

UNIVERSITAT DE BARCELONA

FACULTAT DE FARMÀCIA

DEPARTAMENT DE MICROBIOLOGIA I PARASITOLOGIA SANITÀRIES

**DIAGNÓSTICO DE LA LEISHMANIOSIS
CRÍPTICA EN EL PERRO.
EXPRESIÓN ISOTÍPICA E IDIOTÍPICA
DE LOS ANTICUERPOS PRODUCIDOS
EN DISTINTAS FASES DE LA INFECCIÓN**

LAURA INIESTA GONZÁLEZ,
Octubre 2007

UNIVERSITAT DE BARCELONA

FACULTAT DE FARMÀCIA

DEPARTAMENT DE MICROBIOLOGIA I PARASITOLOGIA SANITÀRIES

PROGRAMA DE DOCTORAT MEDICAMENTS, ALIMENTACIÓ I SALUT

BIENNI 1999-2001

**DIAGNÓSTICO DE LA LEISHMANIOSIS CRÍPTICA EN EL
PERRO. EXPRESIÓN ISOTÍPICA E IDIOTÍPICA DE LOS
ANTICUERPOS PRODUCIDOS EN DISTINTAS
FASES DE LA INFECCIÓN**

Memoria presentada por LAURA INIESTA GONZÁLEZ para optar al título de doctora
por la Universitat de Barcelona

Directora: Montserrat Portús i Vinyeta, catedrática de la Unitat de Parasitologia,
Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona.

Autoriza la presentación:

Dra. Montserrat Portús i Vinyeta,
Directora

Laura Iniesta González
Doctoranda

LAURA INIESTA GONZÁLEZ, 2007

AGRADECIMIENTOS

Como todos los trabajos de investigación, éste no ha sido fruto de una labor individual, sino de equipo en el que cada uno ha aportado su granito imprescindible. Por ello, ahora que se termina, quiero expresar mi gratitud a todas las personas que, de una forma u otra, han colaborado en la elaboración de esta tesis.

En primer lugar, quiero dar las gracias a mi directora de tesis, la Dra. Montserrat Portús, Catedrática de la Unidad de Parasitología de la Facultad de Farmacia de la Universitat de Barcelona, a quien debo mi iniciación en el mundo de la investigación. Gracias Montse por hacerme ver que la ciencia no es “blanco o negro” y, con ello, hacerme pasar del odio al cariño por la “zona gris”; por el ánimo y el esfuerzo que pones en mi formación; por hacerme descubrir los errores y orientarme hacia la solución y por esos escasos pero tan valorados últimos “molt bé”. Pero, sobre todo, por la confianza que depositaste en mí hace ocho años, gracias a la cual hoy presento este trabajo. Espero haber merecido esa confianza.

A la Dra. Montserrat Gállego, Profesora Titular de la misma unidad. Gracias Montse por tu interés y preocupación constante durante el curso de este trabajo; por estar siempre dispuesta a realizar trabajo de campo, por haberme obligado a conducir de ida al Priorat, cosa que tanto me ha servido, y por conducir tú de vuelta mientras yo dormía.

A todos los miembros del Laboratorio de Parasitología, a los que están o estuvieron. A la Dra. Assunta Busato, por compartir quebraderos de cabeza frente a los resultados del *Western blotting*. A la Dra. Cristina Riera, por sus consejos y orientaciones sobre serología. Al Dr. Jaume Carrió, por sus educativas charlas. Al Dr. Joan Carles Casanova por conseguir que las nubes negras se esfumen. Al Dr. Matías Segovia, por ir “unos años por delante”. A la Dra. Roser Fisa, por sus estudios que me han ayudado a entender mejor los míos. Al resto de compañeros y amigos del grupo de Parasitología Clínica, Carme Guasch, Liliana Montoya, Mireia Vergés, Paulo López, Silvia Tebar, Soledad Castillejo y Susana Calle, con los que he compartido muchas horas de trabajo, experiencias, comidas y conversaciones. A los demás miembros de la Unidad de Parasitología por su compañerismo.

Esta tesis no se hubiese llevado a cabo sin la colaboración de los equipos de Patología Animal de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid, dirigido por el Dr. José M^a Alunda, y del Departamento de Farmacología, Terapéutica y Toxicología de la Universitat Autònoma de Barcelona. Quiero agradecer en especial a la Dra. Laia Solano-Gallego su ejemplo de ambición investigadora.

También quiero agradecer a los dueños de los perros y a los veterinarios de las zonas del Priorat y de Girona que, siempre interesados por nuestra labor, amablemente han colaborado en la realización de este trabajo.

A mis compañeros de piso, amigos y compañeros de la farmacia que se han interesado en todo momento por la evolución y, sobre todo, por el fin de esta tesis, soportando mis monólogos sobre leishmaniosis y apoyándome en los momentos de desánimo.

En último lugar, quiero dar las gracias a mi familia. A mis padres por comprender mis ilusiones y alentarme en todo momento, por apoyarme en mis decisiones, sean cuales sean, y conseguir que sienta que siempre están a mi lado. Sin ellos, nada de esto hubiera sido posible. A mi hermana, por el apoyo moral en los momentos “grises” y en las etapas dubitativas... que han sido muchas, por hacerme ver las cosas claras cuando yo no lo consigo. Y a ti Luis, por tu cariño e inmensa paciencia, por apoyarme, criticarme y por hacerme sentir que formo parte de algo bonito.

Este estudio ha sido subvencionado por los proyectos FAIR CT98-4104 de la Unión Europea, PB94-0865 y 1999SGR00072 de los gobiernos español y catalán.

INTRODUCCIÓN	1
1. AGENTE ETIOLÓGICO DE LAS LEISHMANIOSIS	4
1.1. Posición sistemática y clasificación del género <i>Leishmania</i>	4
1.2. Formas evolutivas, ciclo vital y transmisión	7
2. LOS VECTORES	9
3. LEISHMANIOSIS AUTÓCTONAS	10
3.1. Leishmaniosis humana	10
3.1.1. Distribución e incidencia	11
3.1.2. Manifestaciones clínicas	12
3.2. HOSPEDADORES VERTEBRADOS	13
3.2.1. Leishmaniosis canina	14
3.2.1.1. Manifestaciones clínicas	18
3.2.2. Leishmaniosis felina	20
4. RELACIÓN HOSPEDADOR-PARÁSITO	21
4.1. Inoculación del parásito a través de la piel e inicio de la infección	21
4.2. Mecanismos de defensa del hospedador	23
4.2.1. Respuesta celular	24
4.2.2. Respuesta humoral	27
4.3. Inmunopatología	28
5. DIAGNÓSTICO DE LA LEISHMANIOSIS	29
5.1. Métodos parasitológicos basados en la detección del parásito	29
5.1.1. Observación del parásito	29
5.1.2. Cultivo	30
5.1.3. Inoculación en animales	31
5.1.4. Xenodiagnóstico	31
5.1.5. Detección de antígenos circulantes	31
5.1.6. PCR	32
5.2. Métodos basados en la detección de la respuesta inmune	33
5.2.1. Detección de anticuerpos mediante técnicas serológicas	33
a.- Contrainmunoelectroforesis (CIEF)	34
b.- Inmunofluorescencia indirecta (IFI)	35
c.- Aglutinación directa (DAT)	35
d.- Hemaglutinación indirecta (HAI)	35
e.- Aglutinación con partículas de látex	35

f.- ELISA o enzima-inmunoensayo	35
g.- Dot-ELISA	36
h.- <i>Western blot</i>	36
i.- Estudios comparativos	36
5.2.3. Métodos diagnósticos basados en la valoración de la respuesta inmune celular	37
a.- Linfoestimulación	37
b.- Test de Montenegro	38
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	39
RESULTADOS	43
1. <i>Leishmania infantum</i> -specific IgG, IgG1 and IgG2 antibody responses in healthy and ill dogs from endemic areas. Evolution in the course of infection and after treatment (Solano-Gallego <i>et al.</i> , 2001)	45
2. Diagnostic techniques to detect cryptic leishmaniasis in dogs (Iniesta <i>et al.</i> , 2002)	59
3. Immunoglobulin G and E responses in various stages of canine leishmaniosis (Iniesta <i>et al.</i> , 2005)	67
4. Idiotype expression of IgG1 and IgG2 in dogs naturally infected with <i>Leishmania infantum</i> (Iniesta <i>et al.</i> , 2007)	75
5. Detection of anti- <i>Leishmania</i> immunoglobulin G antibodies in urine specimens of dogs with leishmaniosis (Solano-Gallego <i>et al.</i> , 2003)	87
6. Cross-sectional serosurvey of feline leishmaniasis in ecoregions around the northwestern Mediterranean (Solano-Gallego <i>et al.</i> , 2007)	97
DISCUSIÓN	105
1. UTILIDAD DIAGNÓTICA Y PRONÓSTICA DE LA RESPUESTA INMUNE FRENTE A <i>LEISHMANIA</i> EN EL PERRO	107
2. DIAGNÓSTICO DE LA LEISHMANIOSIS CANINA CRÍPTICA.....	115
3. OTRAS ESPECIES ANIMALES RESERVORIOS DE <i>LEISHMANIA</i>	119
CONCLUSIONES	121
BIBLIOGRAFÍA	125

LISTA DE ABREVIATURAS

ADCC: Citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos.
ADN: Ácido desoxirribonucleico.
ADVP: Adicto a drogas por vía parenteral.
APC: *Antigen presenting cell* (Célula presentadora de antígeno).
ARN: Ácido ribonucleico.
BEC: *Butlletí epidemiològic de Catalunya*.
C: Coeficiente de anticuerpos urinarios.
CIEF: Contraelectroforesis.
DAT: *Direct agglutination test* (Test de aglutinación directa).
DTH: *Delayed type hypersensitivity* (Reacción de hipersensibilidad retardada).
EDO: Enfermedades de declaración obligatoria.
ELISA: *Enzyme-linked immunosorbent assay*.
FAST-ELISA: *Falcon assay screening test-ELISA*.
gp63: Glicoproteína 63.
HAI: Hemaglutinación indirecta.
ICC: Inmunocomplejos circulantes.
IFI: Inmunofluorescencia indirecta.
IFN: Interferón.
Ig: Inmunoglobulina.
IL: Interleucina.
ITS: *Internal transcribed spacer*.
LPG: *Lipophosphoglycan* (Lipofosfoglicano).
MAC: *Membrane attack complex* (Complejo de ataque a membrana).
MHC: *Major histocompatibility complex* (Complejo mayor de histocompatibilidad).
NK: *Natural killer* (Célula asesina natural).
NNN: Medio Novy-Nicolle-McNeal.
NO: *Nitric oxide* (Óxido nítrico).
NOS: *Nitric Oxide Synthase* (Enzima óxido nítrico sintetasa).
O₂⁻: Anión superóxido.
OH: Radicales hidroxilo.
PCPL: Programa de control y prevención de la leishmaniosis.
PCR: *Polymerase chain reaction* (Reacción en cadena de la polimerasa).
PMN: Neutrófilos polimorfonucleares.
SIDA: Síndrome de inmunodeficiencia adquirida.
TDR: *Special programme for research and training in tropical diseases* (Programa especial de investigación y formación en enfermedades infecciosas).
TGF: *Transforming growth factor* (Factor de crecimiento transformador).
Th: Célula T *helper*.
TNF: *Tumor necrosis factor* (Factor de necrosis tumoral).
VIH: Virus de inmunodeficiencia humana.
WHO: *World health organization* (Organización mundial de la salud).

INTRODUCCIÓN

Las leishmaniosis son unas infecciones parasitarias causadas por al menos 20 especies de protozoos hemotisulares del género *Leishmania*, transmitidos mediante la picadura de insectos vectores flebotominos, que afectan al hombre y a diversos animales.

Actualmente, las leishmaniosis presentan una distribución cosmopolita y son endémicas en las regiones tropicales y subtropicales de 88 países, 72 de los cuales en vías de desarrollo. Ello supone un total de 350 millones de personas en situación de riesgo, alcanzándose una prevalencia mundial de 12 a 14 millones de afectados (Alvar, 2001, WHO, 2006) y una incidencia anual de entre 1 y 1,5 millones de casos de leishmaniosis cutáneas y 500.000 casos de leishmaniosis viscerales, causando 70.000 muertes al año (Desjeux, 2004, Murray *et al.*, 2005). El 90% de los casos anuales de leishmaniosis cutánea se producen en Afganistán, Arabia Saudí, Argelia, Brasil, Irán, Perú y Siria (Desjeux, 1996) y el 90% de los nuevos casos de leishmaniosis visceral se originan en Bangla Desh, Brasil, India, Nepal y Sudan (Desjeux, 2004, WHO, 2006). Sin embargo, solo se declaran oficialmente 600.000 casos, por lo que se subestima enormemente la realidad de la afección humana debida a estos protozoos. Recientemente se han descrito casos autóctonos en áreas tradicionalmente no endémicas como varios estados de Estados Unidos y Canadá donde se han encontrado perros con anticuerpos (Enserink, 2000), canguros de la zona norte de Australia con leishmaniosis cutánea (Rose *et al.*, 2004) y un caso humano y otro de un caballo en Alemania (Bogdan *et al.*, 2001, Koehler *et al.*, 2002). Se acepta por tanto que se trata de una enfermedad dinámica y que las circunstancias de transmisión están en continuo cambio debido a factores ambientales, demográficos y de comportamiento humano (Gramiccia y Gradoni, 2005).

La Organización Mundial de la Salud la considera una de las diez enfermedades más importantes incluidas en el “programa especial de investigación y formación en enfermedades infecciosas” (TDR) y la señala como prioritaria para la investigación y el control (WHO, 2007).

En los países industrializados ha aumentado el interés por la leishmaniosis en los últimos años debido, por un lado, al comportamiento oportunista de esta infección y su especial prevalencia en pacientes coinfectados con el virus de inmunodeficiencia humana (VIH) (Desjeux y Alvar, 2003) y por otro al incremento de los viajes internacionales a áreas endémicas. Por ello, en el área mediterránea, la leishmaniosis,

que tradicionalmente había sido una enfermedad infantil, en las últimas décadas se diagnosticó fundamentalmente en población adulta inmunocomprometida. En febrero de 1982 se incluyó en el Sistema de Declaración Obligatoria de Enfermedades de España (EDO) lo que conllevó un control oficial del número de casos. Sin embargo, a partir del 1 de julio de 1996, fecha en la que entró en vigor el Real Decreto 2210/1995, por el que se crea la Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica, la leishmaniosis pasó a ser considerada enfermedad endémica de ámbito regional por lo que solo las Comunidades Autónomas que en su ámbito tengan casos remiten al Ministerio de Sanidad y Consumo un informe epidemiológico anual.

Existen diversos reservorios de la leishmaniosis, de entre los cuales, el perro es el principal para *Leishmania infantum* en el área mediterránea. La leishmaniosis canina en nuestra zona tiene una gran importancia tanto en el aspecto clínico-veterinario debido a la creciente demanda de la sociedad de una mayor sensibilidad y atención hacia los animales, como en el sanitario por ser, como se ha dicho, el principal reservorio de la enfermedad.

1. AGENTE ETIOLÓGICO DE LAS LEISHMANIOSIS

1.1. POSICIÓN SISTEMÁTICA Y CLASIFICACIÓN DEL GÉNERO *LEISHMANIA*

La posición sistemática del género *Leishmania* es compleja pues presenta pocos criterios morfológicos que ayuden a su clasificación taxonómica, por ello se ha basado tradicionalmente en distintos criterios extrínsecos como son el curso clínico de la enfermedad, los reservorios involucrados, la distribución geográfica y las características morfológicas y biológicas (crecimiento del parásito en medios de cultivo, lugar de desarrollo en el vector...), entre otras (Grimaldi y Tesh, 1993).

Leishmania es un protozoo flagelado perteneciente al orden Kinetoplastida y a la familia Trypanosomatidae.

Reino	Protista
Subreino	Protozoa
Phylum	Euglenozoa
Subphylum	Mastigophora
Clase	Zoomastigophorea
Orden	Kinetoplastida
Suborden	Trypanosomatina
Familia	Trypanosomatidae
Género	<i>Leishmania</i>

En la actualidad se diferencia el género *Leishmania* en dos subgéneros en función de su localización y multiplicación en el insecto vector:

- Subgénero *Leishmania* (Ross, 1903) cuyo ciclo biológico se desarrolla en la parte media o anterior del tubo digestivo del vector (reproducción suprapilórica) (Alvar, 2001, Molyneux y Killick-Kendrick, 1987).
- Subgénero *Viannia* (Lainson y Shaw, 1987) que se multiplica en la parte posterior del tracto digestivo del vector antes de desplazarse a la parte anterior (reproducción peripilórica) (Lainson y Shaw, 1987).

Siguiendo la clasificación de Rioux y Lanotte (1993), se diferencian las siguientes especies (Dedet y Pratlong, 2003):

Subgénero *Leishmania* (Presentes en el Viejo y Nuevo Mundo).

- Complejo filogenético *L. donovani*
L. donovani (Laveran y Mesnil, 1903).
L. archibaldi (Castellani y Chalmers, 1919).
- Complejo filogenético *L. infantum*
L. infantum (Nicolle, 1908).
- Complejo filogenético *L. tropica*
L. tropica (Wright, 1903).
- Complejo filogenético *L. killicki*
L. killicki (Rioux, Lanotte y Pratlong, 1986).
- Complejo filogenético *L. aethiopica*
L. aethiopica (Bray, Ashford y Bray, 1973).

- Complejo filogenético *L. major*
L. major (Yakimoff y Schokhor, 1914).
- Complejo filogenético *L. turanica*
L. turanica (Strelkova, Peters y Evans, 1990).
- Complejo filogenético *L. gerbilli*
L. gerbilli (Wang, Qu y Guan, 1964).
- Complejo filogenético *L. arabica*
L. arabica (Peters, Elbihari y Evans, 1986).
- Complejo filogenético *L. mexicana*
L. mexicana (Biagi, 1953).
- Complejo filogenético *L. amazonensis*
L. amazonensis (Lainson y Shaw, 1972).
L. aristidesi (Lainson y Shaw, 1979).
- Complejo filogenético *L. enriettii*
L. enriettii (Muniz y Medina, 1948).
- Complejo filogenético *L. hertigi*
L. hertigi (Herrer, 1971).
L. deanei (Lainson y Shaw, 1977).

Subgénero *Viannia* (Presentes en el Nuevo Mundo).

- Complejo filogenético *L. braziliensis*
L. braziliensis (Vianna, 1911).
L. peruviana (Vélez, 1913).
- Complejo filogenético *L. guyanensis*
L. guyanensis (Floch, 1954).
L. panamensis (Lainson y Shaw, 1972).
L. shawi (Lainson *et al.*, 1989).
- Complejo filogenético *L. naiiffi*
L. naiiffi (Lainson y Shaw, 1989).
- Complejo filogenético *L. lainsoni*
L. lainsoni (Silveira *et al.*, 1987).

Se acepta la sinonimia de algunas de ellas como *L. infantum* = *L. chagasi* (Cunha y Chagas, 1937) (Dedet y Pratlong, 2003).

