1007/s00251-009-0392-9](https://doi.org/10.1007/s00251-009-0392-9).
291. Parody N, Soto M, Requena JM, Alonso C. Adjuvant guided polarization of the immune humoral response against a protective multicomponent antigenic protein (Q) from *Leishmania infantum*. A CpG + Q mix protects Balb/c mice from

BIBLIOGRAFÍA

- infection. *Parasite Immunol.* 2004;26(6–7):283–93. doi: [10.1111/j.0141-9838.2004.00711.x](https://doi.org/10.1111/j.0141-9838.2004.00711.x).
292. Iborra S, Soto M, Carrión J, Nieto A, Fernández E, Alonso C, et al. The *Leishmania infantum* acidic ribosomal protein P0 administered as a DNA vaccine confers protective immunity to *Leishmania major* infection in BALB/c mice. *Infect Immun.* 2003;71(11):6562–72. doi: [10.1128/iai.71.11.6562-6572.2003](https://doi.org/10.1128/iai.71.11.6562-6572.2003).
293. Nicolle C, Cassuto E. Sur trois cas d'infection splénique infantile à corps de *Leishman* observés en Tunisie. *Arch Inst Pasteur Tunis*, editor. 1908. 1–26. Disponible en: <https://ccfr.bnf.fr/portailccfr/ark:/06871/00111109150>.
294. Wright JH. Protozoa in a Case of Tropical Ulcer (“Delhi Sore”). *J Med Res.* 1903;10(3):472-482.7. PMID: 19971589; PMCID: PMC2105980.
295. Vianna G. Sobre uma nova especie de *Leishmania* (Nota Preliminar). *Bras Med.* 1911;25:411.
296. Mathis A, Deplazes P. PCR and in vitro cultivation for detection of *Leishmania* spp. in diagnostic samples from humans and dogs. *J Clin Microbiol.* 1995;33(5):1145–9. doi: [10.1128/JCM.33.5.1145-1149.1995](https://doi.org/10.1128/JCM.33.5.1145-1149.1995).
297. Reale S, Maxia L, Vitale F, Glorioso NS, Caracappa S, Vesco G. Detection of *Leishmania infantum* in dogs by PCR with lymph node aspirates and blood. *J Clin Microbiol.* 1999;37(9):2931–5. doi: [10.1128/JCM.37.9.2931-2935.1999](https://doi.org/10.1128/JCM.37.9.2931-2935.1999).
298. Rodríguez-Cortés A, Ojeda A, López-Fuertes L, Timón M, Altet L, Solano-Gallego L, et al. A long term experimental study of canine visceral leishmaniasis. *Int J Parasitol.* 2007;37(6):683–93. doi: [10.1016/j.ijpara.2006.11.007](https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2006.11.007).
299. Nwakanma DC, Gomez-Escobar N, Walther M, Crozier S, Dubovsky F, Malkin E, et al. Quantitative Detection of *Plasmodium falciparum* DNA in Saliva, Blood, and Urine. *J Infect Dis.* 2009;199(11):1567–74. doi: [10.1086/598856](https://doi.org/10.1086/598856).
300. Leite RS, Ferreira S de A, Ituassu LT, de Melo MN, de Andrade ASR. PCR diagnosis of visceral leishmaniasis in asymptomatic dogs using conjunctival swab samples. *Vet Parasitol.* 2010;170(3–4):201–6. doi: [10.1016/j.vetpar.2010.02.020](https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.02.020).
301. Belinchón-Lorenzo S, Muñoz-Madrid R, Grano FG, Iniesta V, Fernández-Cotrina J, Parejo JC, et al. Application of qPCR method to hair and cerumen samples for the diagnosis of canine leishmaniosis in Araçatuba, Brazil. *Vet Parasitol Reg Stud Reports.* 2019;15. doi: [10.1016/j.vprsr.2019.100267](https://doi.org/10.1016/j.vprsr.2019.100267).
302. Belinchón-Lorenzo S, Gómez-Luque A, Monroy I, Baz V, Iniesta V, Muñoz-Madrid R, et al. Multileish-5d: un novedoso sistema multidiagnóstico fiable de la leishmaniosis canina con valor pronóstico. *Argos Inf Vet.* 2020;(218):58–61. Disponible en: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=7412455>.

