

LEISHMANIASIS

RESUMEN

Definición de la enfermedad: La leishmaniasis no es una entidad única, sino que comprende varios síndromes debidos fundamentalmente a por lo menos 16 especies de *Leishmania* que afectan a seres humanos, y se transmiten por flebótomos de los géneros *Phlebotomus* y *Lutzomyia*. La leishmaniasis se asocia a la distribución geográfica de sus vectores flebótomos y está limitada por la misma. Se han clasificado quince entidades nosogeográficas en todo el mundo, de las cuales 13 tienen un perfil zoonótico conocido o posible. Durante los últimos años, el número de regiones que se están convirtiendo en endémicas de *Leishmania* ha aumentado considerablemente, y ha aumentado también el número de casos en animales y en seres humanos.

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

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

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

Pruebas de inmunidad celular: La prueba cutánea de la leishmanina (LST) es útil para determinar la distribución de las infecciones humanas, y sirve para distinguir los casos inmunes de los no inmunes. La prueba es positiva en LC, LMC y LV curada, pero es negativa en la LV activa. No es útil para el diagnóstico de la LCan. Pruebas recientes de detección de citocinas secretadas por los leucocitos en respuesta a una estimulación con antígeno de *Leishmania* han mostrado menor sensibilidad en animales con LC curados que la LST.

Requisitos para las vacunas y el material de diagnóstico: No hay en la actualidad ninguna vacuna eficaz disponible en todo el mundo para su uso en el hombre y en los perros. Se están

evaluando varias vacunas para animales, y tres se han autorizado para su uso en el perro (dos en Brasil y una en Europa). Además de otros problemas por resolver, el uso de estas vacunas está suponiendo retos actuales y futuros en los ámbitos del diagnóstico, la epidemiología y la vigilancia del parásito, sobre todo en países en los que el parásito no existe. La leishmanina ya no está disponible en ninguna parte del mundo y carece de estandarización.

A. INTRODUCCIÓN

Definición de la enfermedad: La leishmaniasis comprende gran variedad de síndromes causados por parásitos protozoarios del género *Leishmania* (orden Kinetoplastida, familia Tripanosomatidae), que se transmiten a hospedadores mamíferos mediante la picadura de flebotomos de los géneros *Phlebotomus* (Viejo Mundo)¹ y *Lutzomyia* (Nuevo Mundo). La enfermedad deriva de la multiplicación de los amastigotos en los macrófagos del sistema reticuloendotelial. Los linfocitos T y las citocinas desempeñan un papel crucial en el hecho de que la infección evolucione a un estado inmunitario protector o bien a una enfermedad progresiva y manifiesta. En modelos murinos consanguíneos, intervienen dos subgrupos distintos de células T ayudantes (Th), denominadas Th1 y Th2, que difieren en cuanto al tipo de citocinas secretadas por una activación polarizada; la respuesta Th1 confiere protección, mientras que la respuesta Th2 hace al hospedador más susceptible a la infección. No obstante, en humanos y perros con infecciones clínicamente manifiestas, lo habitual es que las respuestas Th1 y Th2 no estén polarizadas, puesto que se detectan tanto citocinas activadoras (por ejemplo, interferón gama o interleucina 12) como supresoras (como interleucina 10, interleucina 13, interleucina 4 o TGF beta) (Murray *et al.*, 2005).

Agente patógeno causal: Dieciséis especies de *Leishmania* conocidas son agentes causales de leishmaniasis humanas. En el Nuevo Mundo, las formas tegumentarias están causadas por *L. braziliensis*, *L. guyanensis*, *L. panamenis*, *L. shawi*, *L. naiffi*, *L. lainsoni*, *L. lindenbergi*, *L. peruviana*, *L. mexicana*, *L. venezuelensis* y *L. amazonensis*; las formas viscerales y, con menor frecuencia, cutáneas, están causadas por *L. infantum*. En el Viejo Mundo, las formas cutáneas están causadas por *L. tropica*, *L. major* y *L. aethiopica*; las formas viscerales y, con menor frecuencia, cutáneas, están causadas por *L. infantum* y *L. donovani*. Mediante genotipificación se ha observado que *Leishmania infantum* y *L. chagasi* son idénticas, y deben considerarse sinónimos (Kuhls *et al.*, 2011). Por otra parte, todavía está en debate la posición taxonómica de otras especies de *Leishmania* causantes de formas tegumentarias (*L. killicki* en el Viejo Mundo; *L. pifanoi*, *L. garnhami* y *L. colombiensis* en el Nuevo Mundo). Otras especies de *Leishmania* no patógenas para el ser humano son parásitos de roedores en el Nuevo y el Viejo Mundo, y una es el agente causal de leishmaniasis cutánea en el canguro rojo de Australia (Dougall *et al.*, 2011). Los perros resultan infectados principalmente por *L. infantum*, pero en algunos casos se han aislado de este hospedador parásitos de las especies *L. braziliensis*, *L. peruviana* y *L. tropica* (Mohebbi *et al.*, 2005; Reithinger & Davies, 2002).

Descripción de la enfermedad: Se han descrito varias formas de signos clínicos de la leishmaniasis humana que se han dividido en tres entidades clínicas: leishmaniasis visceral (LV, kala azar), leishmaniasis cutánea (LC localizada, difusa o diseminada, llaga de oriente, uta, pian bois, úlcera de chiclero) y leishmaniasis mucocutánea (LMC, espundia) (Organización Mundial de la Salud [OMS], 2010). Las enfermedades son principalmente zoonosis, con dos excepciones que son la LC debida a *L. tropica* en las áreas urbanas de Oriente Medio y la LV debida a *L. donovani* en el subcontinente indio (norte de la India, Nepal y Bangladesh) y en ciertas partes de África oriental (por ejemplo, Sudán y Etiopía). La leishmaniasis canina (LCan) es una enfermedad crónica viscerocutánea causada por *L. infantum*, en la que el perro actúa como reservorio. Los perros asintomáticos resistentes pueden constituir más del 50% de la población canina infectada. Los signos externos característicos registrados en perros susceptibles que evolucionan a una enfermedad totalmente desarrollada son un aumento de tamaño de los ganglios linfáticos, pérdida de peso, dermatitis exfoliativa, alopecia, úlceras y alteraciones oculares. Recientemente, la leishmaniasis felina ha emergido en algunas zonas con características clínicas que se parecen a las de las formas tegumentarias, y con menor frecuencia a las de las sistémicas (Gramiccia, 2011). Se han observado casos tegumentarios esporádicos en équidos y ganado vacuno.