Dado que los caracteres extrínsecos de clasificación son variables por depender de las relaciones entre parásito, vector y hospedador, la necesidad de caracterizar mejor las diferentes poblaciones de *Leishmania* hace que se adopten criterios de clasificación basados en los datos obtenidos de la aplicación de técnicas bioquímicas y moleculares fundamentadas en características intrínsecas del parásito. Los dos métodos de clasificación más utilizados en la actualidad son el análisis electroforético de isoenzimas que agrupa las poblaciones en zimodemas (Rioux *et al.*, 1990) y los métodos genotípicos basados en estudios del ADN parasitario (Hanafi *et al.*, 2001, Bulle *et al.*, 2002, Toledo *et al.*, 2002, Gangneux *et al.*, 2003, Montoya *et al.*, 2007).

1.2. FORMAS EVOLUTIVAS, CICLO VITAL Y TRANSMISIÓN.

Las leishmanias son parásitos diheteroxenos con polimorfismo evolutivo cuyo ciclo biológico se cierra con 3 formas morfoevolutivas:

- **Amastigota:**

Forma endocelular situada en el citoplasma de los macrófagos del hospedador vertebrado, de forma ovalada o redondeada y de una longitud de entre 3 y 5 μm y una anchura de entre 1,5 y 2,5 μm . En su citoplasma contiene un núcleo voluminoso y esferoidal, generalmente excéntrico, y un kintonúcleo anterior que es la observación conjunta del blefaroplasto del flagelo y de una mitocondria modificada o kinetoplasto (Lainson y Shaw, 1987, Alexander *et al.*, 1999).

- **Promastigota:**

Forma extracelular metacíclica infestante presente en el intestino medio del hospedador invertebrado, fusiforme, móvil y de un tamaño de entre 10 y 30 μm de longitud y 1,5 y 3 μm de anchura, con un núcleo oval central y un kintonúcleo bastoniforme claramente prenuclear y flagelo anterior libre (Killick-Kendrick, 1990b).

- **Paramastigota:**

Forma extracelular alargada de una longitud de entre 5 y 10 μm , con núcleo anterior, kintonúcleo al lado y flagelo anterior libre, presente en el tubo digestivo del vector (Killick-Kendrick, 1990b, Molyneux y Killick-Kendrick, 1987).

Aunque la multiplicación de *Leishmania* en el vertebrado y el invertebrado es por fisión binaria longitudinal, existen evidencias obtenidas mediante microscopía (Lanotte y

Rioux, 1990), análisis de isoenzimas (Maazoun *et al.*, 1981) y análisis de ADN (Bastien *et al.*, 1992), que apoyan la hipótesis de la existencia de intercambios genéticos y fusión celular.

Las hembras de los flebotomos ingieren el parásito cuando pican a un hospedador infectado con el fin de ingerir sangre con la que alimentarse y desarrollar sus huevos. En su interior, *Leishmania* se multiplica bajo la forma amastigota y se transforma en la forma promastigota que se multiplica activamente en su estómago e intestino. El parásito experimenta una compleja serie de modificaciones morfológicas y funcionales que le llevan a diferenciarse desde un estado promastigote, que evita la expulsión sujetándose a las microvellosidades intestinales, hasta una forma metacíclica, incapaz de unirse a las paredes intestinales y que migra a las partes bucales, pasando por el estadio paramastigote (Walters *et al.*, 1989, Killick-Kendrick, 1990b, Pimenta *et al.*, 1992, Mahoney *et al.*, 1999). Los promastigotes metacíclicos se sitúan en la región bucal o trompa del vector, desde donde pasarán al hospedador vertebrado a través de la picadura.

Con cada picadura del flebotomo entran en la dermis del hospedador vertebrado entre 10 y 200 promastigotes metacíclicos, algunos de los cuales son destruidos por los leucocitos y eosinófilos, mientras que otros son englobados en una vacuola parasitófora en el interior de los macrófagos. Aquí, el parásito se transforma en forma amastigota y se divide activamente hasta que dicho macrófago estalla. Los parásitos se liberan e invaden otros macrófagos vecinos en el interior de los cuales siguen multiplicándose. Desde aquí se diseminan a través de la piel o del torrente sanguíneo y linfático por órganos ricos en células macrofágicas como son la médula ósea, el hígado y el bazo principalmente.

Excepcionalmente se ha comunicado la transmisión mecánica mediante la mosca *Stomoxys calcitrans* (contaminada al alimentarse en úlceras infectadas por *Leishmania* y posarse posteriormente en heridas no infectadas de seres humanos) (citado en Alvar, 2001). También se han observado otras formas de transmisión entre humanos que no requieren el paso por el vector. El kala-azar congénito ha sido descrito ocasionalmente en niños de madres infectadas con *L. donovani* en áreas endémicas (Low y Cooke, 1926) y por *L. infantum* en Francia (Blanc y Robert, 1984). La transmisión sexual se ha

descrito en una mujer que no había salido de las islas británicas cuyo marido había contraído la leishmaniosis años antes en el norte de África (Symmers, 1960). La transmisión directa entre adictos a las drogas por vía parenteral (ADVP) por compartir jeringas está ampliamente estudiada (Alvar, 1994, Cruz *et al.*, 2002, Molina *et al.*, 2003, Cruz *et al.*, 2006).

En la leishmaniosis canina también se ha descrito la transmisión directa a través de transfusión (Owens *et al.*, 2001) y la vertical en tres cachorros nacidos de una hembra con leishmaniosis crónica (Mancianti y Sozzi, 1995). El hecho de aislar el parásito en el semen de perros infectados hace pensar que la transmisión sexual puede ser posible en el perro aunque se desconoce el relieve epidemiológico que ésta pueda tener (Riera y Valladares, 1996).

2. LOS VECTORES

La vehiculación de las especies del género *Leishmania* se realiza a través de dípteros nematóceros de la familia *Psychodidae*, subfamilia *Phlebotominae*. La identificación de los flebotominos como vectores fue llevada a cabo por primera vez por Adler y Theodor en 1925. Se distribuyen preferiblemente en zonas intertropicales y templadas, aunque alcanzan los 50° N (Suroeste de Canadá) y los 40° S y entre los 0 y los 3.300 m sobre el nivel del mar (Killick-Kendrick, 1999).

En el Nuevo Mundo todas las especies pertenecen al género *Lutzomyia* y en el Viejo Mundo al género *Phlebotomus* (WHO, 1990).

Se trata de pequeños dípteros hematófagos de 2 a 3 mm, con alas peludas y puntiagudas. Su máximo de actividad en climas mediterráneos va desde el crepúsculo hasta la medianoche, entre los meses de junio a septiembre, siempre que la temperatura no sea superior a los 18 °C y no sople viento (Killick-Kendrick *et al.*, 1984).

De las más de 600 especies de flebotominos descritas, únicamente unas 30 son vectoras probadas o sospechosas de transmitir las leishmaniosis (Killick-Kendrick, 1990a, WHO, 2006). En España se han descrito un total de 11 especies, 10 de *Phlebotomus* y 1 de *Sergentomyia* (Gil Collado *et al.*, 1989, Gállego *et al.*, 1992). En Cataluña se conocen cinco especies de flebotomos, *Phlebotomus ariasi* (Tonnoir, 1921), *P. mascittii* (Rioux *et al.*, 1984), *P. papatasi* (citado en Gil Collado, 1927), *P. perniciosus* (Nájera Angulo,

1935) y *P. sergenti* (Nájera Angulo, 1943) además de *Sergentomyia minuta* (Nájera Angulo, 1943), aunque únicamente *P. perniciosus* y *P. ariasi* son responsables probados de la transmisión de la leishmaniosis (Rioux *et al.*, 1967, Rioux *et al.*, 1986a, Bettini *et al.*, 1986, Lucientes *et al.*, 1988, Gil Collado *et al.*, 1989, Gállego *et al.*, 1992, Guilvard *et al.*, 1996, Gállego, 1997).

La capacidad transmisora de estas especies está relacionada, aparte de con los caracteres intrínsecos i extrínsecos, con su tropismo trófico. *P. perniciosus*, principal vector de *L. infantum* en la Península Ibérica, no posee una marcada afinidad por el hospedador sino que es oportunista y tiende a alimentarse de aquellos animales a los que tiene mayor acceso (de Colmenares *et al.*, 1995a, Bongiorno *et al.*, 2003). En áreas periurbanas existe un mayor riesgo de transmisión a los humanos por estar éstos en mayor proporción, mientras que en las áreas rurales esta transmisión a los humanos se reduce debido a la mayor proporción de especies animales. También se ha descrito cierta zoofilia para *P. ariasi* y una preferencia por los perros sobre los humanos en aquellos lugares en los que se encuentran los dos (de Colmenares *et al.*, 1995a).

3. LEISHMANIOSIS AUTÓCTONAS

En la cuenca Mediterránea, las leishmaniosis se comportan como zoonosis hipoendémicas con el perro como principal reservorio, causadas por una única especie, *Leishmania infantum* (Portús *et al.*, 1982, Portús *et al.*, 1986, Alvar *et al.*, 1990, Jiménez *et al.*, 1991) transmitida mediante los vectores *Phlebotomus ariasi* y *P. perniciosus* (Rioux *et al.*, 1967, Rioux *et al.*, 1986a, Maroli *et al.*, 1987, Izri *et al.*, 1992, Gállego, 1997).

3.1. LEISHMANIOSIS HUMANA

En nuestro entorno, la leishmaniosis humana se presenta fundamentalmente bajo dos formas clínicas, cutánea y visceral.

La práctica totalidad de las Comunidades Autónomas presenta casos, pero su distribución es más significativa en el litoral mediterráneo y en la meseta central como en Cataluña, Baleares y Castilla la Mancha.

3.1.1. DISTRIBUCIÓN E INCIDENCIA

El primer caso de leishmaniosis visceral de la Península Ibérica fue diagnosticado en un niño de Tortosa (Tarragona) (Pittaluga, 1912). Durante la primera mitad del siglo XX se realizaron varios estudios en Cataluña que indicaron la alta prevalencia de la enfermedad en las comarcas del sur (Baix Ebre, Baix Camp, Ribera d'Ebre, Priorat), en Barcelona y en el área del Baix Llobregat (Sala Ginabreda, 1947, Perepérez, 1947). También se reconoció como un gran problema de salud en toda la costa mediterránea, centro de la península y Extremadura (Botet y Portús, 1993).

La incidencia de la enfermedad pareció reducirse a partir de finales de los años cuarenta debido a la disminución de la densidad del vector tras el uso de insecticidas, sin embargo en la actualidad se considera una zoonosis reemergente.

Actualmente se notifican oficialmente en todo el país unos 120 casos al año de leishmaniosis humana por *L. infantum*, lo que equivale a 0,3 casos por cada 100.000 habitantes. Se trata de una enfermedad con una prevalencia con discreta tendencia al alza, aunque existe una subdeclaración manifiesta y se estima que los datos reales se sitúan sobre los 300 casos (200 de leishmaniosis visceral y 100 de cutánea) (Alvar, 2001). En el caso de Cataluña, según los datos oficiales del *Butlletí Epidemiològic de Catalunya* (BEC), la tasa de incidencia anual media se sitúa en 0,5 casos/100.000 habitantes, con valores superiores a 1 caso/100.000 habitantes en las comarcas agrícolas del sur (Baix Ebre, Garrigues, Priorat, Ribera d'Ebre), aunque se calcula que la incidencia real alcanza el 1,3 casos/100.000 habitantes (Portús *et al.*, 2007).

En España los casos de leishmaniosis declarados son fundamentalmente viscerales. La mayoría de pacientes hasta 1985 eran niños menores de 5 años (Nájera Angulo, 1935, Botet y Portús, 1993), pero en la actualidad, cerca del 80% de los afectados de leishmaniosis humana son adultos inmunocomprometidos (Alvar, 1994), la mayoría de ellos infectados por el VIH. De los 1440 casos declarados entre 1990 y 1998 de coinfección VIH-*Leishmania* en la región mediterránea, 835 lo fueron en nuestro país (Desjeux *et al.*, 2000). Estos elevados niveles de prevalencia en pacientes con SIDA pueden ser debidos a una primoinfección o a la existencia de individuos con infección latente asintomática que, al pasar a ser inmunodeficientes, manifiestan la enfermedad,

cuya frecuencia puede estar incrementada por una transmisión directa en pacientes adictos a drogas por vía parenteral (Alvar *et al.*, 1992, López-Vélez *et al.*, 1998, Cruz *et al.*, 2002, Molina *et al.*, 2003, Cruz *et al.*, 2006).

3.1.2. MANIFESTACIONES CLÍNICAS

La **leishmaniosis visceral**, también llamada *kala azar*, es la forma más severa, consecuencia del fallo de la respuesta inmune de tipo celular del hospedador.

En muchos casos el punto de inoculación puede pasar inadvertido y en otros puede aparecer una lesión primaria no ulcerativa. Tras un período de incubación de más de dos meses, los protozoos alcanzan los órganos diana (bazo, hígado, médula ósea y tejido linfático). En los órganos afectados se forman pequeños granulomas que dañan las vísceras al causar hiperplasia e hipertrofia de los mismos, congestión de los vasos sanguíneos, necrosis de los tejidos y alteraciones de su funcionamiento normal.

La expresión clínica se caracteriza por un síndrome febril, debilidad, sudor nocturno, pérdida de peso, pancitopenia, leucopenia y anemia, hemorragias, hepatoesplenomegalia y afectación renal (Osman *et al.*, 2000, Alvar, 2001, Collin *et al.*, 2004, Murray *et al.*, 2005). Los niños afectados pueden sufrir retraso del crecimiento.

Se produce una activación policlonal de linfocitos B productores de inmunoglobulinas que provoca un aumento de las proteínas séricas totales, lo que, junto a una pérdida de albúmina por la orina, origina una inversión del cociente albúmina/globulina (Alvar, 2001). Los niveles de inmunoglobulina G (IgG) e IgM se elevan lo que conlleva la aparición de inmunocomplejos circulantes que pueden causar glomerulonefritis al depositarse en los riñones (Kharazmi *et al.*, 1982).

En fases más avanzadas en ausencia de tratamiento se puede producir caquexia, sangrado, infecciones secundarias y muerte (Osman *et al.*, 2000, Collin *et al.*, 2004).

En enfermos con coinfección VIH-*Leishmania* el período de incubación puede ser más corto si el momento de la infección coincide con un período de inmunodepresión severa (Alvar *et al.*, 1997). El cuadro clínico es similar al de los no coinfectados (Montalbán *et al.*, 1989, Alvar, 1994), aunque suelen presentarse localizaciones atípicas como lesiones nodulares o ulcerativas a nivel del tracto gastrointestinal y pulmonar (Rosenthal *et al.*, 1988, Berenguer *et al.*, 1989, Laguna *et al.*, 1994, Rosenthal *et al.*, 1995).

La **leishmaniosis cutánea**, llamada también botón de Oriente, cursa habitualmente de forma benigna. Se caracteriza por la ausencia de alteraciones hematológicas y por la rápida instauración de la respuesta celular.

Los parásitos quedan localizados en los fagocitos de la piel, dando origen a una lesión dérmica en la región de la picadura del flebotomo, una pápula eritematosa inespecífica similar a cualquier picadura de mosquito, que se resuelve de forma espontánea o que, tras un período variable de entre una semana y tres meses, da lugar a una lesión específica de leishmaniosis cutánea (García-Almagro, 2005).

La invasión de los macrófagos de la zona por parte de los protozoos da lugar a la formación de un nódulo con infiltración de células plasmáticas, linfocitos y macrófagos que provoca cambios en la estructura de la piel, como hiperplasia y adelgazamiento de la piel, ulceración y desorganización del tejido conectivo.

La lesión puede ser única o múltiple (revisado en García-Almagro, 2005) distinguiéndose formas ulcerativas, papulosas, infiltrativas e impétigo (del Giudice *et al.*, 1998). Las lesiones no tratadas persisten entre 1 y 3 años, aunque se suele producir una curación espontánea, pudiendo dejar como secuela una cicatriz. La respuesta inmune humoral es prácticamente ausente (Moriearty *et al.*, 1982) mientras que la respuesta celular es positiva en los casos de lesiones activas y después de la curación (Pampiglione *et al.*, 1975).

3.2. HOSPEDADORES VERTEBRADOS

La leishmaniosis es una zoonosis en la que distintas especies animales actúan como reservorio del parásito. En su inicio, se trataría de una parasitosis de animales salvajes, con la introducción accidental del hombre en el ciclo bio-epidemiológico del parásito. Cuando el reservorio salvaje desapareció del entorno humano se adoptaron animales domésticos para substituirlos y mantener la enfermedad.

Para *L. infantum* las especies involucradas como reservorio son fundamentalmente cánidos, entre los que, junto al perro, destacan el zorro (*Vulpes vulpes*) cuya prevalencia de infección, en algunas zonas, es similar a la de los perros (Rioux *et al.*, 1968, Gramiccia *et al.*, 1982, Marín Iniesta *et al.*, 1982, Abranches *et al.*, 1983, Fisa *et al.*, 1999, Portús *et al.*, 2002), el lobo (*Canis lupus*) (Mohebbali *et al.*, 2005) y el chacal (*Canis aureus*) (Hervás *et al.*, 1996, Baneth *et al.*, 1998). La baja densidad de estos

animales y su lejanía del humano los relega a un plano muy secundario como reservorios. Sin embargo, los recientes hábitos peridomésticos de los zorros sugieren que estos animales pueden tener un papel más importante como reservorios que el tradicionalmente asignado.

Otros reservorios citados son los roedores (*Rattus* spp., *Apodemus sylvaticus*...) (Gramiccia *et al.*, 1982, Gradoni *et al.*, 1983, Morillas Márquez *et al.*, 1985).

A lo largo de los años *L. infantum* se ha asociado a distintas especies animales tales como la salamanquesa (*Tarentola mauritanica*) (citado en Nájera Angulo, 1935), la gallina (*Gallus gallus*) (citado en Botet y Portús, 1993), el cordero (*Ovis aries*) (González Barrio, 1931), el hurón (*Mustela putorius furo*) (Orts Ruiz, 1964), el caballo (*Equus caballus*) (Solano-Gallego *et al.*, 2003a, Fernández-Bellon *et al.*, 2006), las cabras (*Capra aegagrus hircus*) y las ovejas (*Ovis aries*) (Portús *et al.*, 2002) y el gato (*Felis silvestris catus*) (Laruelle-Magalon y Toga, 1996, Ozón *et al.*, 1998, Hervás *et al.*, 1999, Poli *et al.*, 2002, Martín-Sánchez *et al.*, 2007, Solano-Gallego *et al.*, 2007a). Sin embargo, no está clara la veracidad de algunas de estas citas, la identidad de la especie de *Leishmania* encontrada en algunos casos ni el verdadero papel como reservorio de algunos de estos animales.

Sin duda, el reservorio doméstico más importante es el perro (*Canis lupus familiaris*), cuyo papel como tal se ha aceptado desde el principio del conocimiento de la enfermedad en España (Fernández Martínez, 1914). El perro actúa como un hospedador amplificador que durante la infección provee al vector de una rica fuente de parásitos localizados a nivel cutáneo y sanguíneo (Lainson, 1988).

3.2.1. LEISHMANIOSIS CANINA

La leishmaniosis canina presenta un carácter endémico en los países de la cuenca mediterránea. Su papel en la transmisión de la leishmaniosis se conoce desde principios de siglo, pocos años después de que se descubriera el parásito en infecciones humanas. En 1908, Nicolle halló en Túnez perros infectados de manera natural. En España y concretamente en Cataluña, en 1913, Pittaluga mencionó el primer caso de leishmaniosis canina en el Delta del Ebro. Posteriormente, en 1936, Sánchez Botija citó el hallazgo de *L. infantum* en piel sana de perros asintomáticos.