BIBLIOGRAFÍA

303. Selder R, Weber K, Bergmann M, Geisweid K, Hartmann K. Sensitivity and specificity of an in-clinic point-of-care PCR test for the diagnosis of canine leishmaniasis. *Vet J.* 2018;232:46–51. doi: [10.1016/j.tvjl.2017.12.006](https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2017.12.006).
304. Solano-Gallego L, Morell P, Arboix M, Alberola J, Ferrer AL. Prevalence of *Leishmania infantum* Infection in Dogs Living in an Area of Canine Leishmaniasis Endemicity Using PCR on Several Tissues and Serology. *J Clin Microbiol.* 2001;39(2):560–3. doi: [10.1128/JCM.39.2.560-563.2001](https://doi.org/10.1128/JCM.39.2.560-563.2001).
305. Chuong CM, Nickoloff BJ, Elias PM, Goldsmith LA, Macher E, Maderson PA, et al. What is the “true” function of skin? Vol. 11, *Experimental Dermatology*. 2002. p. 159–60. doi: [10.1034/j.1600-0625.2002.00112.x](https://doi.org/10.1034/j.1600-0625.2002.00112.x).
306. Elias PM. The skin barrier as an innate immune element. *Semin Immunopathol.* 2007 Apr;29(1):3-14. doi: [10.1007/s00281-007-0060-9](https://doi.org/10.1007/s00281-007-0060-9).
307. Patra RC, Swarup D, Naresh R, Kumar P, Nandi D, Shekhar P, et al. Tail hair as an indicator of environmental exposure of cows to lead and cadmium in different industrial areas. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2007;66(1):127–31. doi: [10.1016/j.ecoenv.2006.01.005](https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2006.01.005).
308. Rendón-Lugo AN, Santiago P, Puente-Lee I, León-Paniagua L. Permeability of hair to cadmium, copper and lead in five species of terrestrial mammals and implications in biomonitoring. *Environ Monit Assess.* 2017;189(12). doi: [10.1007/s10661-017-6338-z](https://doi.org/10.1007/s10661-017-6338-z).
309. Agusa T, Kunito T, Iwata H, Monirith I, Tana TS, Subramanian A, et al. Mercury contamination in human hair and fish from Cambodia: Levels, specific accumulation and risk assessment. *Environ Pollut.* 2005;134(1):79–86. doi: [10.1016/j.envpol.2004.07.015](https://doi.org/10.1016/j.envpol.2004.07.015).
310. Li P, Guo S, Zhao J, Gao Y, Li YF. Human Biological Monitoring of Mercury Through Hair Samples in China. *Bull Environ Contam Toxicol.* 2019 doi: [10.1007/s00128-019-02563-8](https://doi.org/10.1007/s00128-019-02563-8).
311. Mahmoudi N, Jonidi Jafari A, Moradi Y, Esrafil A. The mercury level in hair and breast milk of lactating mothers in Iran: a systematic review and meta-analysis. *J Environ Heal Sci Eng.* 2020; doi: [10.1007/s40201-020-00460-5](https://doi.org/10.1007/s40201-020-00460-5).
312. Wasserman S, Huo S, Ky K, Malig YN, Esmail A, Dheda K, et al. Correlation of linezolid hair concentrations with plasma exposure in patients with drug-resistant tuberculosis. *Antimicrob Agents Chemother.* 2020;64(3):e02145-19. doi: [10.1128/AAC.02145-19](https://doi.org/10.1128/AAC.02145-19).
313. Cuyppers E, Flanagan RJ. The interpretation of hair analysis for drugs and drug metabolites. *Clin Toxicol (Phila).* 2018;56(2):90-100. doi: [10.1080/15563650.2017.1379603](https://doi.org/10.1080/15563650.2017.1379603).

BIBLIOGRAFÍA

314. Burgueño MJ, Sánchez S, Castro MÁ, Mateos-Campos R. [High-risk drug use: epidemiological pattern through hair testing in the forensic context]. *Rev Esp Salud Publica*. 2019;93. PMID: 31767827.
315. Wang X, Johansen SS, Nielsen MKK, Linnet K. Targeted analysis of 116 drugs in hair by UHPLC-MS/MS and its application to forensic cases. *Drug Test Anal*. 2017;9(8):1137–51. doi: [10.1002/dta.2130](https://doi.org/10.1002/dta.2130).
316. Wang X, Zhuo Y, Tang X, Qiang H, Liu W, Wu H, et al. Segmental analysis of antidepressant and antipsychotic drugs in the hair of schizophrenic patients. *Drug Test Anal*. 2020;12(4):472–84. doi: [10.1002/dta.2754](https://doi.org/10.1002/dta.2754).
317. Henderson GL. Mechanisms of drug incorporation into hair. *Forensic Sci Int*. 1993;63(1–3):19–29. doi: [10.1016/0379-0738\(93\)90256-a](https://doi.org/10.1016/0379-0738(93)90256-a).
318. Azadeh B, Abdulla F. Transepithelial elimination in cutaneous leishmaniasis. *Acta Derm Venereol*. 1995;75(2):159. doi: [10.2340/0001555575159](https://doi.org/10.2340/0001555575159).
319. Perrin C, Taillan B, Hofman P, Mondain V, Lefichoux Y, Michiels JF. Atypical cutaneous histological features of visceral leishmaniasis in acquired immunodeficiency syndrome. *Am J Dermatopathol*. 1995;17(2):145–50. doi: [10.1097/00000372-199504000-00006](https://doi.org/10.1097/00000372-199504000-00006).
320. Karram S, Loya A, Hamam H, Habib RH, Khalifeh I. Transepidermal elimination in cutaneous leishmaniasis: A multiregional study. *J Cutan Pathol*. 2012;39(4):406–12. doi: [10.1111/j.1600-0560.2012.01890.x](https://doi.org/10.1111/j.1600-0560.2012.01890.x).
321. Stolker AAM, Zuidema T, Nielen MWF, Nielen MWF. Residue analysis of veterinary drugs and growth-promoting agents. *TrAC - Trends Anal Chem*. 2007;26(10):967–79. doi: <https://doi.org/10.1016/j.trac.2007.09.008>
322. de Sousa Gonçalves R, Franke CR, Magalhães-Junior JT, Souza BMPS, Solcà MS, Larangeira DF, et al. Association between *Leishmania infantum* DNA in the hair of dogs and their infectiousness to *Lutzomyia longipalpis*. *Vet Parasitol*. 2016;232:43–7. doi: [10.1016/j.vetpar.2016.11.010](https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2016.11.010).
323. Parizad EG, Khosravi A, Parizad EG, Sadeghifard N, Ghafourian S. Evaluation of Chronic Hepatitis B Infection in Patients with Seronegative HbsAg. *Iran J Public Health*. 2012;41(2):100–4. PMID: 23113141; PMCID: PMC3481680.
324. Krishnan U, Hee SSQ. Ear wax: A new biological monitoring medium for metals? *Bull Environ Contam Toxicol*. 1992;48(4):481–6. doi: [10.1007/BF00199061](https://doi.org/10.1007/BF00199061).
325. Espinel ML, Martín-Jaramillo JA, Meléndez-Guerrero B, Vázquez-Navarrete S. Leishmaniasis con fenómeno de eliminación transepidérmica. Descripción de dos casos en pacientes con sida. *Actas Dermosifiliogr*. 2004;95(6):390–3. doi: [https://doi.org/10.1016/S0001-7310\(04\)76841-6](https://doi.org/10.1016/S0001-7310(04)76841-6).
326. Cole LK. Anatomy and physiology of the canine ear. *Vet Dermatol*. 2009;20(5–