Riesgo zoonótico y requisitos de bioseguridad: El contacto directo con hospedadores infectados o la manipulación de muestras biológicas y cultivos de parásitos obtenidos de dichos hospedadores no requieren precauciones especiales debido a que las infecciones se transmiten por flebotomos y a la ausencia de formas de resistencia en el medio ambiente. *Leishmania sp.* se clasifica en el Grupo 2 de Riesgo para la infección humana y debe manipularse aplicando las medidas correspondientes descritas en el Capítulo 1.1.4 *Bioseguridad y bioprotección: norma para la gestión del riesgo biológico en el laboratorio veterinario y en las instalaciones de los animales*. Las medidas de biocontención deben determinarse en función de un análisis del riesgo, según se describe en el Capítulo 1.1.4.

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

Diagnóstico diferencial: En el ser humano, el diagnóstico diferencial de la LV depende del patrón local de enfermedades de las zonas endémicas. En muchas de estas zonas, dicho patrón incluye malaria crónica, histoplasmosis diseminada, esquistosomiasis hepatoesplénica, fiebre tifoidea, brucelosis, tuberculosis, endocarditis, fiebre recidivante y tripanosomiasis africana. Otras enfermedades cosmopolitas son la sífilis, los linfomas, la leucemia mieloide crónica, la sarcoidosis, la histiocitosis maligna y la cirrosis hepática. En el caso de la LC, el diagnóstico diferencial incluye picaduras de insectos, miasis furuncular, úlceras tropicales bacterianas, queloides, lupus *vulgaris*, lupus eritematoso discoide y sarcoidosis. En el perro, los signos de leishmaniasis más frecuentes pueden confundirse con la erliquiosis, la babesiosis y helmintiasis transmitidas por vectores o intestinales.

B. TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO

Las técnicas de diagnóstico de la leishmaniasis se detallan a continuación. La lista e idoneidad de cada prueba para los fines propuestos se indican en la Tabla 1.

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

Método	Propósito					
	Demostrar ausencia de infección en la población	Demostrar ausencia de infección en animales individuales antes de los desplazamientos	Contribuir a las políticas de erradicación	Confirmar casos clínicos	Determinar la prevalencia de la infección – vigilancia	Determinar el estado inmunitario en animales o poblaciones tras la vacunación
Identificación del agente²						
Microscopía	–	–	n/a	++	–	n/a
Cultivo <i>in-vitro</i>	–	+		++	–	
PCR	++	+++		++	++	
Detección de la respuesta inmunitaria						
IFA	++	++	n/a	++	+++	n/a
ELISA	+++	++		++	+++	
Prueba de aglutinación directa	++	++		++	++	
Inmunocromatografía rápida	–	–		++	+	
Pruebas de inmunidad celular	+	–		–	++	

Clave: +++ = método recomendado; ++ = método idóneo; + = puede utilizarse en algunas situaciones, pero el coste, la fiabilidad y otros factores limitan mucho su aplicación; – = no adecuado para este propósito; n/a= no aplicable porque actualmente los propósitos en cuestión no son relevantes para la leishmaniasis animal.

Aunque no todas las pruebas clasificadas como +++ o ++ han sido validadas formalmente, su uso sistemático y hecho de que se hayan utilizado ampliamente sin resultados dudosos las hace aceptables

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

1. Identificación del agente

Los métodos de rutina disponibles para el diagnóstico de la leishmaniasis son el examen clínico de los casos sospechosos, el diagnóstico parasitológico y el inmunodiagnóstico. Sin embargo, la observación del parásito es el único medio para confirmar la enfermedad de modo concluyente. En la LV y la LCan se recomienda el

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

aislamiento e identificación del parásito de las biopsias (ganglios linfáticos, médula ósea, y biopsia del bazo) junto con pruebas moleculares y de inmunodiagnóstico. Para la confirmación de LC (mediante el raspado de las lesiones o aspiración con aguja del borde de la lesión), es necesario el diagnóstico parasitológico, ya que ni el examen clínico ni la serología resultan adecuados. Los frotis de las biopsias se tiñen con tinción de Giemsa y se examinan al microscopio a $\times 600$ - 1.000 aumentos para comprobar si contienen amastigotos. El material también debe cultivarse en medios apropiados a 22 – 26°C para la observación microscópica de los amastigotos, que morfológicamente son idénticos a las fases de desarrollo observadas en flebótomos infectados.

1.1. Amastigotos en seres humanos y hospedadores mamíferos

1.1.1. Características morfológicas

Amastigoto: pequeño cuerpo intracelular redondeado u oval, de $1,5$ - $3 \times 2,5$ - $6,5 \mu\text{m}$, localizado en las vacuolas del citoplasma de los macrófagos. No existen flagelos libres. El microorganismo tiene un núcleo relativamente grande y un quinetooplasto que consiste en un cuerpo alargado y un cuerpo basal puntual.

1.2. Promastigotos en flebótomos y en cultivos

1.2.1. Características morfológicas

Promastigoto: microorganismo extracelular alargado, de 15 – $20 \times 1,5$ - $3,5 \mu\text{m}$ con un único flagelo de 15 – $28 \mu\text{m}$ de longitud, que sale de las proximidades del quinetooplasto en la parte anterior. El núcleo se sitúa centralmente.