Se ha estudiado la importancia del sexo, la edad y la raza del animal en relación con la presentación de la enfermedad. Algunos autores no encuentran que el sexo sea un factor

determinante (Acedo-Sánchez *et al.*, 1996, Morillas-Márquez *et al.*, 1996, Amusátegui *et al.*, 2004), mientras que otros observan una mayor seroprevalencia en machos que en hembras, diferencia causada posiblemente por la mayor mortalidad de las hembras infectadas (Fisa *et al.*, 1999).

En relación a la edad, existe una discrepancia de resultados. Algunos autores observan dos picos de incidencia, uno a los 3 años y otro cuando el perro comienza su declive inmunológico (8-10 años) (citado en Alvar, 2001). En cambio otros autores observan un incremento de la prevalencia de la enfermedad con la edad y una disminución en el grupo de mayor edad explicado por el incremento de la muerte de los animales más viejos (Martínez-Cruz *et al.*, 1990, Acedo-Sánchez *et al.*, 1996, Fisa *et al.*, 1999).

En cuanto a la raza, se considera que todos los perros son susceptibles de infectarse, aunque se ha encontrado que los animales con mayor grado de selección son más susceptibles (Abranches *et al.*, 1991b) y, por otro lado, que algunas razas han desarrollado cierto grado de resistencia como es el caso de los podencos ibicencos (Solano-Gallego *et al.*, 2000).

El Programa de Control y Prevención de la Leishmaniosis (PCPL) de 1991 coordinado por el Ministerio de Sanidad y Consumo, en el que participaron varias Comunidades Autónomas, reunió la información más actualizada hasta entonces en cuanto a prevalencia de la leishmaniosis canina en España (Alvar, 2001).

La mayoría de los estudios epidemiológicos de prevalencia e incidencia de leishmaniosis en el perro se basan en encuestas serológicas. Los datos de seroprevalencia encontrados en dichas encuestas llevadas a cabo en el área mediterránea oscilan dependiendo de la región. En la tabla 1 se exponen algunos de los resultados encontrados. Estos resultados son difíciles de comparar entre sí debido a diversos factores como son la región estudiada, la técnica diagnóstica aplicada, el tamaño de la muestra, el criterio de selección...

Tabla 1: Prevalencia de la leishmaniosis canina en el área mediterránea y Península Ibérica según estudios serológicos:

PAÍS	ÁREA	PREVALENCIA	REFERENCIA
Croacia	Split	42,85%	Živičnjak <i>et al.</i> , 2005
Francia	Alpes	3,2 - 17%	Jambou <i>et al.</i> , 1986
Grecia	Atenas	22,4%	Sideris <i>et al.</i> , 1999
	Noroeste	24,4%	Papadopoulou <i>et al.</i> , 2005
Italia	Apulia	14,4%	Brandonisio <i>et al.</i> , 1992
	Liguria	30,3%	Zaffaroni <i>et al.</i> , 1999
	Toscana	23,9%	Pozio <i>et al.</i> , 1981
Marruecos	Montañas del Rif	21%	Rami <i>et al.</i> , 2003
Portugal	Évora	3,9%	Semiao-Santos <i>et al.</i> , 1995
	Lisboa	8,4%	Abranches <i>et al.</i> , 1991b
Andalucía	Almería	15%	Morillas Márquez <i>et al.</i> , 1992
	Córdoba	23,7%	Martínez Cruz <i>et al.</i> , 1990
	Granada	8,8%	Reyes <i>et al.</i> , 1988
	Málaga	34,6%	Morillas Márquez <i>et al.</i> , 1996
Aragón	Calatayud	13%	PCPL, 1991
	Zaragoza	8,7%	Castillo Hernández <i>et al.</i> , 1985
Castilla la Mancha	Toledo	8,7%	Benito y Alvar, 1989
Castilla y León	Salamanca	10 - 15%	Encinas Grandes <i>et al.</i> , 1988
Cataluña	Barcelona	29,5%	Botet <i>et al.</i> , 1987
Comunidad Valenciana	Alicante	23%	Brazal <i>et al.</i> , 1990
	Castellón	5,1%	Arnedo Pena <i>et al.</i> , 1994
	Valencia	12,8%	Lluch y Soriano, 1990
Extremadura	Cáceres	12,6%	Nieto <i>et al.</i> , 1989
Galicia	Orense	7,5%	Amusátegui <i>et al.</i> , 2004
	Santiago	1,6%	PCPL, 1991
	Valdeorras	29,2%	Amusátegui <i>et al.</i> , 2004
Islas Baleares	Mallorca	14%	Matas y Rovira, 1989
Madrid	Madrid	8%	PCPL, 1991
	Madrid norte	5,25 %	Amela <i>et al.</i> , 1995
Navarra	Navarra	4,4%	PCPL, 1991
Región de Murcia	Murcia	2,4%	Segovia y Martín-Luengo, 1985

PCPL: Programa de Control y Prevención de la leishmaniosis de 1991.

En Cataluña la prevalencia general es de alrededor de un 5%, siendo la comarca del Priorat una de las más afectadas, considerándose una seroprevalencia global de un 10,2% (Fisa *et al.*, 1999). Dentro de esta comarca hay localidades en las que la dicha seroprevalencia alcanza hasta un 20% (Portús *et al.*, 1996). Los veterinarios de esta zona afirman que los casos han aumentado en gran medida en los últimos años, aunque este hecho puede deberse tanto a que realmente haya un mayor número de casos como a la mayor atención aplicada a los animales y a los mejores métodos diagnósticos utilizados lo que se manifiesta en un aumento del número de casos diagnosticados.

Otros estudios llevados a cabo mediante métodos de detección de ADN y de detección de la respuesta celular encuentran tasas más elevadas como el 80% de los perros expuestos al parásito en Francia al analizar muestras de piel y conjuntiva mediante PCR (Berrahal *et al.*, 1996); el 67% de positividad en Mallorca mediante PCR de piel, conjuntiva o médula ósea (Solano-Gallego, *et al.* 2001a); el 27% de los perros de la Comunidad de Madrid manifiestan una respuesta celular específica mediante linfoestimulación (Fernández-Pérez *et al.*, 2000); un 65% de los perros asintomáticos de Portugal evidencian respuesta a *Leishmania* mediante test de linfoestimulación (Cabral *et al.*, 1998) y el 47% de los perros asintomáticos presentan serología o hipersensibilidad cutánea retardada específica (DTH) positiva (Cardoso *et al.*, 1998).

Un gran número de los casos infectados se presentan de forma subclínica, lo que ha dado en llamarse leishmaniosis críptica. La importancia de estas leishmaniosis crípticas ha originado numerosas controversias. Algunos autores consideran que únicamente los perros con síntomas son infectivos para los flebotomos y que la capacidad infestante para el vector por parte de los perros sin sintomatología aparente es muy reducida (Rioux *et al.*, 1972, Gradoni *et al.*, 1987), sin embargo otros no encuentran variaciones significativas en el porcentaje de flebotomos infectados al ponerlos en contacto con perros de sintomatología muy variada (Molina *et al.*, 1994).

Estudios serológicos han revelado un gran número de animales seropositivos asintomáticos (Fisa *et al.*, 1991, Sideris *et al.*, 1999). El seguimiento de estos animales ha demostrado que varios de ellos se encuentran en la fase prepatente de la infección y que incrementan sus títulos de anticuerpos en subsiguientes extracciones. Otros se encuentran en la fase regresiva de la enfermedad y sus niveles de anticuerpos decrecen

en los meses siguientes, y un tercer grupo mantienen sus niveles de anticuerpos sin desarrollar la enfermedad durante varios años (Lanotte *et al.*, 1979, Fisa *et al.*, 1991, Aisa *et al.*, 1998, Fernández-Pérez *et al.*, 1999). Algunos de estos estudios llevados a cabo en poblaciones de perros procedentes del Priorat manifiestan que el número de animales con tasas bajas de anticuerpos, que no alcanzan el umbral de positividad establecido, es muy elevado, alcanzando el 40% de la población (Fisa *et al.*, 1999). La evolución crónica de la enfermedad en el perro, la existencia de formas crípticas, la posibilidad de autolimitarse, la variable respuesta humoral del hospedador y la frecuencia de la infección en el reservorio de zona endémica permite establecer múltiples hipótesis para explicar esta baja tasa de anticuerpos específicos: fase prepatente de la enfermedad, leishmaniosis crípticas, débil respuesta inmune, memoria inmunológica de una infección autolimitada, respuesta humoral frente al parásito inoculado repetidamente sin lograr establecerse... La posibilidad de discernir entre una y otra situación tiene un valor diagnóstico y epidemiológico notable.

3.2.1.1. Manifestaciones clínicas

El período de incubación de la leishmaniosis canina es muy variable, oscilando entre pocos meses y varios años (Ferrer, 2002). La gravedad del cuadro clínico en los animales afectados es variable, yendo desde los casos asintomáticos a los polisintomáticos, en función de diversos factores dependientes tanto del hospedador como del parásito como son la virulencia de la cepa causante de la infección, el estado inmunitario del animal, el tiempo de evolución, los órganos que queden afectados y las terapias aplicadas (Blackwell *et al.*, 1985, Olivier y Tanner, 1987, Roberts *et al.*, 1989, Molina *et al.*, 1994).

La leishmaniosis canina se caracteriza por presentar una patología viscerocutánea cuyas lesiones son resultado, principalmente, de dos mecanismos patogénicos, la producción de reacciones inflamatorias granulomatosas y la producción de inmunocomplejos circulantes (ICC) que se depositan en las paredes de los vasos sanguíneos.

El primer mecanismo es responsable de la aparición de la sintomatología cutánea, de las lesiones hepáticas, entéricas y de parte de las oculares y renales (Ridley y Ridley 1983, Ferrer *et al.*, 1988b).

Las lesiones cutáneas de carácter crónico consisten en áreas depiladas con descamación purpúrea en articulaciones y pliegues cutáneos, hiperqueratosis y despigmentación, ulceraciones en nariz, pabellón auricular... (Ferrer, 1999). Ferrer *et al.* (1988b) han considerado que se pueden reconocer cuatro tipos de lesiones cutáneas características: alopecia y descamación, dermatosis ulcerativa, enfermedad nodular generalizada y enfermedad pustular generalizada.

A nivel visceral, se produce linfadenopatía generalizada en la mayoría de casos (Abranches *et al.*, 1991a), espleno y hepatomegalia, médula ósea de consistencia gelatinosa y de color rojo intenso. Se observan edemas, pérdida de sangre mediante las heces por degeneración del epitelio intestinal debido a la inflamación crónica que provoca la degeneración del epitelio del intestino grueso (González *et al.*, 1990) o por la nariz, fruto de una ulceración de la mucosa nasal (epistaxis), pérdida de peso, vómitos y diarrea (Hernández-Rodríguez *et al.*, 1987, Ferrer, 1999).

Los trastornos oculares que se presentan son conjuntivitis mucosa, blefaroconjuntivitis, queratitis, uveítis con la detección de inmunoglobulinas anti-*Leishmania* en el humor acuoso, así como infiltrados linfocitarios de células plasmáticas y macrófagos infectados con amastigotes en diferentes estructuras oculares (García-Alonso *et al.*, 1996).

La deposición de ICC es responsable de la vasculitis (Cochrane y Koffler, 1973, Pumarola *et al.*, 1991), poliartritis (Spreng, 1993), uveítis (Dernouchamps *et al.*, 1977, García-Alonso *et al.*, 1996) y glomerulonefritis (Mancianti *et al.*, 1989, Poli *et al.*, 1991, Nieto *et al.*, 1992). Esta glomerulonefritis, inicialmente reversible, puede evolucionar a una forma terminal o irreversible en la que el animal presenta una insuficiencia renal grave con anemia, poliuria, polidipsia, uremia y vómitos (Valladares, 1998, Ferrer, 1999).

Se presenta polipnea, caquexia, trastornos de la locomoción, anormalidades de la forma o del crecimiento de las uñas (onicogriposis), úlceras interdigitales, astenia, apatía, somnolencia, anorexia, palidez de mucosas y fiebre (Ferrer, 1999).

También son importantes las alteraciones de la analítica laboratorial, de mayor a menor: hiperglobulinemia, hipoalbuminemia, aumento de los niveles de proteínas séricas totales, aumento de los niveles de alanina aminotransferasa, trombocitopenia, leucopenia, leucocitosis y proteinuria, (Keenan *et al.*, 1984).

En el período de resolución la mayoría de los órganos del perro están afectados debido a una diseminación generalizada del parásito y la muerte se produce por fallo renal (Ferrer, 1989).

3.2.2. LEISHMANIOSIS FELINA

La leishmaniosis felina es conocida desde antiguo, aunque no ha sido hasta los últimos años cuando se ha empezado a estudiar más profundamente. Desde 1911 hasta 1996, se publicaron tan solo 40 casos (revisado en Laruelle-Magalón y Toga, 1996), aunque recientemente se han encontrado casos en Francia (Ozon *et al.*, 1998, Pratlong *et al.*, 2004), España (Hervás *et al.*, 1999, Martín-Sánchez *et al.*, 2007, Solano-Gallego *et al.*, 2007b) e Italia (Poli *et al.*, 2002, Pennisi *et al.*, 2004).

En los gatos, la leishmaniosis se puede presentar bajo forma cutánea o visceral, aunque las formas cutáneas sin localización visceral son las más frecuentemente descritas (Bonfante-Garrido *et al.*, 1991, Ozon *et al.*, 1998, Hervás *et al.*, 1999), mientras que las formas viscerales caracterizadas por una leishmaniosis diseminada han sido detectadas más raramente (Laruelle-Magalón y Toga, 1996, Hervás *et al.*, 1999).

Desgraciadamente, las alteraciones cutáneas son inespecíficas y pueden estar asociadas con otras alteraciones dérmicas que aparecen frecuentemente en gatos (Laruelle-Magalón y Toga, 1996). Estas lesiones cutáneas incluyen nódulos localizados, úlceras, costras o pápulas, dermatitis generalizada, alopecia, descamación, depilaciones y dermatitis seborreica ulcerativa (Ozon *et al.*, 1998).

La forma sistémica afecta al hígado, el bazo, los nódulos linfáticos y los riñones (Gramiccia y Gradoni, 2005). Se han encontrado casos de anorexia, pérdida de peso severa, deshidratación, inflamación de los nódulos linfáticos, disnea, hepatomegalia y uveítis (Pennisi *et al.*, 2004).

En cuanto a las alteraciones hematológicas se han descrito casos de anemia, leucopenia, hipereosinofilia, trombocitopenia, creatinina elevada, hiperproteinemia e hiperglobulinemia con hipergammaglobulinemia (Ozon *et al.*, 1998, Pennisi *et al.*, 2004). Generalmente se ha encontrado un menor nivel de anticuerpos anti-*Leishmania* en el gato que en el perro (Solano-Gallego *et al.*, 2007b).

4. RELACIÓN HOSPEDADOR-PARÁSITO

En la actualidad son muchos los estudios realizados sobre la relación entre el hospedador y *Leishmania*. Los primeros de ellos se llevaron a cabo con *L. major* utilizando modelos murinos (Nasseri y Modabberi, 1979, Howard *et al.*, 1980, Heinzl *et al.*, 1989, Reiner y Locksley, 1995, Sacks y Noben-Trauth, 2002). Posteriormente se han realizado otros en humanos y en perros con el fin de esclarecer si el modelo murino se adapta al resto de hospedadores (Pinelli *et al.*, 1994, Da-Cruz *et al.*, 1994, Martínez-Moreno *et al.*, 1995, Cabral *et al.*, 1998, Saha *et al.*, 2006).

Existen factores dependientes del hospedador, del vector y del parásito que condicionan el éxito de la infección. Mientras el hospedador despliega estrategias para eliminar al parásito, el vector modula su respuesta y *Leishmania* es capaz de sobrevivir y reproducirse recurriendo a sus propias defensas y manipulando las del hospedador.

4.1. INOCULACIÓN DEL PARÁSITO A TRAVÉS DE LA PIEL E INICIO DE LA INFECCIÓN

Se ha observado que la cepa, la dosis inoculada, el punto de inoculación y el número de inoculaciones, pueden influir en el desarrollo de la infección (Nabors *et al.*, 1995, Nicolas *et al.*, 2000). Así, Nabors *et al.* (1995) han demostrado que, cuando las inoculaciones experimentales de *L. major* se realizan en partes del ratón como la nariz, las orejas, el abdomen o la almohadilla plantar, el desarrollo de la leishmaniosis es menos severa que si se hace en la piel de la base de la columna. Estas diferencias pueden ser debidas a factores tales como la temperatura de la piel, la microvasculación linfática de la zona o la distribución de células epidérmicas de Langerhans.

El vector introduce los promastigotes metacíclicos de *Leishmania* junto con sustancias antiagregantes plaquetarias de su saliva tales como la apirasa (Valenzuela *et al.*, 2001), vasodilatadoras como el maxadilán y la adenosina (Lerner *et al.*, 1991, Ribeiro *et al.*, 1999), e inmunosupresoras como la prostaglandina E2 (Lonardoní *et al.*, 2000), que provocan alteraciones homeostáticas en la zona cercana a la inoculación que interfieren en los mecanismos de defensa del hospedador (Kamhawi, 2000, Alvar, 2001). Se ha

observado, por ejemplo, que los lisados de glándulas salivales del flebotomo provocan una disminución de la secreción *in vitro* de citoquinas de tipo 1 (interleucina 12 [IL-12] e interferón- γ [IFN- γ]) y un aumento de la producción de interleucinas tipo 2 (IL-6 e IL-4) por parte de las células mononucleares humanas (Rogers y Titus, 2003) al igual que en ratones infectados por *L. major* (Mbow *et al.*, 1998), lo que se corresponde con una exacerbación de la enfermedad.

La entrada de los promastigotes en el hospedador vertebrado activa la cascada del complemento, que interviene en la lucha contra *Leishmania* facilitando su eliminación por medio de diferentes procesos como la activación de leucocitos, la opsonización mediante el recubrimiento del promastigote con proteínas como la C_{3b} y la lisis de los promastigotes mediante el complejo de ataque a membrana (MAC) (Roitt y Delver, 2001). *Leishmania* se defiende del sistema del complemento a través de varias estrategias. El lipofosfoglicano (LPG) secretado por los promastigotes previene el ataque de varias subunidades del sistema del complemento como la C_{5b}-C₉ (Puentes *et al.*, 1989). El antígeno de superficie glicoproteico gp63 de *Leishmania* tiene actividad proteasa convirtiendo C_{3b} en C_{3bi} (Brittingham *et al.*, 1995) y es capaz de fosforilar miembros del sistema del complemento e inactivar la cascada (Hermoso *et al.*, 1991).

Una vez en el interior del hospedador, el promastigote interacciona con los neutrófilos polimorfonucleares (PMN) de la zona de la picadura que tienen un doble papel. Por un lado, suponen la primera defensa contra el parásito y por otro, en su interior los promastigotes disfrutan de un refugio que les permite escapar de las acciones adversas del suero y transformarse en amastigotes (Pearson *et al.*, 1983, Laufs *et al.*, 2002).