BIBLIOGRAFÍA

- 6):412–21. doi: [10.1111/j.1365-3164.2010.00885.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-3164.2010.00885.x).
327. Stevens-Sparks CK. Anatomical studies of canine vascular and ligamentous ear structures with relevance to acute-onset deafness. 2012. Disponible en: https://digitalcommons.lsu.edu/gradschool_dissertations/1397/.
328. Hernández L, Montoya A, Checa R, Dado D, Gálvez R, Otranto D, et al. Course of experimental infection of canine leishmaniasis: Follow-up and utility of noninvasive diagnostic techniques. *Vet Parasitol.* 2015;207(1–2):149–55. doi: [10.1016/j.vetpar.2014.10.035](https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.10.035).
329. Gomes AHS, Ferreira IMR, Lima MLSR, Cunha EA, Garcia AS, Araújo MFL, et al. PCR identification of *Leishmania* in diagnosis and control of canine leishmaniasis. *Vet Parasitol.* 2007;144(3–4):234–41. doi: [10.1016/j.vetpar.2006.10.008](https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.10.008).
330. de Andrade ASR, Melo MN. Non-Invasive Molecular Diagnosis of Canine Visceral Leishmaniasis Using Conjunctival Swab Samples. In: *Leishmaniasis - Trends in Epidemiology, Diagnosis and Treatment*. InTech; 2014. doi: 10.5772/57304.
331. Oliva G, Scalone A, Foglia Manzillo V, Gramiccia M, Pagano A, Di Muccio T, et al. Incidence and time course of *Leishmania infantum* infections examined by parasitological, serologic, and nested-PCR techniques in a cohort of naive dogs exposed to three consecutive transmission seasons. *J Clin Microbiol.* 2006;44(4):1318–22. doi: [10.1128/JCM.44.4.1318-1322.2006](https://doi.org/10.1128/JCM.44.4.1318-1322.2006).
332. Ramírez L, Iborra S, Cortés J, Bonay P, Alonso C, Barral-Netto M, et al. BALB/c mice vaccinated with *Leishmania major* ribosomal proteins extracts combined with CpG oligodeoxynucleotides become resistant to disease caused by a secondary parasite challenge. *J Biomed Biotechnol.* 2010; 2010:181690. doi: [10.1155/2010/181690](https://doi.org/10.1155/2010/181690).
333. Iniesta Orozco V, Monroy Perez I, Fernández Cotrina J, Baz Agudo V, Belinchón Lorenzo S, Muñoz Madrid R, et al. LeishmanCeres Diagnostics MultiLeish5D Sistema de diagnóstico múltiple para detección y seguimiento de perros infectados por *Leishmania infantum*. Cáceres; 2019. Disponible en: <https://multileish.es/>.
334. Proverbio D, Spada E, Bagnagatti De Giorgi G, Perego R, Valena E. Relationship between *Leishmania* IFAT titer and clinicopathological manifestations (clinical score) in dogs. *Biomed Res Int.* 2014;2014. doi: [10.1155/2014/412808](https://doi.org/10.1155/2014/412808).