La elección de los métodos de aislamiento y de cultivo dependerá de las circunstancias inmediatas y de la capacidad técnica y la experiencia del personal de laboratorio (OMS, 2010). El aislamiento *in vitro* presenta ciertas ventajas respecto a los métodos *in vivo*: los cultivos son positivos más rápidamente (5-30 días en comparación con los meses que tardan las lesiones en aparecer en un animal) y los materiales son menos costosos. Sin embargo, para el aislamiento *in vitro*, las técnicas utilizadas deben llevarse a cabo en condiciones estériles estrictas; por tanto, no siempre son fácilmente realizables en condiciones de campo. Por desgracia, no existe todavía un medio de cultivo “universal” en que crezcan con facilidad todas las leishmanias y es casi imposible predecir qué medio será el más apropiado para el crecimiento de una cepa particular de *Leishmania*. Cada laboratorio tiene que encontrar el medio más adecuado entre los medios bifásicos de agar sangre y los medios de cultivo de tejidos suplementados con suero fetal bovino (Evans, 1987). Cuando se intenta el aislamiento primario de microorganismos desconocidos, se debe utilizar un medio con agar sangre – con preferencia el medio NNN (Novy, McNeil y Nicolle) o, en su defecto, el medio sólido de infusión de cerebro y corazón (BHI) o el medio EMTM (medio de Tobie modificado por Evans). En el apartado B.1.3, a continuación, se describen varios medios adecuados para el cultivo en masa de las cepas conocidas, (véase Evans, 1987 para la composición de los medios). Los microorganismos de los pacientes con LC y LMC crónica pueden ser muy difíciles de cultivar. A veces, incluso cuando el aislamiento inicial tiene éxito, los parásitos pueden morir cuando se subcultivan. Esto parece especialmente frecuente cuando el aislamiento inicial se hace en un medio rico. A menudo esto se puede superar si los subcultivos se realizan en medios nutritivos menos ricos, como el NNN, o uno de los medios semisólidos, como el “Evans mojado” o el agar sangre semisólido de Locke.

Dado que a lo largo de las últimas décadas se han desarrollado varios métodos alternativos, el aislamiento *in vivo* de *Leishmania* en animales susceptibles (como el hámster sirio *Mesocricetus auratus* o ratones BALB/c) ya no se recomienda para el diagnóstico de rutina.

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

1.3. Caracterización de isoenzimas

La caracterización de isoenzimas, también conocida como electroforesis de enzimas multigénicas, es el método de referencia para la identificación de las especies (Rioux *et al.*, 1990; OMS, 2010), aunque esta técnica requiere cultivar un gran número de parásitos (5×10^9 – 1×10^{10}). Los principios de la electroforesis de enzimas son los siguientes: se extraen los enzimas solubles de los microorganismos cultivados en medio para cultivo en masa (medio BHI, medio MEM/FCS/EBLB [medio mínimo esencial/suero fetal bovino/caldo de Evans con sangre lisada], medio *Drosophila* de Schneider). Se coloca después una pequeña cantidad del extracto en una sustancia inerte de soporte, la matriz, que contiene un tampón a un pH determinado. Generalmente, la matriz es un gel de almidón, pero puede ser también acetato de celulosa absorbente, acrilamida o agarosa. Normalmente se escoge el pH del tampón de la matriz de modo que los isoenzimas estén cargados negativamente. A través de la matriz se pasa una corriente directa llevada por los iones del tampón. Cuando se completa la electroforesis,

la mayoría de las proteínas se habrán desplazado hacia el ánodo en la matriz, dependiendo de la carga negativa. Si se tiñen en esta fase con un colorante general de proteínas, se aprecian muchas bandas. No obstante, la elevada especificidad de los enzimas como substrato y como cofactor hace posible teñir solo estas proteínas. Por tanto, se puede comparar la movilidad electroforética de un enzima particular en varios microorganismos. La matriz con el conjunto de las bandas de isoenzimas teñidas se denomina zimograma. Por lo general, para ayudar a la interpretación de los resultados, se incluyen en el gel uno o más extractos de microorganismos de referencia, cuyo modelo de bandas de enzimas está bien documentado. La mayoría de los enzimas utilizados para fines de caracterización se tiñen por métodos que incorporan una reacción de deshidrogenación. Se deben examinar por lo menos 12 enzimas; los microorganismos con zimogramas idénticos se consideran como zimodemos de una especie determinada.

1.4. Métodos basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Se utilizan los métodos basados en la PCR para diagnosticar y/o identificar *Leishmania* en diferentes tipos de muestras procedentes de humanos o animales. En esencia, las técnicas desarrolladas para identificar cepas conocidas de *Leishmania* o para detectar los microorganismos en biopsias tisulares recientes congeladas, fijadas con formol e incluidas en parafina, comprenden: (a) la digestión del material con proteinasa K y extracción de ADN. Estos pasos pueden realizarse utilizando protocolos y reactivos internos o bien kits comerciales, de los cuales existe gran variedad; (b) la amplificación por PCR estándar utilizando secuencias oligonucleotídicas (cebadores) seleccionadas del gen del ARNr de la subunidad pequeña (Mathis & Deplazes, 1995), minicírculos del ADN del quinetooplasto (Maarten *et al.*, 1992) u otras secuencias altamente repetitivas del ADN genómico (Bulle *et al.*, 2002; Piarroux *et al.*, 1993); (c) el análisis de los productos de amplificación en geles de agarosa al 1–2%.