Las células fagocíticas secretan citoquinas como la IL-8, esencial para atraer nuevos neutrófilos al lugar de la infección (Laufs *et al.*, 2002). Los PMN circulan por el torrente sanguíneo durante un corto período de tiempo (Squier *et al.*, 1995) tras el cual inician su apoptosis. Sin embargo, *Leishmania* es capaz de retrasar dicha apoptosis hasta 24 horas (Aga *et al.*, 2002) para superar así las defensas del hospedador. Los PMN pueden diferenciarse en CD28⁺ o CD28⁻. Los PMN CD28⁺ interactúan con los monocitos-macrófagos, que llegan al lugar de la infección, activan la síntesis de IFN- γ que incrementa la producción de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad tipo II (MHC-II) y se transforman en células presentadoras de antígeno (APC) (Awasthi *et al.*, 2004).

Por otro lado, los macrófagos fagocíticos ingieren PMN CD28- apoptóticos con los parásitos en su interior. De esta manera se activa mínimamente la función microbicida, ya que el parásito penetra en el macrófago enmascarado por la célula apoptótica. Cuando el promastigote es internado en el fagosoma del macrófago, se le fusionan los lisosomas formando el fagolisosoma final, en el interior del cual, los parásitos son destruidos por los enzimas proteolíticos y, sobre todo, mediante los óxidos de nitrógeno como el óxido nítrico (NO), el anión superóxido (O_2^-) y los radicales hidroxilo (OH \cdot) (Locksley y Louis, 1992, Bogdan y Röllinghoff, 1998). Estos radicales libres oxigenados producen la peroxidación de los ácidos grasos de la membrana del parásito y malformaciones cromosómicas que provocan su muerte. *Leishmania* posee varias estrategias de supervivencia a este nivel valiéndose del lipofosfoglicano (LPG). Es capaz de evitar la fusión del fagosoma con el endosoma (Desjardins y Descoteaux, 1997), protegerse frente a las enzimas lisosomales (Eilam *et al.*, 1985) y activar el enzima iNOS (inhibidor del óxido nítrico sintetasa) y de esta manera conseguir dividirse activamente en el interior de los macrófagos (Proudfoot *et al.*, 1996).

En este punto, las APC migran llevando los parásitos desde la zona de inoculación hasta los ganglios linfáticos regionales donde presentan los antígenos de *Leishmania*, a través de las moléculas MHC-II, a los receptores CD4 $^+$ de los linfocitos T para estimular la respuesta de células T (Moll *et al.*, 1993, Axelrod *et al.*, 1994). En esta presentación actúan otras moléculas co-estimuladoras como la CD80 y la CD40 que activan la producción de IL-12. Esta interleucina incrementa la producción de IFN- γ que se une a los receptores de los macrófagos e induce la muerte del parásito (Awasthi *et al.*, 2004). *Leishmania* es capaz de modular los mecanismos defensivos del hospedador inhibiendo la expresión de CD80 lo que resulta en una falta de respuesta de las células T (Awasthi *et al.*, 2004).

4.2. MECANISMOS DE DEFENSA DEL HOSPEDADOR

La respuesta del hospedador frente a la invasión por *Leishmania* viene determinada por factores de tipo genético (genes de susceptibilidad o resistencia), especie de *Leishmania* infectante y su virulencia, vía de infección e inóculo, tipo de célula presentadora de antígeno que interviene, adecuadas señales de coestimulación, antígenos parasitarios

presentados, edad del hospedador, entre otros (Olivier y Tanner 1987, Roberts *et al.*, 1989, Chang *et al.*, 1990, Nabors *et al.*, 1995).

Hay evidencias extraídas de estudios en modelos experimentales y en pacientes humanos y caninos, que demuestran que la eliminación de *Leishmania* requiere el desarrollo de una inmunidad mediada por células ya que los anticuerpos específicos no resuelven la infección por microorganismos intracelulares (Carvalho *et al.*, 1989, Abranches *et al.*, 1991a, Locksley y Louis, 1992, Pinelli *et al.*, 1994, Akuffo *et al.*, 1996, Carrera *et al.*, 1996, Cabral *et al.*, 1998, Miles *et al.*, 2005).

4.2.1. RESPUESTA CELULAR

Son varias las células implicadas en la defensa contra *Leishmania* y varias sus funciones.

Se ha demostrado que las células citotóxicas (Tc o TCD8+) son necesarias para el control de la infección cutánea por *L. major* (Belkaid *et al.*, 2002) debido a que producen una proteína formadora de poros que provoca la lisis osmótica del parásito y a que liberan citoquinas activadoras de macrófagos como el IFN- γ y factor de necrosis tumoral (TNF) (Locksley y Louis, 1992, Müller *et al.*, 1993).

Las *Natural Killer* (NK) contienen un receptor para el fragmento Fc de las inmunoglobulinas y cuando reconocen estas inmunoglobulinas unidas a *Leishmania* provocan su destrucción mediante lisis osmótica. Se ha demostrado que las NK también producen IFN- γ que influye en el desarrollo de las células Th1, jugando un importante papel en la resistencia a la infección (Laskay *et al.*, 1993). Por otro lado, el factor de crecimiento transformador γ (TGF- γ) y la IL-10 inhiben la muerte de *Leishmania* a este nivel, pues disminuyen la actividad de las células NK en los nódulos linfáticos (Bogdan *et al.*, 1990).

Las células cooperadoras (T *helper*, Th o TCD4+) son las que tiene mayor relevancia de entre todas las células implicadas. La presentación de antígenos mediante las moléculas MHC a estas células Th las activa y ocasiona la diferenciación de las células vírgenes Thp hacia una subpoblación Th1 o Th2. La expansión de las células Th1 se asocia, en la leishmaniosis, a la inmunidad protectora y la de Th2 a la progresión o persistencia de la enfermedad (Locksley y Louis 1992, Akuffo *et al.*, 1996, Alexander *et al.*, 1999, Alexander y Bryson, 2005). Esta decantación entre una u otra subpoblación depende de varios factores,

el más relevante de ellos es la presencia de unas u otras citoquinas en los primeros momentos de la infección.

Se ha observado en ratones que la IL-12 producida por macrófagos, y células dendríticas, junto con la IL-4, secretada por linfocitos, constituyen las principales interleucinas involucradas en la determinación temprana de las respuestas Th1 y Th2 respectivamente (Heinzel *et al.*, 1989, Hsieh *et al.*, 1992, Himmelrich *et al.*, 1998, Alexander y Bryson, 2005). Sin embargo, se han demostrado efectos contrarios para la IL-4 en función del momento en que se presente, así que tanto puede favorecer la diferenciación de las células T hacia uno como hacia otro fenotipo (Biedermann *et al.*, 2001).

Las células dendríticas presentadoras de antígeno a través de la interacción entre sus moléculas co-estimuladoras y los correspondientes receptores de las células T *helper* también tienen la capacidad de decantar la maduración de células Th hacia una u otra línea (Sacks y Noben-Trauth, 2002).

En el punto de diferenciación de las células T *helper*, *Leishmania* incide causando alteraciones en el metabolismo del ácido araquidónico de los macrófagos lo que conlleva una falta de expresión de la molécula MHC-II necesaria para la actividad Th1 (Reiner *et al.*, 1987, de Almeida *et al.*, 2003).

Una vez decantadas las células T *helper* hacia una u otra subpoblación, producen citoquinas relacionadas con cada una de ellas que tienen diversas funciones. La transcendencia de algunas de ellas (IL-2, IL-3, IL-5, IL-9, IL-13, TGF- β) está menos estudiada que otras.

- Las células Th1 producen TNF- α , IL-12 e IFN- γ .

El TNF- α es un potente mediador de la inflamación capaz de estimular *in vitro* funciones de monocitos, eosinófilos, neutrófilos, células endoteliales y fibroblastos. En el ratón infectado por *L. major*, el TNF- α puede ser protector a través de su capacidad para inhibir la multiplicación del parásito y reduce así el daño sobre el hospedador (Titus *et al.*, 1989). Por ello, la administración de TNF- α recombinante a ratones infectados con *L. major* mejora el curso de la enfermedad (Titus *et al.*, 1989, Liew *et al.*, 1990).

La IL-12 juega un papel esencial en el desarrollo de la lucha frente al parásito, junto con la IL-18, induce la formación de IFN- γ por parte de los

linfocitos Tc y las células NK murinas (Kato *et al.*, 1997, Munder *et al.*, 1998, Awasthi *et al.*, 2004). Se ha observado que su neutralización convierte los ratones resistentes en susceptibles para la infección por *Leishmania* (Hondowicz *et al.*, 1997).

La cantidad de IFN- γ está inversamente relacionada con la gravedad de la lesión cutánea manifestada en ratones infectados con *L. major*. Así, en las leishmaniosis cutáneas localizadas autolimitadas existe una elevada producción de IFN- γ , mientras que en las leishmaniosis viscerales no controladas se detecta poca o nula cantidad (Akuffo *et al.*, 1996). El IFN- γ es capaz de activar los macrófagos infectados tanto de ratones resistentes como susceptibles para eliminar *L. major* (Liew y O'Donnell, 1993) e inducir el enzima oxido nítrico sintetasa (NOS) que cataliza la formación de NO, mediador de la destrucción del parásito (Cunningham, 2002, Awasthi *et al.*, 2004). Existen otras citoquinas que aumentan la producción de NO en sinergia con el IFN- γ como es el TNF- α (Green *et al.*, 1990, Moll *et al.*, 1990).

El IFN- γ también actúa retroalimentando su secreción mediante dos vías. Por un lado, estimula directamente las células Th1 e inhibe las Th2 y por otro, estimula a los macrófagos para que liberen IL-12, la cual, a su vez, activa las células Th1.

- Las células Th2 segregan otras citoquinas con actividades distintas y generalmente contrarias con capacidad estimuladora de la inmunidad humoral e inhibora de la respuesta tipo Th1.

La IL-6 se considera un marcador de enfermedad activa y de eficacia del tratamiento en la leishmaniosis visceral humana (van der Poll *et al.*, 1995, Ansari *et al.*, 2006).

La IL-4 desactiva los macrófagos ayudando así a las células parasitarias a crecer y hacer progresar la enfermedad (Awasthi *et al.*, 2004), acción que se ha demostrado en estudios *in vitro* y en ratones genéticamente susceptibles (Heinzel *et al.*, 1989, Liew *et al.*, 1989). Estos ratones susceptibles pierden la respuesta celular mediada por NK tras la infección por *L. major* debido a que la IL-4 inhibe la IL-12 (Scharton-Kersten *et al.*, 1995).

La IL-10 mayoritariamente secretada por los macrófagos, células dendríticas y linfocitos T había sido catalogada como citoquina Th2 (Hsieh *et al.*, 1992), aunque recientes estudios llevados a cabo en ratones y en humanos han descubierto su papel supresor en las infecciones parasitarias (Karp *et al.*, 1993, Murphy *et al.*, 2001, Noben-Trauth *et al.*, 2003, Alexander y Bryson, 2005).

4.2.2. RESPUESTA HUMORAL

La respuesta inmunitaria denominada humoral es aquella mediada por anticuerpos específicos contra *Leishmania* segregados por las células B en interacción con las células T y con las citoquinas secretadas por éstas. Dichas inmunoglobulinas tienen diferentes funciones dentro de la defensa inmunitaria como son la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC), la regulación de linfocitos B y la opsonización de promastigotes para su unión y posterior fagocitosis (Herman, 1980, Roitt y Delver, 2001) entre otras.

En cuanto a los diversos isotipos y subclases de inmunoglobulinas específicas, se ha encontrado relación entre su diferente secreción y las respuestas tipo Th1 y Th2. Así, la secreción de IgA por parte de las células B está determinada por la presencia de IL-5 liberada por las células Th2 (Coffman *et al.*, 1987) y la producción de IgE específica en respuesta al antígeno es consecuencia de la presencia de IL-4 secretada por las células Th2 (Yanagihara *et al.*, 1995, Atta *et al.*, 1998). Las células Th1 son inductoras de la producción de IgG2 e IgG3 a través del IFN- γ mientras que las Th2 inducen la producción de IgG1 e IgG4 mediante la IL-4 (Snapper y Paul, 1987, Abbas *et al.*, 1996, Afrin y Ali, 1998). Las IgM son inducidas por ambas células T *helper* (Stevens *et al.*, 1988).

El papel que desempeñan estas inmunoglobulinas en la protección o la patogénesis de pacientes con kala-azar no está esclarecido aún. Estudios recientes postulan que las IgG, no solo fracasan en el mantenimiento de la protección frente a patógenos intracelulares, sino que contribuyen a la progresión de la enfermedad. La administración pasiva de IgG anti-*Leishmania* resulta en un aumento de la lesión de los ratones infectados con *L. major* ya que activa la producción de IL-10 por parte de los macrófagos en vez de la de IL-12 (Miles *et al.*, 2005).

Se ha observado que la producción de inmunoglobulinas varía en función de varios factores como son la forma clínica de la enfermedad, la cantidad de parásitos y la cronicidad de la infección (Pinelli *et al.*, 1994, Carrera *et al.*, 1996, Iniesta *et al.*, 2002, Reis *et al.*, 2006). Como regla general se observa una fuerte respuesta humoral con predominio de las IgG en la leishmaniosis visceral y bajos títulos de inmunoglobulinas en las leishmaniosis cutáneas. En la leishmaniosis canina se ha asociado la presencia de elevados niveles de anticuerpos específicos IgG con trastornos patofisiológicos y fases activas de la enfermedad (Pinelli *et al.*, 1994, Carrera *et al.*, 1996, Iniesta *et al.*, 2002).

Un estudio más detallado de dichas inmunoglobulinas y sus funciones se encuentra en los artículos que conforman esta tesis.

4.3. INMUNOPATOLOGÍA

Las reacciones orgánicas desencadenadas como consecuencia de la parasitación por parte de *Leishmania* de las células del hospedador determinan la aparición de lesiones y síntomas en el animal infectado. Su estado inmunitario influye en gran medida en la patogenia desarrollada pues de él depende la respuesta del organismo. Esta respuesta a la infección cursa con una reacción inflamatoria tisular en los órganos infectados, constituida fundamentalmente por macrófagos y linfocitos, que provoca alteraciones estructurales y funcionales en dichos órganos, como son degeneración de los hepatocitos, tubulonefritis, degeneración de las células epiteliales, entre otras.

Por otro lado, la activación de las células B origina una alta concentración de globulinas (inmunoglobulinas específicas e inespecíficas) y una hiper- γ -globulinemia. La gran cantidad de inmunocomplejos formados por antígenos, inmunoglobulinas y fracciones del complemento que se depositan en vasos sanguíneos, bazo, hígado y riñón causan la sintomatología explicada en el apartado de manifestaciones clínicas de leishmaniosis canina y alteran la capacidad defensiva del organismo.

5. DIAGNÓSTICO DE LA LEISHMANIOSIS

El diagnóstico de la leishmaniosis canina requiere para empezar una buena anamnesis y exploración de los signos y síntomas de la enfermedad explicados anteriormente. Sin embargo, el diagnóstico clínico de la leishmaniosis no es fiable, sobre todo en zonas endémicas, debido a la presencia de animales infectados asintomáticos y a la variedad e inespecificidad de los signos clínicos. Por ello, para identificar los animales infectados es necesario realizar pruebas diagnósticas complementarias, independientemente de la presencia de manifestaciones clínicas.

La prueba diagnóstica inespecífica de primera elección ampliamente utilizada por los veterinarios es la electroforesis de las proteínas del suero, en la que se revela hiperproteinemia, hipoalbuminemia e hiperglobulinemia debido a un aumento de la fracción de las γ -globulinas séricas. Aunque no es una prueba concluyente para el diagnóstico, sí es útil para el seguimiento y control de los animales tratados.

Otras alteraciones hematológicas que pueden orientar en el diagnóstico, a pesar de ser inconstantes, son la anemia, la leucopenia y la granulopenia, la trombocitopenia, el aumento de la urea y la creatinina séricas, el aumento de enzimas hepáticas, triglicéridos, colesterol y alteraciones de las fracciones lipoproteicas.

5.1. MÉTODOS PARASITOLÓGICOS BASADOS EN LA DETECCIÓN DEL PARÁSITO

5.1.1. OBSERVACIÓN DEL PARÁSITO

El método de diagnóstico clásico de la leishmaniosis es la observación al microscopio de las formas amastigotas en preparaciones teñidas de productos patológicos. El producto patológico utilizado suele ser aspirado de médula ósea condrocostal, aspirado de nódulos linfáticos, fracción leucocitaria obtenida de sangre periférica, productos de punción esplénica, biopsia hepática, biopsia del tracto gastrointestinal, líquido pleural... aunque las muestras de elección son: fracción leucocitaria, aspirado ganglionar y aspirado de médula ósea.

En casos de presentarse lesiones cutáneas se parte de muestras del borde indurado de lesiones activas de piel o mucosa tomadas mediante raspado de la lesión, aspiración con aguja, biopsia con aguja o biopsia con *punch*.

Las muestras de tejido extraídas se presionan repetidamente por el lado del corte sobre un portaobjetos. El frotis obtenido se fija con alcohol absoluto y se tiñe. Las tinciones más utilizadas son el colorante Giemsa, el May Grünwald-Giemsa, el Diff-Quick® y la tinción hematoxilina-eosina.

Los amastigotes pueden observarse en el interior de las células o dispersos por el campo ya que los macrófagos cargados de *Leishmanias* pueden romperse.

La detección mediante examen directo es un método de reducida sensibilidad debido a la irregular distribución y escasez de parásitos en las muestras obtenidas. Dicha sensibilidad puede incrementarse mediante técnicas de inmunofluorescencia (Anthony *et al.*, 1987, Sundar y Rai, 2002) o inmunoperoxidasa (Ferrer *et al.*, 1988a).

5.1.2. CULTIVO

Otro método directo que permite el aislamiento del parásito y facilita su detección es el cultivo de la muestra. Los medios más utilizados son los difásicos de agar sangre (medio de Novy-Nicolle-McNeal [NNN] y medio Tobie) y los medios líquidos (Schneider, RPMI 1640, M199, Grace etc.), habitualmente enriquecidos con un 10-30% de suero bovino fetal desactivado (Portús, 1987). Los cultivos se mantienen a 24-26 °C, se examinan al microscopio en busca de promastigotes una o dos veces por semana (según el medio escogido) y se sub-cultivan cada 2 semanas durante tres meses, tiempo tras el cual se descartan como negativos.

Las muestras más habituales para el cultivo son las mismas que para la observación directa: aspirado de médula ósea, de nódulos linfáticos, capa de leucocitos obtenida de sangre periférica... aunque se han encontrado parásitos en otros territorios no tan habituales para el diagnóstico como son la orina y el semen de perros infectados experimentalmente por *L. infantum* (Riera y Valladares, 1996).

Se trata de una técnica larga y que requiere cierta infraestructura que no todos los laboratorios poseen, por lo que no se utiliza rutinariamente para el diagnóstico más que en laboratorios especializados, pero sí para la caracterización de aislamientos (Portús, 1987).

5.1.3. INOCULACIÓN EN ANIMALES

La inoculación de muestras a animales de experimentación (hámster dorado por vía intraperitoneal), puede ser útil en el caso de cepas de difícil crecimiento o de inóculos contaminados ya que el sistema inmune del animal elimina la flora asociada (Marín Iniesta *et al.*, 1982). El sacrificio del animal dos meses después de la infección permite aislar el parásito del bazo.