Con fines de diagnóstico, se puede realizar una PCR anidada o semianidada utilizando cebadores internos de las secuencias anteriores para aumentar la sensibilidad (Cruz *et al.*, 2002). En la LV aguda humana, la PCR tiene una sensibilidad comparable a la de los métodos de cultivo, pero suministra resultados mucho más deprisa. Por otra parte, en las formas de LV humana subclínica o leve, y en los pacientes inmunosuprimidos, la PCR resulta más sensible que cualquier otra técnica parasitológica directa o serológica. En la LCan, la eficacia diagnóstica de la PCR en comparación con la serología depende del curso natural de la enfermedad, siendo la sensibilidad mayor poco después de la infección (Oliva *et al.*, 2006; Quinnell *et al.*, 2001). En los perros se han probado muestras menos invasivas, como hisopos conjuntivales, y han dado buenos resultados (Di Muccio *et al.*, 2012). En la LC y LMC humana americana, la PCR parece ser más sensible que cualquier otro método de diagnóstico recomendado previamente (De Bruijn *et al.*, 1993). También se han descrito métodos de PCR en tiempo real que permiten el análisis continuo de la acumulación de los productos de la PCR durante la amplificación, y el equipo específico está comercializado. Pueden ser más sensibles que la PCR convencional, y están principalmente orientados al estudio de la cinética de la infección y al seguimiento de la respuesta terapéutica (Bell & Ranford-Cartwright, 2002; Bossolasco *et al.*, 2003; Reithinger & Dujardin, 2007). Además, se ha descrito que la PCR en tiempo real es útil para evaluar las infecciones en muestras menos invasivas, como la sangre periférica (Francino *et al.*, 2006).

Respecto a la identificación del parásito, se han desarrollado varias técnicas que permiten la caracterización de *Leishmania* a nivel de especie o de cepa, como (a) el análisis del polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción de regiones amplificadas por PCR (RFLP), en el que los productos de la PCR se digieren mediante enzimas de restricción adecuadas y se analizan los patrones de los fragmentos de restricción resultantes (Marfurt *et al.*, 2003; Minodier *et al.*, 1997; Montalvo *et al.*, 2012; Volpini *et al.*, 2004); (b) la tipificación multilocus de microsatélites (MLMT) (Kuhls *et al.*, 2011) y (c) la tipificación multilocus de secuencias (MLST) (Mauricio *et al.*, 2006). En estos casos, la diana consiste en secuencias de ADN repetidas y polimórficas, como el espaciador interno transcrito 1 del ADN ribosómico (ITS1), la cisteína proteasa B, minicírculos de ADN de los quinetooplastos, la glucoproteína de superficie 63, la proteína de choque térmico 70, mini-exones y microsatélites (Reithinger & Dujardin, 2007; Schönian *et al.*, 2008).

La sensibilidad y la especificidad de la mayoría de protocolos de diagnóstico pueden aumentar significativamente mediante hibridación a sondas de ADN específicas de gen o de especie. Originalmente, estas sondas se marcaban con isótopos radiactivos pero actualmente suelen marcarse con tinciones fluorescentes.

2. Pruebas serológicas

Para detectar anticuerpos anti-leishmania se utilizan varias pruebas serológicas. Los valores de sensibilidad en el ser humano indicados a continuación para cada prueba solo son aplicables a personas que no sufren inmunocompromiso. Se ha observado que un alto porcentaje de pacientes con LV coinfectados por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) son seronegativos para anticuerpos anti-leishmania (Gradoni *et al.*, 1993).

2.1. Prueba de inmunofluorescencia indirecta

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

2.1.1. Preparación del antígeno

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

2.1.2. Procedimiento analítico

- i) Los portas congelados recubiertos con el antígeno se lavan con PBS y se dejan secar a temperatura ambiente.
- ii) Se inactivan los sueros durante 30 minutos en un baño de agua a 56°C .
- iii) Se hacen diluciones a la mitad de los sueros problema desde 1/80 a 1/10.240 para la LV humana y desde 1/40 a 1/5.120 para la LCan. Se incluyen también en la prueba sueros control positivos y negativos a diluciones de 1/80 y 1/160 para la LV humana y de 1/40 y 1/80 para LCan. No hay sueros estándar disponibles, pero se deben preparar y titular estándares internos.
- iv) Se distribuyen 30 μ l de muestras de suero diluido en cada círculo del porta y se incuban durante 30 minutos a 37°C .
- v) Se eliminan las muestras de suero mediante un lavado vigoroso con PBS y se sumergen los portas en PBS durante 10 minutos. Se deja que se sequen los portas.
- vi) Se distribuyen 30 μ l de solución diluida de anti-inmunoglobulina conjugada a isotiocianato de fluoresceína (FITC) en cada círculo del porta y se incuban 30 minutos a 37°C . Existen anticuerpos comercializados anti-inmunoglobulinas de perro y de humanos conjugadas a FITC. Para las diluciones apropiadas, síganse las instrucciones.
- vii) Se repite el paso v y se monta con un cubre en unas cuantas gotas de PBS/glicerol (50% [v/v] de cada componente).
- viii) Se observan los portas en un microscopio de fluorescencia. El título de los anticuerpos es la mayor dilución que muestra promastigotos fluorescentes.

2.1.3. Interpretación de los resultados

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

2.2. Enzoinmunoanálisis

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

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

El método ELISA es útil para diagnosticar la leishmaniasis del Viejo y del Nuevo Mundo. No existe o hay poca reacción cruzada con otras enfermedades y, dependiendo de la cepa de *Leishmania* utilizada, la sensibilidad varía del 86% al 99%.

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

Los métodos ELISA descritos anteriormente se basan en preparaciones antigénicas crudas. Se ha descrito un antígeno recombinante de una proteína clonada de *L. infantum*, llamada rK39, que es muy reactiva frente a sueros procedentes de casos de leishmaniasis visceral humana y canina cuando se emplea en un formato ELISA. Utilizando 25-50 ng del antígeno, se detectó en todos los casos un 99% de especificidad y de sensibilidad en perros con la enfermedad demostrada mediante parasitología (Scalone *et al.*, 2002). En pacientes positivos al VIH, el ELISA-K39 mostró una mayor sensibilidad (82%) que la prueba IFA (54%) (Houghton *et al.*, 1998). El antígeno K39, que posee una estabilidad y reproducibilidad notables, se produce ahora comercialmente. Más recientemente, se ha evaluado un antígeno quimérico K9-K39-K26 como protocolo ELISA simple para el diagnóstico serológico de infecciones humanas y caninas por *Leishmania* (Daprà *et al.*, 2008). En los perros, se ha observado que la especificidad y la sensibilidad son del 99,5% y del 98,5%, respectivamente, lo cual supone una alta concordancia (valor K: 0,98) con la prueba IFA, considerada el estándar.

2.3. Prueba de aglutinación directa

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

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

2.4. Prueba inmunocromatográfica rápida (en varilla o tira)

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

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

3. Pruebas de inmunidad celular

La hipersensibilidad retardada es una característica importante de todas las formas de leishmaniasis humanas y se puede medir por la prueba cutánea de la leishmanina (LST), también conocida como la reacción de Montenegro (Manson-Bahr, 1987). La LST carece de valor diagnóstico para la LCan. La leishmanina es una suspensión de promastigotos muertos enteros (0,5–1 × 10⁷/ml) o desintegrados (250 µg de proteína/ml) en una solución salina libre de pirógenos que contiene fenol. Se desarrolla una reacción retardada que aparece a las 48–72 horas.

La tasa de falsos positivos en personas por lo demás sanas es de aproximadamente el 1%, pero puede ser mayor en las áreas donde existen antecedentes de leishmaniasis, pues muchas personas sanas pueden mostrar una elevada sensibilidad a la leishmanina. Existe una reacción cruzada completa entre todas las cepas de Leishmania, y a menudo los antígenos heterólogos dan una reacción menor, pero esto puede estar originado por las dificultades de estandarización. La LST utiliza en el diagnóstico clínico de LC y LMC. En la LV solo indica infecciones pasadas porque, durante la enfermedad activa, se produce una anergia completa. Las leishmaninas no se comercializan en ninguna parte del mundo.

Más recientemente, se ha llevado a cabo la medición del interferón gama (IFN- γ) como marcador sustitutivo de respuestas inmunitarias celulares en la leishmaniasis humana, empleando un formato similar al utilizado para la tuberculosis y empleando ELISA para medir la citocina secretada por los leucocitos en respuesta a la estimulación con antígenos de *Leishmania* (Alimohammadian *et al.*, 2012; Turgay *et al.*, 2010).

C. REQUISITOS PARA LAS VACUNAS Y EL MATERIAL DE DIAGNÓSTICO

1. Vacunas

1.1. Antecedentes

En ninguna parte del mundo se dispone de una vacuna efectiva para la inmunización profiláctica contra la leishmaniasis. En el pasado, la vacunación contra *Leishmania* se ha limitado a la protección de los humanos contra *L. tropica* y *L. major* mediante la infección previa inducida por una inyección de microorganismos de la especie *L. major*. Se inyectaban promastigotos vivos de cultivos en el brazo se dejaba que la infección resultante siguiera su curso natural; después de la recuperación, el individuo quedaba inmune frente a una infección subsecuente con ambas especies de *Leishmania*. Este tipo de inmunización se ha practicado a escala limitada en áreas hiperendémicas de LC (causada por *L. major*) en Israel, Irán y la antigua URSS (Shuikina *et al.*, 1968).

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

Actualmente, no se dispone de antígenos creados en el laboratorio para producir vacuna contra *Leishmania*. Existen tres vacunas inactivadas autorizadas contra Lcan, que están protegidas por

patentes. La primera vacuna se desarrolló en Brasil. El Ministerio de Agricultura, Ganadería y Alimentación de Brasil aprobó las características y requisitos para la producción. Esta vacuna contiene la fracción de *L. donovani* denominada “ligando fucosa-manosa” (FML) enriquecida con glucoproteína. En estudios de campo se ha observado que el antígeno administrado con saponina QuilA como adyuvante confiere alrededor de un 80% de protección clínica, y también se ha comprobado una buena eficacia inmunoterapéutica al utilizarlo en perros enfermos (Palatnik-de-Sousa *et al.*, 2008). En Brasil también se ha desarrollado una segunda vacuna, en la que se emplea el antígeno A2 recombinante de *L. donovani* junto con una saponina adyuvante. Dicha vacuna ha mostrado un 43% de protección contra un estado positivo según un cultivo en un modelo de exposición artificial.

La tercera vacuna se ha autorizado en Europa. La Agencia Europea del Medicamento ha autorizado las características y requisitos para la producción. El antígeno consiste en proteínas excretadas/secretadas purificadas a partir de un medio aprotéico empleado para cultivar promastigotos de *L. infantum*, adyuvantado con saponina QA-21 (Moreno *et al.*, 2012). La evaluación de la eficacia de esta vacuna comercial en condiciones de campo todavía se encuentra en una fase preliminar. Las observaciones realizadas en unos 80 perros Beagle expuestos a una infección natural durante 2 años han indicado que la vacuna disminuye el riesgo de aparición de enfermedad progresiva unas cuatro veces, pero que no previene la infección (Oliva *et al.*, 2012). Los programas de vigilancia, sobre todo los que se basan únicamente en pruebas serológicas realizadas en perros, deben revisarse teniendo en cuenta la influencia de la vacunación y con la seguridad de que los datos epidemiológicos se interpretan adecuadamente.

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

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

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

BIBLIOGRAFÍA

ALIMOHAMMADIAN M.H., JONES S.L., DARABI H., RIAZIRAD F., AJDARY S., SHABANI A., REZAEI M.A., MOHEBALI M., HOSSEINI Z. & MODABBER F. (2012). Assessment of interferon- γ levels and leishmanin skin test results in persons recovered for leishmaniasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **87**, 70–75.

BELL A.S. & RANFORD-CARTWRIGHT L.C. (2002). Real-time quantitative PCR in parasitology. *Trends Parasitol.*, **18**, 337–342.