Esta técnica presenta el inconveniente de positivizar de manera muy tardía (2-3 meses desde la inoculación) y queda restringida generalmente a laboratorios de investigación.

5.1.4. XENODIAGNÓSTICO

Esta técnica consiste en dejar que flebotomos cultivados en laboratorio piquen e ingieran sangre de un paciente sospechoso y posteriormente diseccionarlos en busca de *Leishmanias* en su tubo digestivo.

Se trata de un método muy sensible que se ha utilizado con éxito en el diagnóstico de la leishmaniosis visceral de pacientes inmunodeprimidos (Molina *et al.*, 1999), aunque requiere el establecimiento de colonias de flebotomos difíciles de mantener en el laboratorio, por lo que se aplica únicamente en centros de referencia (Molina *et al.*, 1999, Guarga *et al.*, 2000, Travi *et al.*, 2001).

5.1.5. DETECCIÓN DE ANTÍGENOS CIRCULANTES

La búsqueda de procedimientos mínimamente invasivos ha incentivado el desarrollo de técnicas diagnósticas que permitan evidenciar la presencia de antígenos o agentes parasitarios circulantes en fluidos como la orina, muestra especialmente útil en pacientes humanos con baja producción de anticuerpos, aunque no tan práctica en el caso de los perros debido a la dificultad que conlleva su obtención.

Cabe destacar la detección de parásitos en orina de pacientes afectados de leishmaniosis visceral en Kenia (Mebrahtu *et al.*, 1993), de fracciones proteicas de 72-75 y 123 kDa de *L. infantum* en la orina de enfermos coinfectados por el VIH y de pacientes inmunocompetentes mediante *western blot* (de Colmenares *et al.*, 1995b), así como la

presencia de ADN del parásito en orinas de perros determinada mediante PCR (Solano-Gallego *et al.*, 2007b).

Un nuevo test de aglutinación de látex (KAtex) para la detección de antígenos de *Leishmania* en orina muestra una detección temprana del antígeno y una desaparición rápida tras el tratamiento por lo que la hace especialmente útil en el control postterapéutico en humanos, aunque no ha sido estudiada en profundidad su aplicación en la detección de animales asintomáticos (Attar *et al.*, 2001, Sundar y Rai, 2002, Riera *et al.*, 2004a).

5.1.6. PCR

Desde los años 80 se han desarrollado nuevas técnicas de biología molecular como es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) basada en la detección, la amplificación y el análisis de ácidos nucleicos del parásito. Últimamente se han realizado numerosos trabajos de determinación de *Leishmania* en perros utilizando esta técnica, aunque aún no está estandarizada por lo que cada laboratorio lleva a cabo su propio ensayo con diferentes muestras, métodos de extracción, cebadores... (Lachaud *et al.*, 2001, Lachaud *et al.*, 2002) lo que influye en el resultado. Las muestras utilizadas para aplicarla pueden ser sangre periférica (Mathis y Deplazes, 1995, Fisa *et al.*, 2001), aspirado ganglionar (Mathis y Deplazes, 1995, Reale *et al.*, 1999, Ozbel *et al.*, 2000), médula ósea (Ashford *et al.*, 1995, Roura *et al.*, 1999b, Solano-Gallego *et al.*, 2001a), biopsias tisulares (Roura *et al.*, 1999a, Solano-Gallego *et al.*, 2001a) y conjuntiva ocular (Solano-Gallego *et al.*, 2001a, Strauss-Ayali *et al.*, 2004). Los primeros estudios llevados a cabo mediante esta técnica permitieron diagnosticar gran número de perros negativos mediante serología (Ashford *et al.*, 1995, Berrahal *et al.*, 1996), demostrando así la importancia de los animales portadores asintomáticos y el interés de la PCR en los estudios epidemiológicos.

Las secuencias de ácidos nucleicos escogidas son variadas en función del nivel de especificidad que se busque. Se han utilizado cebadores o *primers* frente a secuencias de ADN de kinetoplasto (Ashford *et al.*, 1995, Reale *et al.*, 1999, Roura *et al.*, 1999b, Ozbel *et al.*, 2000). También se ha utilizado como diana el fragmento ITS (*internal transcribed spacer*), que separa los genes que codifican el ácido ribonucleico ribosomal

(ARNr) (el Tai *et al.*, 2000), los fragmentos que codifican la proteína gp63 (Button y McMaster, 1988) o el antígeno 51 kDa (Berrahal *et al.*, 1996).

Además de la PCR convencional, se han desarrollado otros métodos para incrementar la sensibilidad y mejorar el diagnóstico como la PCR anidada (PCR-*nested*) que realiza dos amplificaciones consecutivas, la segunda de las cuales utiliza como molde el producto de la primera e incorpora cebadores muy específicos (Katakura *et al.*, 1998, Fisa *et al.*, 2001, Fisa *et al.*, 2002) o la PCR a tiempo real (PCR-*real-time*) que permite la cuantificación relativa del ADN presente al principio de la reacción.

Otras técnicas permiten caracterizar especies como la PCR-hibridación que combina la PCR con la de hibridación con sondas específicas en membranas de nylon o nitrocelulosa, de manera que se consigue distinguir entre los subgéneros *Viannia* y *Leishmania* (Rodríguez *et al.*, 1994) y la PCR-múltiple que utiliza dos o más parejas de cebadores simultáneamente y amplifica en la misma reacción varios fragmentos de distinto tamaño (Harris *et al.*, 1998).

Las mayores ventajas que presenta la técnica de PCR son su sensibilidad, la ausencia de interferencias de otros organismos y la automatización de la mayoría de las etapas, aunque los mayores inconvenientes son el riesgo de contaminación de las muestras y la necesidad de infraestructura especializada lo que dificulta que se utilice en estudios de campo, sumado al hecho de su extrema sensibilidad que puede suponer un dilema en el momento de aplicar el tratamiento.

5.2. MÉTODOS BASADOS EN LA DETECCIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE

El diagnóstico indirecto de las leishmaniosis se basa en la puesta en evidencia de la respuesta inmune del hospedador, ya sea de tipo humoral o celular.

5.2.1. DETECCIÓN DE ANTICUERPOS MEDIANTE TÉCNICAS SEROLÓGICAS

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

Existe una amplia gama de técnicas serológicas, entre las que destacan la aglutinación directa (DAT), la inmunofluorescencia indirecta (IFI), la *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA), el Dot-ELISA y el *western blot*. La sensibilidad y la especificidad de cada una de ellas no dependen únicamente de las características inherentes a la propia técnica, sino, en gran medida, del antígeno utilizado.

Para la IFI se utilizan promastigotes enteros lo que aporta una estabilidad de composición al antígeno y, por lo tanto, homogeneidad de resultados. El resto de técnicas pueden utilizar como antígeno el parásito entero o más o menos dividido y/o fraccionado mediante sonicación, congelación-descongelación, uso de tensioactivos... El principal inconveniente de la utilización de estos extractos, solubles o no, radica en la heterogénea composición del antígeno obtenido, que puede variar entre laboratorios y también entre lotes, así como en su estabilidad. Este escollo es salvado mediante las formas liofilizadas de antígeno, estables en ausencia de refrigeración, utilizadas por el DAT en trabajos de campo (el Harith *et al.*, 1988, Neogy *et al.*, 1992, Boelaert *et al.*, 1999, Oskam *et al.*, 1999).

En la actualidad varios laboratorios han desarrollado y probado antígenos recombinantes como el rGBP (proteína recombinante del gen B) de *L. donovani* que ha dado una alta sensibilidad para la detección de leishmaniosis visceral humana y cutánea post kala-azar mediante ELISA (Jensen *et al.*, 1999), el rORFF (proteína recombinante marco abierto de lectura F) de *L. infantum* también mediante ELISA (Raj *et al.*, 1999) o rK9, rK26 de *L. chagasi* mediante *western blot* (Bhatia *et al.*, 1999).

El rk39 ha sido considerado una herramienta muy útil para el diagnóstico de la enfermedad y ha sido ampliamente utilizada tanto en humanos como en perros (Badaró *et al.*, 1996, Scalone *et al.*, 2002). El ELISA utilizando rk39 es un método rápido y simple, aunque se ha encontrado cierta falta de sensibilidad (Iqbal *et al.*, 2002) y, en algunas ocasiones, se ha visto que permanece positivo hasta dos años después del tratamiento exitoso (Zijlstra *et al.*, 1998).

a.- **Contrainmunolectroforesis (CIEF)**

Técnica cualitativa de inmunoprecipitación de alta especificidad y baja sensibilidad útil por tanto como técnica confirmativa en leishmaniosis canina (Mancianti y Meciani, 1988) que está prácticamente en desuso.

b.- Inmunofluorescencia indirecta (IFI)

Es la técnica diagnóstica considerada de referencia recomendada por la oficina *Internacional des Epizooties*, manual para el test diagnóstico (Gradoni y Gramiccia, 2000) debido a que es la más antigua y más extensamente utilizada incluso en la actualidad. El inconveniente que presenta la IFI es la subjetividad en la lectura, la poca idoneidad de la técnica para estudios epidemiológicos debido al gran número de muestras que se deben analizar en estos casos y la existencia de diferentes criterios para establecer el límite de positividad de la muestra relacionado a menudo con los diferentes aislamientos de *Leishmania* utilizados (Pozio *et al.*, 1981, Gradoni *et al.*, 1988, Mancianti y Meciani, 1988, Dye *et al.*, 1993, Pinelli *et al.*, 1994, Martínez-Moreno *et al.*, 1995, Carrera *et al.*, 1996, Acedo-Sánchez *et al.*, 1998, Cabral *et al.*, 1998) sumado a la necesidad de un microscopio de fluorescencia para la determinación.

c.- Aglutinación directa (DAT)

Es una técnica de bajo coste y de uso sencillo que permite detectar niveles bajos de anticuerpos en estadios iniciales y en leishmaniosis crípticas (el Harith *et al.*, 1989). Esta técnica utiliza antígeno entero por lo que posee las mismas ventajas que la IFI relacionadas con el antígeno.

d.- Hemaglutinación indirecta (HAI)

Ésta es una prueba de aglutinación actualmente poco utilizada por presentar heterogeneidad de resultados como consecuencia de las variaciones antigénicas obtenidas al utilizar diferentes métodos de extracción del antígeno (Mancianti y Meciani, 1988).

e.- Aglutinación con partículas de látex

Presenta la ventaja de ser una técnica muy rápida y sensible que se aplica de manera habitual en la actualidad.

f.- ELISA o enzima-inmunoensayo

Presenta una gran sensibilidad y especificidad, así como una elevada reproducibilidad de resultados. La mayor ventaja de esta técnica es su automatización, lo cual permite procesar gran número de muestras a la vez haciendo de ella una técnica apropiada para estudios epidemiológicos, además de la objetividad que presenta la lectura realizada

mediante el espectrofotómetro. Otra ventaja que ofrece este test es la posibilidad de utilizar diferentes antígenos lo que le imprime una gran versatilidad.

Existen diversas modificaciones que imprimen mejoras sobre la técnica de ELISA como son el FAST-ELISA (*Falcon Assay Screening Test-ELISA*) que permite reducir el tiempo de obtención de resultados (Ashford *et al.*, 1993) o el ELISA de competición, técnica sensible y específica para el diagnóstico precoz (Rachamim *et al.*, 1991, Chatterjee *et al.*, 1999).

g.- Dot-ELISA

Es una técnica muy indicada para trabajos de campo por permitir procesar gran número de muestras y no requerir ningún instrumental ya que la lectura se realiza visualmente (Scott *et al.*, 1991, Fisa *et al.*, 1997). Vercammen *et al.* (1998) describieron su alta sensibilidad y especificidad y la ausencia de reacciones cruzadas con otras infecciones parasitarias como babesiosis o tripanosomosis.

h.- Western blot

Se trata de una técnica muy sensible y específica útil para detectar fases iniciales de la infección, momento en el que la respuesta de anticuerpos es muy ligera, ya que su lectura diferencia fracciones antigénicas que permiten detectar reacciones cruzadas frente a otras infecciones y descartar respuestas inespecíficas. Por ello se ha propuesto el uso del *western blot* en perros de zonas endémicas cuando los títulos obtenidos mediante IFI y ELISA muestran valores próximos al umbral de positividad (Aisa *et al.*, 1998). Las desventajas del *western blot* radican en el coste, las dificultades técnicas y la heterogeneidad de patrones de inmunodetección observados debidos a factores de tratamiento del antígeno y de la metodología de trabajo utilizada por diferentes laboratorios (promastigotes en diferentes fases de crecimiento, diferentes grados de reducción, separación de fracciones solubles, concentraciones de acrilamida...) (Abranches *et al.*, 1991a, Rolland *et al.*, 1994, Mancianti *et al.*, 1995, da Costa *et al.*, 1996, Aisa *et al.*, 1998, Fernández-Pérez *et al.*, 2003, Almeida *et al.*, 2005).

i.- Estudios comparativos

Se han establecido numerosas comparaciones entre distintas técnicas serológicas, a pesar de que es muy difícil compararlas ya que las diferencias entre ellas son debidas

tanto a factores intrínsecos como al antígeno utilizado, como se ha explicado anteriormente. Entre otras, Semiao-Santos *et al.* (1995) obtuvieron seropositividades semejantes mediante IFI y ELISA en población canina previamente diagnosticada por DAT. Rachamin *et al.* (1991) hallaron buena correlación entre los sueros de perros identificados como positivos por IFI, ELISA y ELISA de competición, aunque destacaron la falta de correlación entre el título obtenido por IFI y la intensidad de la reacción de ELISA o la inhibición de la misma en ELISA competitivo. Mancianti *et al.* (1996) obtuvieron buenos niveles de sensibilidad y valor predictivo positivo para el Dot-ELISA al compararlo con la IFI, aunque ligeramente inferior a ésta. También encontraron una especificidad inferior en Dot-ELISA que en IFI (86% frente al 100%) y cierta reacción cruzada para el Dot-ELISA que plantea la dificultad de establecer diagnósticos en fases tempranas de la infección mediante esta técnica.

5.2.3. MÉTODOS DIAGNÓSTICOS BASADOS EN LA VALORACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE CELULAR

La respuesta celular frente a *Leishmania* juega un papel importante, aunque no existen demasiados métodos para evaluarla.

a.- Linfoestimulación

Es una técnica que confirma y mide la reacción de proliferación de los linfocitos en cultivo frente a la estimulación antigénica. La linfoestimulación ha sido utilizada en humanos (Moreno *et al.*, 2000), en caballos (Fernández-Bellon *et al.*, 2006) y en perros (Fernández-Pérez *et al.*, 2003) lo que ha permitido identificar animales asintomáticos pero infectados ya sea en condiciones naturales como experimentales (Cabral *et al.*, 1992, Pinelli *et al.*, 1994, Cabral *et al.*, 1998). En el caso de la leishmaniosis canina, la linfoestimulación se ha mostrado menos sensible que otros métodos de diagnóstico como la intradermorreacción (Fernández-Bellon *et al.*, 2005). Algunos autores han detectado una supresión de la respuesta linfoproliferativa al principio de la infección (de Luna *et al.*, 1999) y otros una reacción positiva en individuos no expuestos (Kemp *et al.*, 1992). El mayor inconveniente de esta técnica es su gran complejidad lo que no la hace útil para la práctica diaria.

b.- Test de Montenegro

El test de Montenegro o intradermorreacción (Montenegro, 1926), es útil para el diagnóstico clínico pero, sobre todo, para los estudios epidemiológicos. Se ha utilizado extensamente para determinar la exposición al parásito y también para evaluar la evolución de una leishmaniosis visceral tratada (Pampiglione *et al.*, 1975, Miles *et al.*, 2005). Este test mide la respuesta de hipersensibilidad cutánea retardada específica (DTH) frente a una suspensión estéril de promastigotes de *Leishmania* lisados y fenolizados en solución salina (leishmanina) que pone de manifiesto la presencia de respuesta celular frente a este parásito. Es una técnica sencilla y barata, aunque su mayor desventaja radica en la dificultad de conseguir antígeno estandarizado dado que no existe de manera comercial.

Se ha utilizado tradicionalmente en encuestas epidemiológicas de población humana (Rioux *et al.*, 1986b, Dereure *et al.*, 1989, Souza *et al.*, 1992) y canina (Pinelli *et al.*, 1994, Cardoso *et al.*, 1998, Solano-Gallego *et al.*, 2000, Iniesta *et al.*, 2002, Solano-Gallego *et al.*, 2005, Fernández-Bellon *et al.*, 2005) y recientemente en estudios con donantes de sangre en los que se ha encontrado buena relación con ELISA y *western blot* (Riera *et al.*, 2004b). Se obtiene un resultado positivo en la leishmaniosis cutánea y mucocutánea y negativo en las fases activas de la leishmaniosis visceral. En el caso de la leishmaniosis canina, los animales con sintomatología muestran una DTH negativa al contrario que los infectados asintomáticos que manifiestan una fuerte reacción a la leishmanina (Cabral *et al.*, 1992, Pinelli *et al.*, 1994, Martínez-Moreno *et al.*, 1995, Cardoso *et al.*, 1998).

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Los trabajos realizados sobre la leishmaniosis canina ya expuestos en el capítulo de Introducción han permitido observar que el perfil clínico de esta infección es variable, yendo desde la forma asintomática hasta la patología grave polisintomática y de una evolución con cura espontánea a una resolución fatal. Esta distinta evolución clínica se relaciona fundamentalmente con la respuesta inmune que el hospedador desarrolla a lo largo de la infección y, en consecuencia, con las citoquinas que se producen. La expresión isotípica e idiotípica de anticuerpos durante la infección por *Leishmania* puede estar relacionada con dicha evolución clínica, por lo que su determinación puede proporcionar marcadores de evolución.

Por otro lado, el conocimiento cada vez mayor de la elevada prevalencia de la leishmaniosis canina críptica hace necesario disponer de técnicas capaces de detectarla o, como mínimo, conocer la utilidad (grado de sensibilidad y especificidad) de las existentes para este menester. En efecto, estudios realizados en zonas endémicas de leishmaniosis indican que existe un gran número de perros seropositivos asintomáticos. El seguimiento de estos animales muestra que algunos de ellos se encuentran en la fase prepatente de la infección, que otros se encuentran en la fase regresiva y que otros presentan formas crípticas, sin desarrollar la enfermedad durante varios años (Lanotte *et al.*, 1979, Fisa *et al.*, 1991, Aisa *et al.*, 1998). Estos animales seropositivos asintomáticos cursan generalmente con una baja respuesta de anticuerpos, situada alrededor del umbral de positividad, donde las técnicas serológicas convencionales no distinguen posibles inespecificidades y reacciones cruzadas de verdaderas infecciones.

Por todo ello y en el marco de los estudios que el *Grup de Parasitologia Clínica* de la *Universitat de Barcelona* realiza sobre la leishmaniosis en Cataluña, se planteó el presente trabajo con los siguientes objetivos:

- Determinar la utilidad que puedan tener distintas técnicas parasitológicas, inmunológicas y moleculares para detectar la leishmaniosis críptica en el perro.
- Determinar la expresión de IgG, IgG1, IgG2 e IgE específicas durante distintas fases de la infección por *Leishmania* y su posterior utilidad como marcadoras de evolución en la leishmaniosis canina.