BOELAERT M., EL SAFI S., JACQUET D., DE MUYNCK A., VAN DER STUYFT P. & LE RAY D. (1999). Operational validation of the direct agglutination test for diagnosis of visceral leishmaniasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **60**, 129–134.

BOSSOLASCO S., GAIERA G., OLCHINI D., GULLETTA M., MARTELLO L., BESTETTI A., BOSSI L., GERMAGNOLI L., LAZZARIN A., UBERTI-FOPPA C. & CINQUE P. (2003). Real-time PCR assay for clinical management of human immunodeficiency virus-infected patients with visceral leishmaniasis. *J. Clin. Microbiol.*, **41**, 5080–5084.

BRANDONISIO O., FUMAROLA L., MAGGI P., CAVALIERE R., SPINELLI R. & PASTORE G. (2002). Evaluation of a rapid immunochromatographic test for serodiagnosis of visceral leishmaniasis. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, **21**, 461–464.

- BULLE B., MILLON L., Bart J.M., GALLEGRO M., GAMBARELLI F., PORTUS M., SCHNUR L., JAFFE C.L., FERNANDEZ-BARREDO S., ALUNDA J.M. & PIARROUX R. (2002). Practical approach for typing strains of *Leishmania infantum* by microsatellite analysis. *J. Clin. Microbiol.*, **40**, 3391–3397.
- CARDOSO L., SCHALLIG H.D., NETO F., KROON N. & RODRIGUES M. (2004). Serological survey of *Leishmania* infection in dogs from the municipality of Peso da Regua (Alto Douro, Portugal) using the direct agglutination test (DAT) and fast agglutination screening test (FAST). *Acta Trop.*, **91**, 95–100.
- CARVALHO S.F., LEMOS E.M., COREY R. & DIETZE R. (2003). Performance of recombinant K39 antigen in the diagnosis of Brazilian visceral leishmaniasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **68**, 321–324.
- COLER R.N. & REED S.G. (2005). Second-generation vaccines against leishmaniasis. *Trends Parasitol.*, **21**, 244–249.
- COLER R.N., GOTO Y., BOGATZKI L., RAMAN V. & REED S.G. (2007). Leish-111f, a recombinant polyprotein vaccine that protects against visceral Leishmaniasis by elicitation of CD4+ T cells. *Infect. Immun.*, **75**, 4648–4654.
- CRUZ I., CAÑAVATE C., RUBIO J. M., MORALES M.A., CHICHARRO C., LAGUNA F., M. JIMÉNEZ-MEJÍAS, SIRERA G., VIDELA S., ALVAR J. & THE SPANISH HIV-LEISHMANIA STUDY GROUP. (2002). A nested polymerase chain reaction (Ln-PCR) for diagnosing and monitoring *Leishmania infantum* infection in patients co-infected with human immunodeficiency virus. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **96** (Suppl 1), S185–S189.
- DAPRÀ F., SCALONE A., MIGNONE W., FERROGLIO E., MANNELLI A., BIGLINO A., ZANATTA R., GRADONI L. & ROSATI S. (2008). Validation of a recombinant based antibody ELISA for diagnosis of human and canine leishmaniasis. *J. Immunoassay Immunochem.*, **29**, 244–256.
- DAS A. & ALI N. (2012). Vaccine development against *Leishmania donovani*. *Front. Immunol.*, **3**, 99.
- DE BRUJIN M.H.L., LABRADA L.A., SMYTH A.J., SANTRIC C. & BARKER D.C. (1993). A comparative study of diagnosis by the polymerase chain reaction and by current clinical methods using biopsies from Colombian patients with suspected leishmaniasis. *Trop. Med. Parasitol.*, **44**, 201–207.
- DI MUCCIO T., VERONESI F., ANTOGNONI M.T., ONOFRI A., PIERGILI FIORETTI D. & GRAMICCIA M. (2012). Diagnostic value of conjunctival swab nested-PCR in different categories of dogs naturally exposed to *Leishmania infantum* infection. *J. Clin. Microbiol.*, **50**, 2651–2659.
- DOUGALL A.M., ALEXANDER B., HOLT D.C., HARRIS T., SULTAN A.H., BATES P.A., ROSE K. & WALTON S.F. (2011). Evidence incriminating midges (Diptera: Ceratopogonidae) as potential vectors of *Leishmania* in Australia. *Int. J. Parasitol.*, **41**, 571–579.
- EVANS D.A. (1987). *Leishmania*. In: *In-Vitro Methods for Parasite Cultivation*, Taylor A.E. & Baker J.R., eds. Academic Press, London, UK, 52–75.
- FRANCINO O., ALTET L., SANCHEZ-ROBERT E., RODRIGUEZ A., SOLANO-GALLEGO L., ALBEROLA J., FERRER L., SANCHEZ A. & ROURA X. (2006). Advantages of real-time PCR assay for diagnosis and monitoring of canine leishmaniasis. *Vet. Parasitol.*, **137**, 214–221.
- GOTO Y., BHATIA A., RAMAN V.S., LIANG H., MOHAMATH R., PICONE A.F., VIDAL S.E., VEDVICK T.S., HOWARD R.F. & REED S.G. (2011). KSAC, the first defined polyprotein vaccine candidate for visceral leishmaniasis. *Clin. Vaccine Immunol.*, **18**, 1118–1124.
- GRADONI L., FOGLIA MANZILLO V., PAGANO A., PIANTEDOSI D., DE LUNA R., GRAMICCIA M., SCALONE A., DI MUCCIO T. & OLIVA G. (2005). Failure of a multi-subunit recombinant leishmanial vaccine (MML) to protect dogs from *Leishmania infantum* infection and to prevent disease progression in infected animals. *Vaccine*, **23**, 5245–5251.
- GRADONI L., SCALONE A. & GRAMICCIA M. (1993). HIV-*Leishmania* co-infections in Italy: serological data as an indication of the sequence of acquisition of the two infections. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **87**, 94–96.
- GRAMICCIA M. (2011). Recent advances in leishmaniasis in pet animals: Epidemiology, diagnostics and anti-vectorial prophylaxis. *Vet. Parasitol.*, **181**, 23–30.