- Determinar si la expresión idiotípica de IgG1 e IgG2, frente a las diferentes fracciones del antígeno de *Leishmania*, puede ser usada como marcador de estadio y de evolución en la leishmaniosis canina.
- Determinar el significado clínico y diagnóstico de la excreción mediante la orina de anticuerpos frente a *Leishmania* por parte de perros infectados.

Otros trabajos realizados con relación a la tesis:

Estudios de epidemiología molecular realizados en áreas endémicas de Cataluña para la leishmaniosis indican que la variabilidad genética de las cepas que circulan por determinados focos es superior a la que se encuentra al analizar las cepas presentes en el perro, por lo que se sospecha que otras especies animales pueden actuar como reservorio (Montoya *et al.*, 2007). Debido a que el gato constituye una importante fuente de alimentación para los flebotomos de estas zonas (de Colmenares *et al.*, 1995a) y a que se conocen citas esporádicas de leishmaniosis felina en la literatura (Laruelle-Magalon y Toga, 1996, Ozón *et al.*, 1998, Hervás *et al.*, 1999, Poli *et al.*, 2002), se planteó

- un estudio seroepidemiológico de la leishmaniosis felina para determinar la extensión de esta infección en nuestro entorno.

RESULTADOS

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

RESPUESTA ESPECÍFICA IgG, IgG1 E IgG2 FRENTE A *Leishmania infantum* EN PERROS SANOS Y ENFERMOS DE ÁREAS ENDEMICAS. EVOLUCIÓN A LO LARGO DE LA INFECCIÓN Y TRAS EL TRATAMIENTO.

Laia Solano-Gallego, Cristina Riera, Xavier Roura, Laura Iniesta, Montserrat Gállego, Josep Enric Valladares, Roser Fisa, Soledad Castillejo, Jordi Alberola, Lluís Ferrer, Margarita Arboix y Montserrat Portús

VETERINARY PARASITOLOGY 2001, Vol. 96, p. 265–276.

En este trabajo realizado conjuntamente con investigadores de diversos departamentos de la *Facultat de Veterinària* de la *Universitat Autònoma de Barcelona*, se estudian cinco grupos de perros: 1) asintomáticos de área endémica (infectados y no infectados) 2) con infección natural, sintomáticos, no tratados 3) asintomáticos de área endémica seguidos durante varios años durante los cuales la serología revirtió de negativa a positiva 4) con infección natural, sintomáticos que recibieron tratamiento específico y 5) con infección experimental, sintomáticos y con tratamiento específico, con el objetivo de determinar la relación entre el nivel de IgG totales, IgG1 e IgG2 específicas anti-*Leishmania* con la evolución de la infección, la respuesta al tratamiento y su valor pronóstico.

Los resultados del ELISA demuestran que las tasas de IgG e IgG2 están correlacionadas entre sí en todos los grupos estudiados y son mayores en perros sintomáticos que en asintomáticos. En cambio el nivel de IgG1 no se correlaciona con el de IgG totales ni con las IgG2.

Tanto en la infección natural como en la experimental, la tasa de IgG1 en el momento del diagnóstico es mayor en el grupo de animales que responden positivamente al tratamiento farmacológico que en los que no responden. El descenso de todas las inmunoglobulinas (IgG, IgG1 e IgG2) es mayor cuando la evolución tras el tratamiento es favorable. Por ello, se considera que bajos niveles de IgG1 post-tratamiento en animales con tasas previas elevadas es un indicador de buen-pronóstico.

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

Laia Solano-Gallego^{a,*}, Cristina Riera^b, Xavier Roura^c,
Laura Iniesta^b, Montserrat Gallego^b, Josep Enric Valladares^a,
Roser Fisa^b, Soledad Castillo^b, Jordi Alberola^a, Lluís Ferrer^d,
Margarita Arboix^a, Montserrat Portús^b

^a *Departament de Farmacologia i Terapèutica, Facultat de Veterinària,
Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Spain*

^b *Laboratori de Parasitologia, Departament de Microbiologia i Parasitologia Sanitàries,
Universitat de Barcelona, Avda. Diagonal s/n, 08028 Barcelona, Spain*

^c *Veterinary Teaching Hospital, Universitat
Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Spain*

^d *Departament de Medicina i Cirurgia Animal, Universitat
Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Spain*

Received 1 August 2000; received in revised form 3 November 2000; accepted 19 November 2000

Abstract

The expression of IgG, IgG1 and IgG2 specific antibodies for *Leishmania infantum* was studied in five groups of dogs in Catalonia (Spain): I, 99 asymptomatic dogs (infected and uninfected) from a highly endemic area for leishmaniosis; II, 139 untreated dogs with clinically patent leishmaniosis; III, 11 naturally infected asymptomatic dogs monitored for up to 5 years since they were found seropositive to *Leishmania* antigen and without treatment; IV, 25 naturally infected dogs with clinically patent leishmaniosis and treated with either meglumine antimoniate and allopurinol or allopurinol alone and V, six experimentally infected dogs, treated with meglumine antimoniate and controlled for 5 years. The levels (ELISA units) of IgG, IgG1 and IgG2 in asymptomatic dogs (group I) were very variable (24 ± 33 , 32 ± 31 and 26 ± 31 , respectively), and, as expected,

Corresponding author. Tel.: +34-93-581-2062; fax: +34-93-581-2217.
E-mail address: Isolano@quiro.uab.es (L. Solano-Gallego).

lower than in ill dogs (group II) (168 ± 34 , 84 ± 71 and 172 ± 31 , respectively). In both groups, the correlation between IgG and IgG2 levels ($r = 0.95$, $P < 0.001$ in group I and $r = 0.63$, $P < 0.001$ in group II) was higher than between IgG and IgG1 levels ($r = 0.01$, $P > 0.05$ in group I and $r = 0.31$, $P < 0.001$ in group II). In group III, IgG and IgG2 expression increased during infection, while IgG1 expression remained the same. In dogs of group IV, IgG levels after 1 year of treatment decreased more in responsive (mean values, 163 ± 42 before treatment (b.t.) and 100 ± 36 after treatment (a.t.)) than in unresponsive dogs (158 ± 29 b.t. and 124 ± 51 a.t.), especially for IgG1 (94 ± 89 b.t. and 20 ± 21 a.t. in responsive dogs and 35 ± 25 b.t. and 22 ± 13 a.t. in unresponsive dogs) rather than for IgG2 (156 ± 16 b.t. and 114 ± 45 a.t. in responsive and 151 ± 11 b.t. and 125 ± 36 a.t. in unresponsive dogs). Similar results were observed in the evolution of experimentally infected animals after consecutive and specific treatments. Overall results show the great variation in *Leishmania*-specific IgG1 expression in asymptomatic and symptomatic dogs, their lack of correlation with that of IgG2 and chemotherapy is more effective in dogs with initially high expression of IgG1. © 2001 Elsevier Science B.V. All rights reserved.

Keywords: *Leishmania infantum*; Immunoglobulins; Response to treatment; Dog

1. Introduction

Canine leishmaniosis, caused by *Leishmania infantum*, is endemic in the Mediterranean basin and its seroprevalence ranges from 10 to 37% (Bettini and Gradoni, 1986; Amela et al., 1995; Fisa et al., 1999). The clinical features of such infection are variable. Some dogs develop active disease, whereas others do not or the disease resolves spontaneously. The immune response to *L. infantum* in the dog is humoral and cellular, which results in a wide array of responses: from resistant dogs with predominant cellular response to susceptible dogs with exaggerated humoral response (Abranches et al., 1991; Pinelli et al., 1994; Carrera et al., 1996; Cabral et al., 1998).

The serological follow-up of natural and experimental *Leishmania* infections in dogs, with or without treatment, has been reported elsewhere. Treatment of ill dogs induces temporary clinical improvement, often accompanied by a decrease in the specific antibody levels (Lanotte et al., 1979; Mancianti et al., 1988; Riera et al., 1999). However, in other cases clinical improvement has not been associated with decrease in the titre of specific antibodies (Ferrer et al., 1995).

Various studies have described the levels of specific *Leishmania* IgG subclasses (IgG1 and IgG2) in ill, asymptomatic and treated dogs, sometimes with conflicting results (Deplazes et al., 1995; Bourdoiseau et al., 1997). The varying immunoresponse of infected animals and the small number of animals studied may account for this controversy. This study aimed to determine the level of *Leishmania*-specific total IgG (IgG), IgG1 and IgG2 antibody responses in the sera of a wide range of canine populations: symptomatic and asymptomatic dogs from endemic areas and naturally and experimentally infected, as well as the evolution of the infection in animals that were either treated with anti-*Leishmania* specific drugs or not. The results of this study may clarify the significance and prognostic value of the *Leishmania*-specific IgG subclasses in canine leishmaniosis.

2. Material and methods

2.1. Animals and sera

Five groups of dogs were established.

Group I. Ninety-nine asymptomatic dogs, infected or not, living in an endemic area (the Priorat, a rural region in the north-east of Spain). Examination for external signs of disease and peripheral blood collection were carried out during the anti-rabies vaccination campaign performed during spring and early summer, coincidental with the start of the phlebotomine season.

Group II. One hundred and thirty-nine naturally infected symptomatic dogs without previous specific chemotherapy. They were examined at the Veterinary Teaching Hospital, Facultat de Veterinària (UAB), and routinely checked for parasitological, serological and general biochemistry analyses (total protein concentration, protein serum electrophoresis, urea nitrogen and creatinine values). Dogs were from 7 months to 11 years old with a mean \pm standard deviation age of 5 ± 3.6 years.

Group III. Eleven asymptomatic dogs from the Priorat area that seroconverted to *Leishmania* antigen. They were monitored for *Leishmania*-specific antibodies and external clinical signs of disease at annual intervals for up to 6 years since they had been found seropositive.

Group IV. Twenty-five naturally infected symptomatic dogs treated at the Veterinary Teaching Hospital, Facultat de Veterinària (UAB). One blood sample was collected before chemotherapy and at least two sera samples were taken during a follow-up of at least 1 year, after specific chemotherapy. Either meglumine antimoniate (20 mg Sb⁵/kg every 24 h \times 30 days) and allopurinol (10 mg every 12 h \times 12 months) (16 dogs) or allopurinol alone (10 mg every 12 h \times 12 months) (9 dogs) were administered, according to the clinician criteria. All dogs were routinely checked for signs of disease and for general biochemistry analyses (total protein concentration, protein serum electrophoresis, urea nitrogen and creatinine values).

Group V. Six beagle dogs experimentally infected by intravenous inoculation of 5×10^7 promastigotes in 0.5 ml of saline solution of *L. infantum* (MCAN/ES/92/BCN-83/MON-1). They were kept at the Animalarium in the Facultat de Veterinària (UAB). All were subjected to treatment with meglumine antimoniate (20 mg Sb⁵/kg every 12 h \times 20 days); four received a second treatment with liposome-encapsulated meglumine antimoniate (9.8 mg Sb⁵/kg every 24 h \times 20 days) and one was treated again with liposome-encapsulated meglumine antimoniate and allopurinol (10 mg every 12 h \times 8 months). They were monitored for 5 years, during which clinical, haematological and parasitological controls were performed under the auspices of the UAB animal care committee.

The sera were stored at -40°C until analyzed.

2.2. ELISA

The ELISA was performed as described elsewhere (Riera et al., 1999). Anti-dog IgG1, IgG2 and IgG conjugated to horseradish peroxidase (Bethyl Laboratories, Montgomery,

TX) were used as second antibodies. The working dilutions for each conjugated antibody were determined according to the titration performed for the lot (1:2000 for anti-dog IgG1, 1:2000 and 1:5000 for anti-IgG2 and 1:15 000 and 1:20 000 for anti-IgG). The reaction was quantified as units (U) related to a positive serum used as calibrator and arbitrarily set at 100 U. The cut-off was established at 20 U for IgG, 22 U for IgG1 and 11 U for IgG2 (mean + 4 standard deviations of 32 dogs from non-endemic areas).

2.3. Delayed test of hypersensitivity

Delayed test of hypersensitivity (DTH) was performed by injection of leishmanin reagent as described elsewhere (Solano-Gallego et al., 2000).

2.4. Statistical analysis

Statistical analysis, Student's *t*-test (paired and independent) and coefficient *r* of Pearson were performed by using the SPSS programme.

3. Results

3.1. *Leishmania*-specific IgG, IgG1 and IgG2 in asymptomatic and symptomatic dogs (groups I and II)

The level of *Leishmania*-specific IgG in asymptomatic dogs from the Priorat endemic area (group I) was very variable and ranged from 1 to 242 U (Fig. 1, Table 1). Only 62 animals were considered seronegative for total IgG (<20 U) according to the cut-off established. The level of the IgG subclasses was also very variable and ranged from 1 to 219 U for IgG1 and from 2 to 229 U for IgG2. The IgG2 rate was correlated with that of total IgG ($r = 0.948$, $P < 0.001$) but the IgG1 rate was neither correlated with IgG2 nor with IgG ($r = 0.086$, $P = 0.395$; $r = 0.008$, $P = 0.934$, respectively). In these dogs, when the levels of IgG and IgG2 were low, that of IgG1 was variable, but when the levels of IgG and IgG2 were high, that of IgG1 was always low.

Table 1
Anti-*Leishmania* specific immunoglobulins (mean and standard deviation) in different groups of dogs^a

Groups of dogs	Total IgG	IgG1	IgG2
I. Asymptomatic, $n = 99$	24 ± 33	32 ± 31	26 ± 31
II. Symptomatic, $n = 139$	168 ± 34	84 ± 71	172 ± 31
IV. Pre-treatment, $n = 25$	164 ± 35	76 ± 77	156 ± 14
IV. Post-treatment, $n = 25$	111 ± 41	22 ± 18	121 ± 40
IV.A. Pre-treatment responsive, $n = 16$	163 ± 42	94 ± 89	156 ± 16
IV.A. Post-treatment responsive, $n = 16$	100 ± 36	20 ± 21	114 ± 45
IV.B. Pre-treatment unresponsive, $n = 9$	158 ± 29	35 ± 25	151 ± 11
IV.B. Post-treatment unresponsive, $n = 9$	124 ± 51	22 ± 13	125 ± 36

^a ELISA values quantified as units (U) related to a positive serum used as calibrator that was considered to have 100 U.

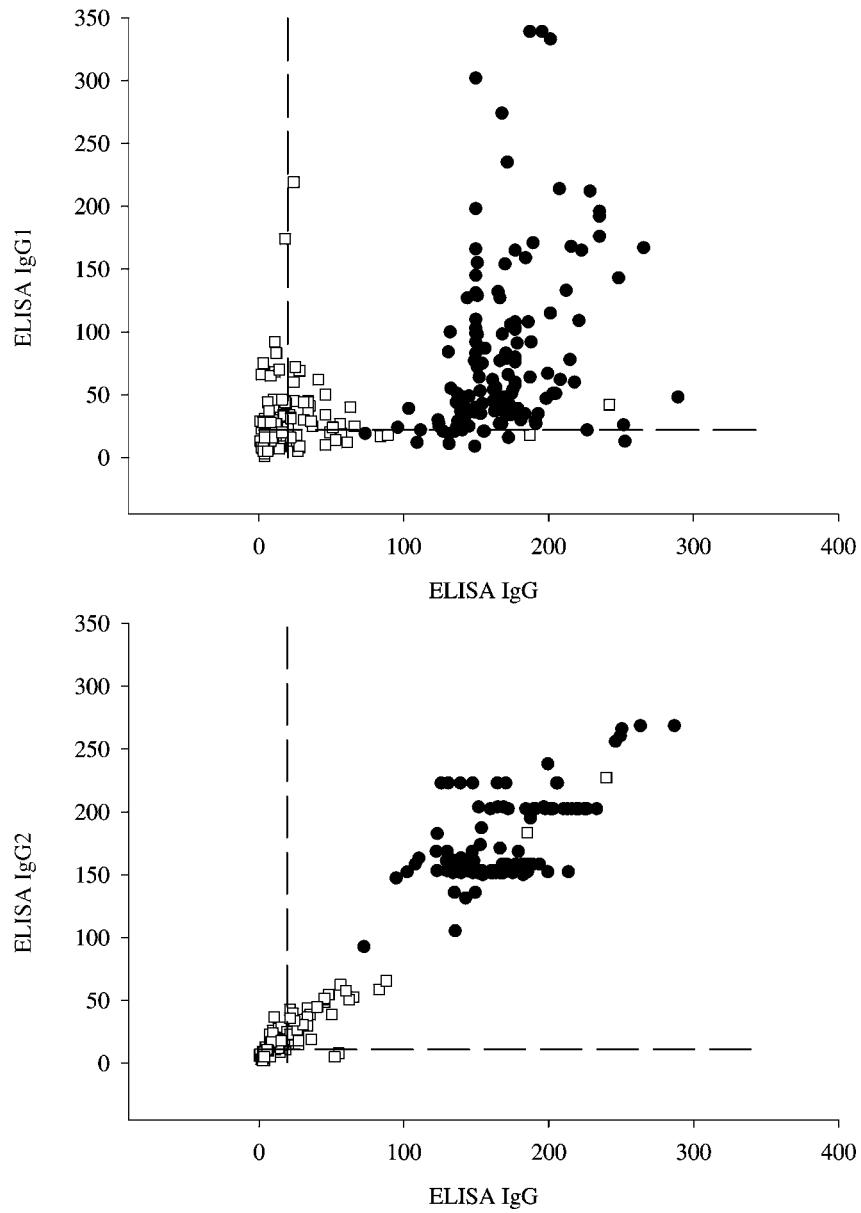


Fig. 1. Anti-*Leishmania* specific immunoglobulins in 99 asymptomatic (□) (group I) and in 139 symptomatic (●) (group II) dogs. Long dash lines, cut-off absorbances for each immunoglobulin.

Table 2
Abnormal clinical and biochemical features in 139 dogs with patent leishmanial disease

	% of dogs
<i>Physical</i>	
Skin involvement	79.7
Lymphadenomegaly	49
Weight loss	35.7
Somnolence (apathy)	33
Abnormal locomotion	16
Diarrhoea	13
Vomiting	10
Ocular lesions	10
Pale mucosae	10
Hyperthermia	10
Abnormal nails	8
Epistaxis	8
<i>Biochemistry</i>	
Ratio albumina/globulines less than 0.59	63.2
Hypergammaglobulinemia	57.8
Hypoalbuminemia	60.1
Hypergammaglobulinemia and hypoalbuminemia	52
Azotemia	24.2
Hypercreatinemia	18.7
High total serum protein	49.2

In ill dogs (group II), the levels of IgG, IgG1 and IgG2 were higher than for group I ($P < 0.001$), as expected. High correlation between IgG and IgG2 levels ($r = 0.631$, $P < 0.001$) and a weaker correlation between IgG and IgG1 ($r = 0.310$, $P < 0.001$) were found, whereas no correlation was observed between IgG1 and IgG2 levels ($r = 0.063$, $P = 0.460$).

The clinical and biochemical features of 139 ill dogs are recorded in Table 2.

3.2. Longitudinal analysis of *Leishmania*-specific IgG, IgG1 and IgG2 in animals that seroconverted (group III)

Eleven dogs from the Priorat region seroconverted to the *Leishmania* antigen during the serological control of leishmaniosis performed in this area every year (Fig. 2). They were followed up until 5 years after seroconversion and showed no external clinical signs of the disease. They were considered infected after detection of seroconversion. The mean values of the antibody response showed that the level of IgG and IgG2 increased during infection. However, the level of IgG1 remained roughly the same.

3.3. Longitudinal analysis of *Leishmania*-specific IgG, IgG1 and IgG2 in treated dogs (group IV)

Leishmania-specific immunoglobulins were measured in 25 ill dogs that were monitored over 1 year a.t. (Tables 1 and 3). Both the antibody level and response kinetics varied between

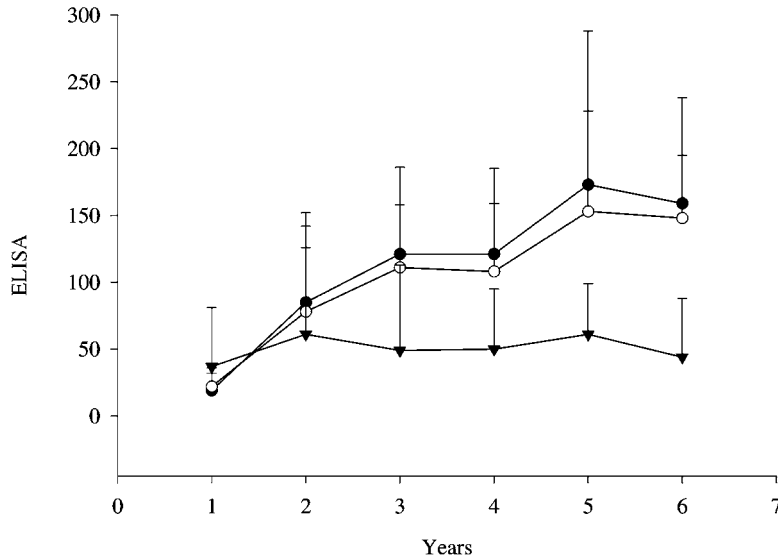


Fig. 2. Anti-*Leishmania* specific immunoglobulins in 11 apparently healthy dogs over time after seroconversion. ELISA: IgG (●), IgG1 (▼) and IgG2 (○) (group III).

the groups studied. We classified the 25 dogs into two groups according to the clinical status of the animal 1 year a.t., irrespective of the treatment received: group IV.A, responsive animals, apparently healthy and with normal biochemistry values (10 were treated with Sb and allopurinol and six with allopurinol alone), and group IV.B, unresponsive animals with signs of disease and/or abnormal biochemistry values (six treated with Sb and allopurinol and three with allopurinol alone). The mean values for total IgG, and IgG2 at diagnosis in groups IV.A and IV.B were not different (Student's *t*-test, $P > 0.05$). However, the mean value for IgG1 at diagnosis in group IV.A (94 ± 89) was higher than in group IV.B (35 ± 25) (Student's *t*-test, $P = 0.02$). When the 25 treated dogs were considered, the mean rates of

Table 3
Leishmania-specific immunoglobulins levels and clinical outcome in 25 treated dogs

Levels of <i>Leishmania</i> -specific immunoglobulins		Treatment outcome	
Before treatment	After treatment	Responsive, $n = 16$	Unresponsive, $n = 9$
High level of IgG, IgG1 and IgG2, $n = 12$	High level of IgG and IgG2 remained. IgG1 level decreased	3	1
	High level of IgG, IgG1 and IgG2 remained	1	0
	Level of IgG, IgG1 and IgG2 decreased	6	1
High level of IgG and IgG2 and low level of IgG1, $n = 13$	Level of IgG, IgG1 and IgG2 remained	2	5
	Level of IgG, IgG1 and IgG2 decreased	4	2

total IgG, IgG1 and IgG2 significantly decreased a.t. (paired Student's *t*-test, $P < 0.001$). In group IV.A, the mean levels of IgG, IgG1 and IgG2 also decreased notably a.t. (paired Student's *t*-test, $P < 0.01$). The decrease was less obvious in dogs from group IV.B (paired Student's *t*-test, $P = 0.048$ for IgG, $P = 0.053$ for IgG2 and $P = 0.112$ for IgG1). Individual results are shown in Table 3.

3.4. Longitudinal analysis of IgG, IgG1 and IgG2 in experimental canine leishmaniosis after infection and treatment (group V)

Fig. 3 represents the evolution of the total IgG, IgG1 and IgG2 of six dogs experimentally infected with *L. infantum*. After inoculation, once the animals showed a pathological protein serum electrophoresis, they were treated with a free form of meglumine antimoniate.

Dogs 2c29 and 6839 showed high levels of IgG and IgG2 but low levels of IgG1, once the disease appeared. Both animals died of renal failure, one immediately a.t. and the other 1 year later.

Dogs 6835 and 4103 showed high levels of IgG and IgG subclasses at the beginning of the disease. After repeated treatments and a lengthy and extensive follow-up, the levels of IgG and IgG2 decreased slowly. IgG and IgG2 levels remained positive throughout the study, while IgG1 decreased to background levels. These dogs did not have clinical relapses after the second treatment and the DTH to *Leishmania* antigen was positive at the end of the follow-up.

Dog 312854 first presented high levels of IgG and IgG subclasses, which did not decrease after two treatment regimes with free and encapsulated meglumine antimoniate. A third treatment with meglumine antimoniate and allopurinol resulted in a clinical and biochemical improvement. The level of IgG1 decreased but IgG and IgG2 remained high.

Dog 2c61 had high levels of IgG and IgG2 but low levels of IgG1 at the beginning of the disease. Its IgG profile remained the same until the end of the follow-up. The disease evolved gradually and became chronic after the second treatment. Its DTH to *Leishmania* antigen and that of dog 312854 at the end of the study were negative.

4. Discussion

Many studies have aimed to associate the polarised T-cell helper responses with *Leishmania* infections. Cytokines, T-cell subsets and immunoglobulin classes and subclasses have been examined in murine experimental models and in human leishmaniosis in order to understand the immunological mechanisms that control parasite persistence and multiplication.

Specific *Leishmania* IgG subclasses (IgG1 and IgG2) were first described in dogs with clinical patent disease and in treated dogs by Deplazes et al. (1995), who report that ill animals initially present high levels of both *L. infantum*-specific IgG1 and IgG2. After long treatment and clinical improvement, the level of IgG1 decreases and that of IgG2 remains constant. These authors suggest that titres of specific IgG1 and IgG2 are more reliable indicators of disease status than total IgG. They also hypothesise the association of IgG2 with an asymptomatic infection and that of IgG1 with the development of the disease.

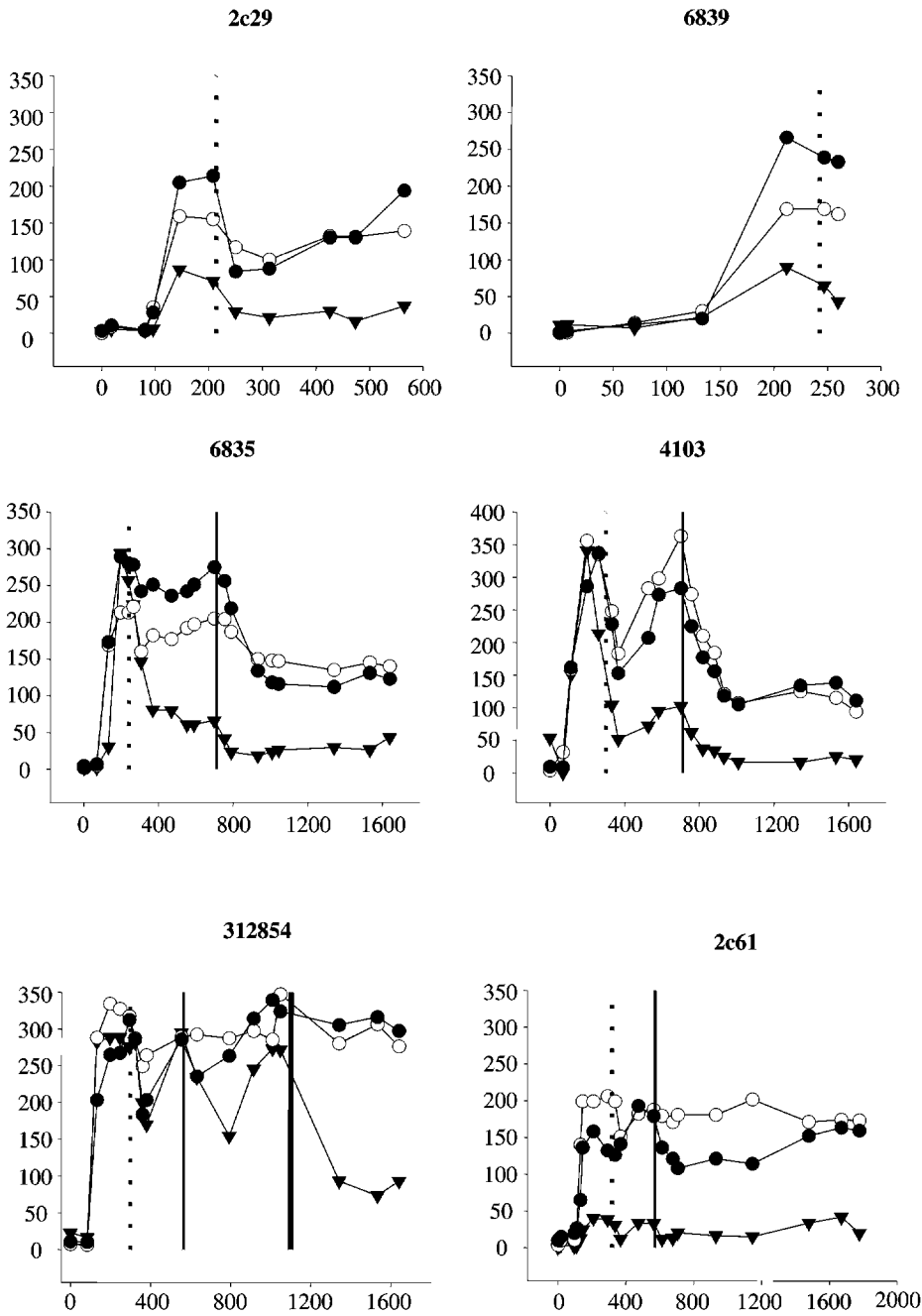


Fig. 3. Anti-*Leishmania* specific immunoglobulins in six experimentally infected dogs after infection and treatment. ELISA: IgG (●), IgG1 (▼) and IgG2 (○). Dotted lines, first treatment; heavy lines, second treatment; extra heavy line, third treatment. Y-axis, ELISA; X-axis, days after infection (group V).

This expression of IgG subclasses in asymptomatic and symptomatic dogs, b.t. and a.t. is not described by Bourdoiseau et al. (1997). Nieto et al. (1999) report a direct correlation between the appearance of clinical signs of canine leishmaniosis and high levels of both IgG1 and IgG2 in experimental infections.

Here, the study of several large cohorts of dogs highlights these discrepancies. The levels of total IgG and IgG2 were correlated in all the groups studied (asymptomatic, symptomatic and naturally and experimentally infected treated dogs) and, as expected, they were significantly higher in symptomatic than in asymptomatic dogs. However, the correlation between IgG1 and IgG was very variable, in agreement with a previous report (Solano-Gallego et al., 2000), which has failed to correlate IgG subclasses in an asymptomatic canine population. Here, the asymptomatic canine population is composed by uninfected and infected dogs with differential immune responses to the parasite. If the cut-off for IgG (>20 U) is considered a tool for distinguishing infected and uninfected animals, non-infected animals (IgG < 20 U) have a variable IgG1 response, but asymptomatic infected animals (IgG > 20 U) have a low IgG1 response (Fig. 1). This low IgG1 response remains during the infection even when IgG and IgG2 responses significantly increase (Fig. 2).

In the naturally and experimentally infected symptomatic dogs, total IgG and IgG2 were high, as reported (Deplazes et al., 1995; Bourdoiseau et al., 1997; Cavaliero et al., 1999), whereas IgG1 was extremely variable, ranging from background to high levels. Cavaliero et al. (1999) reported that IgG1 concentrations at the beginning of treatment were not as high as described by other authors (Deplazes et al., 1995).

After treatment, anti-parasite IgG and IgG2 levels decrease very slowly and IgG1 expression drops quickly in responsive dogs (Deplazes et al., 1995), whereas the decrease in unresponsive dogs is less marked or only temporary. In addition, IgG1 levels at diagnosis were significantly higher in responsive (group IV.A) than in unresponsive dogs (group IV.B), which also showed a large decrease in all immunoglobulins, similarly to experimentally infected dogs. Thus, low levels of IgG1 (Deplazes et al., 1995; Cavaliero et al., 1999) are valuable good prognosis indicators only if detected a.t. in animals with high expression of this immunoglobulin before chemotherapy.

The predominance of levels of specific IgG isotypes should be carefully associated with Th1- or Th2-like activity. The immunological mechanisms that regulate the susceptibility or resistance to visceral parasitism by *Leishmania* are still unclear. The polarised Th1-Th2 response reported in the infection by *L. major* in mice (Locksley and Reiner, 1995; Reed and Scott, 1993) is not so clear in human visceral leishmaniosis (Anam et al., 1999; Mary et al., 1999), in *L. infantum*-infected mice (Kaye et al., 1991; Miralles et al., 1994; Honore et al., 1998), or in *L. infantum*-infected dogs (Cabral et al., 1998). A mixed Th1-Th2 response or other T-cell clones are probably involved. A CD4⁺ T-cell population produces IL-5 and IFN- γ in asymptomatic human leishmaniosis (Mary et al., 1999). Other accessory cells and signals, such as CD8⁺ T cells, diverse antigen-presenting cells, variable interleukin interactions and chronicity may be key factors in the modulation of the IgG isotype response in dogs.

Data on the mechanisms that control residual intracellular *L. infantum* infection after chemotherapy and the function of cytokines in this regulation are scarce. However, this study suggests that control of infection after successful chemotherapy in dogs involves an antibody response.

Acknowledgements

The authors are grateful to the inhabitants and veterinarians of the Priorat for their collaboration over many years. We are also indebted to the clinicians of the UAB Veterinary Teaching Hospital and the technicians of the UAB Animalarium for their collaboration and to Robin Rycroft for correcting the English manuscript. This study was supported by projects SAL90-0960, PB94-0865, FIS97-2004, 1997SGR-00341, 1999SGR-00072 and FAIR CT98-4104.

References

- Abranches, P., Santos-Gomes, G., Rachamim, N., Campino, L., Schnur, L., Jaffe, C.J., 1991. An experimental model for canine visceral leishmaniasis. *Parasite Immunol.* 13, 537–550.
- Amela, C., Méndez, I., Torcal, J.M., Medina, G., Pachón, I., Cañavate, C., Alvar, J., 1995. Epidemiology of canine leishmaniasis in the Madrid region. Spain. *Eur. J. Epidemiol.* 11, 157–161.
- Anam, K., Afrin, F., Banerjee, D., Pramanik, N., Guha, S.K., Goswami, R.P., Saha, S.K., Ali, N., 1999. Differential decline in *Leishmania* membrane antigen-specific immunoglobulin G (IgG), IgM, IgE, and IgG subclass antibodies in Indian kala-azar patients after chemotherapy. *Infect. Immun.* 67, 6663–6669.
- Bettini, S., Gradoni, L., 1986. Canine leishmaniasis in the Mediterranean area and its implications for human leishmaniasis. *Insect. Sci. Appl.* 7, 241–245.
- Bourdoiseau, G., Bonnefont, C., Hoareau, E., Boehringer, C., Stolle, T., Chabanne, L., 1997. Specific IgG1 and IgG2 antibody and lymphocyte subset levels in naturally *Leishmania infantum*-infected treated and untreated dogs. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 59, 21–30.
- Cabral, M., O'Grady, J.E., Gomes, S., Sousa, J.C., Thompson, H., Alexander, J., 1998. The immunology of canine leishmaniasis: strong evidence for a developing disease spectrum from asymptomatic dogs. *Vet. Parasitol.* 76, 173–180.
- Carrera, L., Fermin, M.L., Tesouro, M., Garcia, P., Rollan, E., Gonzalez, J.L., Méndez, S., Cuquerella, M., Alunda, J.M., 1996. Antibody response in dogs experimentally infected with *Leishmania infantum*: infection course antigen markers. *Exp. Parasitol.* 82, 139–146.
- Cavaliero, T., Arnold, P., Mathis, A., Glaus, T., Hofmann-Lehmann, R., Deplazes, P., 1999. Clinical, serologic, and parasitologic follow-up after long-term allopurinol therapy of dogs naturally infected with *Leishmania infantum*. *J. Vet. Intern. Med.* 13, 330–334.
- Deplazes, P., Smith, N.C., Arnold, P., Lutz, H., Eckert, J., 1995. Specific IgG1 and IgG2 antibody responses of dogs to *Leishmania infantum* and other parasites. *Parasite Immunol.* 17, 451–458.
- Ferrer, L., Aisa, M.J., Roura, X., Portús, M., 1995. Serological diagnosis and treatment of canine leishmaniasis. *Vet. Rec.* 136, 514–516.
- Fisa, R., Gállego, M., Castillejo, S., Aisa, M.J., Serra, T., Riera, C., Carrió, J., Gállego, J., Portús, M., 1999. Epidemiology of canine leishmaniasis in Catalonia (Spain). The example of the Priorat focus. *Vet. Parasitol.* 83, 87–97.
- Honore, S., Garin, Y.J., Sulahian, A., Gangneux, J.P., Derouin, F., 1998. Influence of the host and parasite strain in a mouse model of visceral *Leishmania infantum* infection. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 21, 231–239.
- Kaye, P.M., Curry, A.J., Blackwell, J.M., 1991. Differential production of Th1- and Th2-derived cytokines does not determine the genetically controlled or vaccine-induced rate of cure in murine visceral leishmaniasis. *J. Immunol.* 146, 2763–2770.
- Lanotte, G., Rioux, J.A., Perieres, J., Vollhardt, Y., 1979. Ecologie des leishmanioses dans le sud de la France. 10 Les formes évolutives de la leishmaniose viscérale canine. Elaboration d'une typologie bioclinique à finalité épidémiologique. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.* 54, 277–295.
- Locksley, R., Reiner, S., 1995. Murine leishmaniasis and the regulation of CD4⁺ cell development. *Molecular Approaches to Parasitology*. Wiley, New York, pp. 455–466.
- Mancianti, F., Gramiccia, M., Gradoni, L., Pieri, S., 1988. 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.* 82, 566–567.

- Mary, C., Auriault, V., Faugère, B., Dessein, A.J., 1999. Control of *Leishmania infantum* infection is associated with CD8⁺ and gamma interferon and interleukin 5 producing CD4⁺ antigen-specific T cells. *Infect. Immun.* 67, 5559–5565.
- Miralles, G.D., Stoeckle, M.Y., McDermott, D.F., Finkelman, F.D., Murray, H.W., 1994. Th1 and Th2 cell-associated cytokines in experimental visceral leishmaniasis. *Infect. Immun.* 62, 1058–1063.
- 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 totals and recombinant antigens of *Leishmania infantum*: correlation with disease progression in canine experimental leishmaniasis. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 67, 117–130.
- Pinelli, E., Killick-Kendrick, R., Wagenaar, J., Bernardina, W., del Real, G., Ruitenber, J., 1994. Cellular and humoral immune response in dogs experimentally and naturally infected with *Leishmania infantum*. *Infect. Immun.* 62, 229–235.
- Reed, S., Scott, P., 1993. T-cell cytokine responses in leishmaniasis. *Curr. Opin. Immunol.* 5, 524–531.
- Riera, C., Valladares, J.E., Gallego, M., Aisa, M.J., Castillejo, S., Fisa, R., Ribas, N., Carrio, J., Alberola, J., Arboix, M., 1999. Serological and parasitological follow-up in dogs experimentally infected with *Leishmania infantum* and treated with meglumine antimoniate. *Vet. Parasitol.* 84, 33–47.
- Solano-Gallego, L., Llull, J., Ramos, G., Riera, C., Arboix, M., Alberola, J., Ferrer, L., 2000. The ibizian hound presents a predominantly cellular immune response against natural *Leishmania* infection. *Vet. Parasitol.* 90, 37–45.