- HAMARSHEH O., NASEREDDIN A., DAMAJ S., SAWALHA S., AL-JAWABREH H., AZMI K., AMRO A., AREKAT S., ABDEEN Z. & AL-JAWABREH A. (2012). Serological and molecular survey of *Leishmania* parasites in apparently healthy dogs in the West Bank, Palestine. *Parasit. Vectors*, **5**, 183.
- HARITH A.E., KOLK A.H.J., LEEUWENBURGH J., MUIGAI R., HUIGEN E., JELSMA T. & KAGER P.A. (1988). Improvement of a direct agglutination test for field studies of visceral leishmaniasis. *J. Clin. Microbiol.*, **26**, 1321–1325.
- HARITH A.E., SLAPPENDEL R.J., REITER I., VAN KNAPEN F., KORTE P.D., HUIGEN E. & KOLK A.H.J. (1989). Application of a direct agglutination test for detection of specific anti-*Leishmania* antibodies in the canine reservoir. *J. Clin. Microbiol.*, **27**, 2252–2257.
- HOUGHTON R.L., PETRESCU M., BENSON D.R., SKEIKY Y.A.W., SCALONE A., BADARO R., REED S.G. & GRADONI L. (1998). A cloned antigen (recombinant K39) of *Leishmania chagasi* diagnostic for visceral leishmaniasis in human immunodeficiency virus type 1 patients and a prognostic indicator for monitoring patients undergoing drug therapy. *J. Infect. Dis.*, **177**, 1339–1344.
- KUHLS K., ALAM M.Z., CUPOLILLO E., FERREIRA G.E., MAURICIO I.L., ODDONE R., FELICIANGELI M.D., WIRTH T., MILES M.A. & SCHÖNIAN G. (2011). Comparative microsatellite typing of new world *Leishmania infantum* reveals low heterogeneity among populations and its recent old world origin. *PLoS Negl. Trop. Dis.*, **5**, e1155.
- MAARTEN H.L., DE BRUJIN M.H.L. & BARKER D.C. (1992). Diagnosis of New World leishmaniasis: specific detection of species of the *Leishmania braziliensis* complex by amplification of kinetoplast DNA. *Acta Trop.*, **52**, 45–58.
- MANCIANTI F., FALCONE M.L., GIANNELLI C. & POLI A. (1995). Comparison between and enzyme-linked immunosorbent assay using a detergent-soluble *Leishmania infantum* antigen and indirect immunofluorescence for the diagnosis of canine leishmaniasis. *Vet. Parasitol.*, **59**, 13–21.
- MANSON-BAHR P.C. (1987). Diagnosis. In: The Leishmaniasis in Biology and Medicine. Vol. II. Clinical Aspects and Control, Peters W. & Killick-Kendrick R., eds. Academic Press, London, UK, 703–729.
- MARFURT J., NASEREDDIN A., NIEDERWIESER I., JAFFE C.L., BECK H.P. & FELGER I. (2003). Identification and differentiation of *Leishmania* species in clinical samples by PCR amplification of the miniexon sequence and subsequent restriction fragment length polymorphism analysis. *J. Clin. Microbiol.*, **41**, 3147–3153.
- MATHIS A. & DEPLAZES P. (1995). PCR and *in vitro* cultivation for detection of *Leishmania* spp. in diagnostic samples from humans and dogs. *J. Clin. Microbiol.*, **33**, 1145–1149.
- MAURICIO I.L., YEO M., BAGHAEI M., DOTO D., PRATLONG F., ZEMANOVA E., DEDET J.P., LUKES J. & MILES M.A. (2006). Towards multilocus sequence typing of the *Leishmania donovani* complex: resolving genotypes and haplotypes for five polymorphic metabolic enzymes (ASAT, GPI, NH1, NH2, PGD). *Int. J. Parasitol.*, **36**, 757–769.
- MINODIER P., PIARROUX R., GAMBARELLI F., JOBLET C. & DUMON H. (1997). Rapid identification of causative species in patients with Old World leishmaniasis. *J. Clin. Microbiol.*, **35**, 2551–2555.
- MOHEBALI M., HAJJARAN H., HAMZAVI Y., MOBEDI I., ARSHI S., ZAREI Z., AKHOUNDI B., NAEINI K.M., AVIZEH R. & FAKHAR M. (2005). Epidemiological aspects of canine visceral leishmaniasis in the Islamic Republic of Iran. *Vet. Parasitol.*, **129**, 243–251.
- MONTALVO A.M., FRAGA J., MAES L., DUJARDIN J-C. & VAN DER AUWERA G. (2012). Three new sensitive and specific heat-shock protein 70 PCRs for global *Leishmania* species identification. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, **31**, 1453–1461.
- MORENO J., VOULDOUKIS I., MARTIN V., MCGAHIE D., CUISINIER A.M. & GUEGUEN S. (2012). Use of a LiESP/QA-21 vaccine (CaniLeish) stimulates an appropriate Th1-dominated cell-mediated immune response in dogs. *PLoS Negl. Trop. Dis.*, **6** (6), e1683.
- MURRAY H.W., BERMAN J.D., MARTIN V., DAVIES C.R. & SARAVIA N.G. (2005). Advances in leishmaniasis. *Lancet*, **366**, 1561-1577.
- OLIVA G., NIETO J., FOGLIA MANZILLO V., CAPPIELLO S., FIORENTINO E., DI MUCCIO T., SCALONE A., MORENO J., CHICHARRO C., BUTAUD T., GUEGAND L., MARTIN V., CUISINIER A-C., GUEGUEN S., CAÑAVATE C. & GRADONI L. (2012). Evidence for protection against active infection and disease progression in naïve dogs vaccinated with LiESP/QA-

- 21 (Canileish®) exposed to two consecutive *Leishmania infantum* transmission seasons. *Proceedings of the WSAVA / FECAVA / BSAVA (World Small Animal Veterinary Association / Federation of European Companion Animal Veterinary Associations / British Small Animal Veterinary Association) World Congress*, Birmingham, UK, 11–15 April 2012, p. 529–530.
- OLIVA G., SCALONE A., FOGLIA MANZILLO V., GRAMICCIA M., PAGANO A., DI MUCCIO T. & GRADONI L. (2006). Incidence and time course of *Leishmania infantum* infections examined by parasitological, serologic, and Nested-PCR techniques in a cohort of naïve dogs exposed to three consecutive transmission seasons. *J. Clin. Microbiol.*, **44**, 1318–1322.
- OTRANTO D., PARADIES P., SASANELLI M., LEONE N., de CAPRARIIS D., CHIRICO J., SPINELLI R., CAPELLI G. & BRANDONISIO O. (2005). Recombinant K39 dipstick immunochromatographic test: a new tool for the serodiagnosis of canine leishmaniasis. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **17**, 32–37.
- OZBEL Y., OSKAM L., OZENSOY S., TURGAY N., ALKAN M.Z., JAFFE C.L. & OZCEL M.A. (2000). A survey on canine leishmaniasis in western Turkey by parasite, DNA and antibody detection assays. *Acta Trop.*, **74**, 1–6.
- PALATNIK-DE-SOUSA C.B., BARBOSA ADE F., OLIVEIRA S.M., NICO D., BERNARDO R.R., SANTOS W.R., RODRIGUES M.M., SOARES I. & BORJA-CABRERA G.P. (2008). FML vaccine against canine visceral leishmaniasis: from second-generation to synthetic vaccine. *Expert Rev. Vaccines*, **7**, 833–851.
- PALTRINIERI S., SOLANO-GALLEGO L., FONDATI A., LUBAS G., GRADONI L., CASTAGNARO M., CROTTI A., MAROLI M., OLIVA G., ROURA X., ZATELLI A. & ZINI E. (2010). Canine Leishmaniasis Working Group, Italian Society of Veterinarians of Companion Animals. Guidelines for diagnosis and clinical classification of leishmaniasis in dogs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, **236**, 1184–1191.
- PIARROUX R., AZAIEZ R., LOSSI A.M., REYNIER P., MUSCATELLI F., GAMBARELLI F., FONTES M., DUMON H. & QUILICI M. (1993). Isolation and characterization of a repetitive DNA sequence for *Leishmania infantum*: development of a visceral leishmaniasis polymerase chain reaction. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **49**, 364–369.
- QUINNELL R.J., COURTENAY O., DAVIDSON S., GARCEZ L., LAMBSON B., RAMOS P., SHAW J.J., SHAW M.A. & DYE C. (2001). Detection of *Leishmania infantum* by PCR, serology and cellular immune response in a cohort study of Brazilian dogs. *Parasitology*, **122**, 253–261.
- REITHINGER R. & DAVIES C.R. (2002). American cutaneous leishmaniasis in domestic dogs: an example of the use of the polymerase chain reaction for mass screening in epidemiological studies. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **96** (Suppl 1), S123–126.
- REITHINGER R. & DUJARDIN J-C. (2007). Molecular diagnosis of leishmaniasis: current status and future applications. *J. Clin. Microbiol.*, **45**, 21–25.
- RIOUX J.A. LANOTTE G., SERRES E., PRATLONG F., BASTIEN P. & PERIERES J. (1990). Taxonomy of *Leishmania*, use of isoenzymes. Suggestions for a new classification. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.* **65**, 111–125.
- SCALONE A., DE LUNA R., OLIVA G., BALDI L., SATTÀ G., VESCO G., MIGNONE W., TURILLI C., MONDESIRE R.R., SIMPSON D., DONOGHUE A.R., FRANK G.R. & GRADONI L. (2002). Evaluation of the *Leishmania* recombinant K39 antigen as a diagnostic marker for canine leishmaniasis and validation of a standardized enzyme-linked immunosorbent assay. *Vet. Parasitol.*, **104**, 275–285.
- SCHÖNIAN G., MAURICIO I., GRAMICCIA M., CAÑAVATE C., BOELAERT M. & DUJARDIN J-C. (2008). Leishmaniasis in the Mediterranean in the era of molecular epidemiology. *Trends Parasitol.* **24**, 135–142.
- SHUIKINA E.E., SERGIEV V.P., TRIERS I.I., SHCHERBAKOV V.A. & DIVEEV S.KH. (1968). Experience of antileishmaniasis vaccination with cultures of *Leishmania tropica major* grown in various types of media. *Med. Parazitol. (Mosk.)*, **37**, 648–651 (in Russian).
- SUNDAR S., MAURYA R., SINGH R.K., BHARTI K., CHAKRAVARTY J., PAREKH A., RAI M., KUMAR K. & MURRAY H.W. (2006). Rapid, noninvasive diagnosis of visceral leishmaniasis in India: comparison of two immunochromatographic strip tests for detection of anti-K39 antibody. *J. Clin. Microbiol.*, **44**, 251–253.

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

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

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

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

*
* *

NB: Existe un Laboratorio de Referencia de la OIE para la leishmaniasis (puede consultarse en la Tabla de la Parte 4 de este *Manual Terrestre* o en la página web de la OIE: <http://www.oie.int/es/nuestra-experiencia-cientifica/laboratorios-de-referencia/lista-des-laboratorios/>). Por favor, contacte con el Laboratorio de Referencia de la OIE para más información sobre las pruebas de diagnóstico, los reactivos y las vacunas para la leishmaniasis

NB: ADOPTADO POR PRIMERA VEZ EN 1991; ÚLTIMAS ACTUALIZACIONES ADOPTADAS EN 2014.