DIAGNOSTIC TECHNIQUES TO DETECT CRYPTIC LEISHMANIASIS IN DOGS

TÉCNICAS DIAGNÓSTICAS PARA DETECTAR LEISHMANIOSIS CRÍPTICA

Laura Iniesta, Salceda Fernández-Barredo, Béatrice Bulle, M^a Teresa Gómez,
Renaud Piarroux, Montserrat Gállego, José M^a Alunda y Montserrat Portús

CLINICAL AND DIAGNOSTIC LABORATORY IMMUNOLOGY, Sept. 2002, Vol. 9, No. 5 p. 1137–1141.

Este estudio, realizado en colaboración con la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid y el laboratorio de *Parasitologie-Mycologie* de la *Université de Franche-Comté* de Besançon (Francia), tiene como objetivo determinar el valor de las diferentes técnicas parasitológicas, moleculares e inmunológicas en el diagnóstico de la leishmaniosis críptica. Para ello se aplican técnicas de examen directo, cultivo, PCR, IFI, ELISA-Proteína A, ELISA-IgG2, *western blot*, DTH y linfoproliferación a 72 perros de zonas endémicas para esta enfermedad.

Se observa que el nivel de IgG2, detectado mediante ELISA, está directamente relacionado con la presencia de desórdenes patofisiológicos en los animales.

Se detecta asociación entre los resultados obtenidos mediante IFI, ELISA-Proteína A y ELISA-IgG2. Sin embargo, el *western blot* y el ELISA-IgG2 aportan resultados independientes entre sí debido posiblemente al diferente tratamiento que sufre el antígeno, lo que provoca que cada técnica identifique una batería de epítomos diferentes.

Los niveles de IgG2 se asocian a las pruebas parasitológicas y a la PCR en los grupos de animales no infectados y con infección evolutiva. Por el contrario, dicha asociación no se observa en el grupo de animales asintomáticos como consecuencia de la baja respuesta humoral en la infección críptica. Por ello se concluye que las técnicas inmunológicas no discriminan claramente entre animales infectados y no infectados y son los métodos parasitológicos y la PCR los que ofrecen resultados más fiables.

Diagnostic Techniques To Detect Cryptic Leishmaniasis in Dogs

Laura Iniesta,¹ Salceda Fernández-Barredo,² Béatrice Bulle,³ M. Teresa Gómez,²
Renaud Piarroux,³ Montserrat Gállego,¹ José M. Alunda,²
and Montserrat Portús^{1*}

Laboratori de Parasitologia, Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona, Barcelona,¹ and Departamento Patología Animal I, Facultat de Veterinària, Universidad Complutense, Madrid,² Spain, and Laboratoire Parasitologie-Mycologie, Faculté de Médecine et de Pharmacie, Université de Franche-Comté, Besançon, France³

Received 26 November 2001/Returned for modification 7 March 2002/Accepted 17 May 2002

This study of several techniques for detecting cryptic leishmaniasis in dogs from areas in Spain where *Leishmania infantum* is highly endemic concludes that immunological techniques (enzyme-linked immunosorbent assay, immunofluorescence antibody test, Western blotting, delayed-type hypersensitivity reaction, and in vitro lymphocyte proliferation assay) do not clearly differentiate between noninfected and infected asymptomatic dogs and that culture and PCR are more reliable diagnostic tools.

Seroepidemiological studies of canine leishmaniasis have revealed a large number of asymptomatic seropositive animals (20, 24). Moreover, in areas where leishmaniasis is highly endemic, a high proportion of apparently healthy animals show low levels of anti-*Leishmania* antibodies. Serological follow-up of these animals has revealed that some of them are in the prepatent infection period, which will lead to increased antibody titers in subsequent blood extractions. Others have regressive forms of the disease, and their antibody levels will decrease in the following months or years; still others maintain low levels of antibodies without developing the disease for many years (1, 11, 12, 17). However, the total number of infected animals is unknown.

The detection of the extent of the infection, particularly among asymptomatic dogs, is of great importance for the control of leishmaniasis. Most epidemiological and control studies of canine leishmaniasis are performed by serological methods. Although such methods are traditionally considered to be more sensitive than parasitological techniques for the diagnosis of the disease, they underestimate the prevalence and incidence of the infection relative to those estimated by culture (10) and PCR (26). Indeed, experimentally infected dogs that develop the disease have an anti-*Leishmania* humoral immunoreponse while those that remain asymptomatic present a cellular response (19). The application of highly sensitive techniques, such as PCR (3, 13) and Western blotting (WB) (1, 8, 11), as well as the optimization of culture (14), have improved the rate of detection of leishmaniasis. Here, we compare the results obtained by various diagnostic methods (direct examination, culture, PCR, enzyme-linked immunosorbent assay [ELISA], WB, delayed-type hypersensitivity reaction [DTH], and a lymphocyte proliferation assay [LPA]) for dogs from two areas in Spain where canine leishmaniasis is endemic, and we

consider the results in the context of the clinical status of the animals.

The study was carried out with 72 animals, 38 of which were from the Priorat, an area in northeast Spain where leishmaniasis is highly endemic. The remaining 34 dogs were from an animal protection society in Madrid, Spain. Animals were selected for the study after extensive serological screening for anti-*Leishmania*-specific antibodies, and subjects were sometimes chosen for screening because of the presence of sick animals in the kennel. In other cases, we picked asymptomatic animals with specific antibodies or under other irregular circumstances. Thus, the dog samples were biased and cannot be considered representative of the whole dog population in the areas studied. Clinical symptoms and lesions consistent with canine leishmaniasis (skin abnormalities, onychogryposis, weight loss, epistaxis, apathy, ocular and other lesions, lymph node and spleen enlargement, etc.) were recorded for all dogs.

Blood was collected by cephalic or jugular venipuncture for complete blood count and biochemical analysis (serum proteins, the renal markers urea and creatinine, and the hepatic markers aspartate aminotransferase and alanine aminotransferase), for detection of anti-*Leishmania* antibodies, and for PCR and LPA. Popliteal lymph node aspirates were obtained for direct examination, culture, and PCR. Needle aspiration skin microbiopsy was also performed to obtain samples for PCR.

Anti-*Leishmania* antibodies were quantitatively detected by an immunofluorescence antibody test (IFAT) and an ELISA for immunoglobulin G2 (ELISA-IgG2) for dogs from Madrid and by ELISAs for protein A (ELISA-protein A) and for IgG2 for dogs from the Priorat. The IFAT was performed by standard methods (8) using a fluorescent conjugated anti-dog IgG (heavy plus light chains; Jackson ImmunoResearch, West Grove, Pa.) at a 1:50 dilution. ELISAs were performed as described elsewhere (22). Horseradish peroxidase-conjugated protein A (dilution, 1:30,000; Sigma, St. Louis, Mo.) and anti-dog IgG2 (dilutions, 1:2,000 to 1:5,000; Bethyl Laboratories, Montgomery, Tex.) were used as second antibodies. The reaction results were quantified in units relative to those of a

* Corresponding author. Mailing address: Laboratori de Parasitologia, Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona, Avda. Diagonal s.n., E-08028 Barcelona, Spain. Phone: 34 93 402 45 00. Fax: 34 93 402 45 04. E-mail: mportus@farmacia.far.ub.es.

positive serum sample that was used as a calibrator and arbitrarily set at 100 U.

WB analyses of sera from the Priorat area were performed at the Faculty of Pharmacy, Barcelona, Spain, as described elsewhere (1). Those sera that developed any of the polypeptide fractions of 14 or 16 kDa, previously reported as 12 and 14 kDa (1), were considered positive. WB analyses of sera from the Madrid area were performed at the Faculty of Veterinary Science, Madrid, as described previously (8). The sera that revealed the polypeptide fractions of 30, 42, 50, and 57 kDa were considered positive, as reported previously (8, 11). The correspondence between positive results detected by each method has been established (S. Méndez, M. J. Aisa, F. J. Fernández-Pérez, L. Iniesta, M. Portús, J. M. Alunda, and M. T. Gómez-Muñoz, submitted for publication).

DNA for PCR analysis was extracted with a PCR template preparation kit (Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany). *Leishmania*-specific oligonucleotide primers A2 (5'-GGG AGAAGCTCTATTGTG-3') and B1 (5'-ACACTCAGGTCT GTAAAC-3') were used to amplify a 650-bp fragment in the internal transcribed spacer region of genomic DNA (4a).

The DTH was performed by inoculation into the skin of the groin of 0.1 ml of *Leishmania infantum* antigen (3×10^8 promastigotes/ml), which was kindly supplied by the Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda, Spain. Reactions were read after 48 h and measured by the ballpoint pen method. The LPA was performed with peripheral blood mononuclear cells as described elsewhere (19).

Crude results are shown in Table 1. Each laboratory (Madrid and Barcelona) applied its current serological tests in addition to the ELISA-IgG2, which was performed in both laboratories with the same conjugates, the same quantification system, and the same calibrator serum. The IgG2 results correlated highly with the ELISA-protein A results (Spearman's rank correlation coefficient, 0.950; $P = 0.000$) and the IFAT results (Spearman's rank correlation coefficient, 0.627; $P = 0.000$). Therefore, to simplify this discussion, only results from the ELISA-IgG2 were included in the statistical analysis and comparison of techniques. In contrast, no correlation was observed between the techniques for detecting the cellular immunoresponse, DTH, and LPA (Spearman's rank correlation coefficient, 0.052; $P = 0.75$), and so the results obtained in each determination were analyzed independently. Attempts to link DTH and LPA findings for use in detecting human leishmaniasis have led to contradictory results. DTH and LPA results correlated in *L. major*-infected children of Jericho (2) and Tunisia (23). Nevertheless, the lymphoproliferative response to the *L. major* antigen by peripheral blood mononuclear cells from Sudanese individuals with a positive leishmania skin test and no history of cutaneous leishmaniasis was similar to the response observed in Danish people with no reported exposure to *Leishmania* parasites (16).

The dogs that were positive by direct examination, culture, PCR, or at least two immunological methods were considered probably infected. Among them, those with external signs of leishmanial disease were considered to be symptomatic and those without external signs of disease, despite the detection of biochemical and hematological (analytical) disorders, were considered to be asymptomatic or to have cryptic infections.

The specific IgG2 levels detected by ELISA were directly

related to the pathophysiological disorders detected during the physical and analytical examinations (Fig. 1). All symptomatic dogs (10 of 10) had high antibody titers as determined by the ELISA-IgG2, while only 35 of 51 animals with cryptic infections were positive by this technique.

The positive and negative results obtained with the techniques were compared two by two by the McNemar and Pearson tests in the whole dog sample studied, in animals considered to be infected (symptomatic and asymptomatic animals) and in those found to have cryptic infections (Table 2). Culture and PCR provided very similar results; they gave the same proportion of positives (McNemar test, $P = 0.629$) and a high degree of association (Pearson test, $P < 0.001$). The culture and PCR results differed for 17 of the 72 dogs studied (10 animals positive by PCR and negative by culture and 7 animals positive by culture and negative by PCR). In 11 of these animals, immunological techniques confirmed the presence of parasites. In three cases PCR was the only positive test, and in two cases only the culture was positive, as confirmed by new samples and repeated analyses.

The humoral immunoresponse, detected as *L. infantum*-specific IgG2 expression, was also associated with PCR and culture results when the whole dog population was considered (Pearson test, $P \leq 0.001$) but was independent of those results when only the animals with cryptic infections were considered. The results obtained by immunological techniques were independent when compared two by two, even when these techniques were considered to have the same target as those of antibody detection (ELISA-IgG2 and WB) or cellular immunoresponse (DTH and LPA) techniques.

The lack of a "gold standard" for diagnosis of asymptomatic infections caused by *L. infantum* is a drawback to epidemiological studies of the disease. Parasitological techniques like direct microscopic examination and culture offer the only reliable evidence of the presence of parasites in a sample. However, direct examination lacks sensitivity when the parasite number is small, and the growth capacity in vitro varies from one *Leishmania* strain to another. Other analytical techniques, such as PCR and immunological methods, lack some specificity and sensitivity.

There is evidence of *Leishmania* persistence inside the host after recovery from the disease (4, 9, 22), and a positive response to *Leishmania* antigen detected by DTH and LPA has been associated with asymptomatic infection (19, 21). However, cellular immunoresponse or low antibody levels may be due to immunological memory rather than to the presence of the parasite in the host, especially in areas of endemicity. Moreover, positive lymphoproliferative responses to *Leishmania* antigen have been observed in nonexposed humans (15).

Whether a dog can be considered infected or uninfected is the key determinant of parameters such as sensitivity, specificity, and predictive values for diagnostic techniques. If we consider that only those animals that are positive by direct examination or culture are parasitized, the sensitivities and specificities of other methods such as PCR and immunological techniques are affected. Therefore, these parameters were not determined in the present study. The arbitrary definition of a cutoff in the ELISA and the lack of a clear separation between positive and negative results

TABLE 1. Clinical and laboratory findings and results of diagnostic methods for visceral leishmaniasis in dogs

Dog ^a	Clinical findings		Test results							
	Signs ^b	Analytical ^c	Direct ex/culture ^d	PCR ^e	ELISA-protein A ^f	ELISA-IgG2 ^g	IFAT-IgG ^h	WB ⁱ	DTH ^j	LPA ^k
B1	+	+	+	+	337	293		+	0	
B2	-	+	+	+	31	21		-	48	
B3	-	-	-	-	40	40		-	80	
B4	+	+	+	+	177	177		+	132	
B5	-	+	-	+	58	51		+	462	
B6	+	+	-	+	174	159		+	100	
B7	+	+	+	+	247	231		+	80	
B8	-	-	-	+	17	11		-	0	
B9	-	+	-	+	13	7		-	0	
B10	-	+	+	+	252	229		+	0	
B11	-	+	+	-	209	184		+	30	
B12	-	-	-	-	33	37		+	0	
B13	-	-	-	-	8	15		-	0	
B14	-	+	-	-	11	13		-	0	
B15	-	-	+	-	30	30		-	117	
B16	-	+	-	-	27	27		-	132	
B17	-	-	-	-	2	18		-	132	
B18	-	+	-	-	12	12		-	100	
B19	+	+	+	+	118	123		+	0	
B20	-	+	+	+	16	24		+	100	
B21	-	+	-	+	24	34		+	144	
B22	-	-	+	+	69	59		+	64	
B23	-	+	+	-	42	59		+	594	
B24	-	-	+	+	20	27		+	675	1.44
B25	+	+	+	+	40	42		-	144	2.02
B26	-	-	-	+	75	72		+	30	
B27	-	-	-	+	29	36		-	360	1.33
B28	-	-	+	+	90	85		+	0	1.36
B29	-	+	-	+	24	27		-	120	
B30	-	+	+	+	69	78		+	418	6.85
B31	-	-	-	+	12	10		+	110	1.85
B32	-	-	-	-	13	16		+	150	
B33	+	+	+	+	258	175		+	400	
B34	-	+	+	+	348	169		+	0	
B35	-	+	+	-	11	4		-	0	
B36	-	+	+	-	12	6		-	0	
B37	-	-	-	-	18	16		+	0	
B38	+	+	+	-	375	173		+	0	
M2	-	-	-	-		56	100	+	75	18.3
M4	-	+	+	-		28	100	-	0	66
M5	-	-	-	-		29	200	+	0	10.7
M7	-	-	-	-		23	100		0	4.93
M10	-	-	-	-		10	100	+	0	2.71
M11	-	-	-	-		16	100		0	9.01
M12	-	-	-	-		16	200	+	0	3.86
M16	-	-	-	-		17	50	+	100	1.01
M19	-	-	-	-		21	100	-	0	5.85
M20	-	-	-	-		14	100	-	0	2.20
M21	-	-	+	+		107	200	+	0	3.99
M23	-	-	-	-		12	100	+	80	3.13
M24	-	+	-	-		16	50	-	460	43.3
M27	-	-	-	-		14	100	+	0	3.72
M29	+	+	+	+		101	400	+	0	1.19
M30	-	+	-	-		44	200	-	0	2.53
M35	-	-	-	-		4	100	+	0	3.28
M36	-	-	-	-		18	100	+	0	1.26
M37	+	+	-	-		63	200		0	2.21
M46	-	+	-	-		36	100	+	0	31.1
M52	-	+	-	+		19	50	-	0	1.57
M57	-	+	+	-		64	400	+	0	1.53
M59	-	+	-	-		23	50	+	0	1.25
M65	-	+	-	-		38	400	+	0	1.19
M71	-	+	+	+		16	50	+	0	6.25
M72	-	+	-	-		25	50	+	0	0.94
M78	-	-	-	-		14	100	+	0	2.37
M79	-	-	-	-		10	100	+	100	5.68

Continued on following page

TABLE 1—Continued

Dog ^a	Clinical findings		Test results							
	Signs ^b	Analytical ^c	Direct ex/culture ^d	PCR ^e	ELISA-protein A ^f	ELISA-IgG2 ^g	IFAT-IgG ^h	WB ⁱ	DTH ^j	LPA ^k
M80	—	+	—	—		74	400	+	0	1.8
M84	—	+	—	—		48	100	+	0	4.17
M85	—	+	+	+		107	400	+	0	0.71
M95	—	+	—	—		11	50		0	2.22
M101	—	+	+	+		124	400		0	9.12
M106	—	+	—	—		16	50	+	0	1.19

^a Designations indicate dogs from Barcelona (B) and Madrid (M).

^b Clinical signs of leishmaniasis.

^c Analytical (biochemical and hematological) disorders.

^d Results of the direct examination and/or culture.

^e PCR was considered positive when one or more samples (blood, skin, and/or lymph node aspirate) were positive.

^f Positivity was established at values of ≥ 24 U.

^g Positivity was established at values of ≥ 20 U.

^h One per dilution of serum. Positivity was established at values of ≥ 200 .

ⁱ WB results were considered positive when they showed any of the polypeptide fractions of 14 or 16 kDa (Barcelona) or of 30, 42, 50, and 57 kDa (Madrid).

^j DTH induration area (square millimeters). Positivity was established at values of ≥ 25 mm².

^k LPA (stimulation index). Positivity was established at values of ≥ 2.5 .

entail a lack of specificity when this cutoff is established to improve the sensitivity of the technique. The low humoral immunoresponse characteristic of asymptomatic animals (4, 19) frequently places their antibody levels at the borderline of detectability, and positive results may be caused by artifacts and cross-reactions. This may account for the association between the PCR and ELISA-IgG2 results for the total dog sample (Pearson test, $P = 0.001$) and for their independence for the sample comprising only animals with cryptic infections. WB analysis is regarded as a highly specific technique, when the specific bands are considered, and is very useful with samples with low antibody concentrations (1, 8, 11, 18). However, bands are difficult to identify, since several antigen fractions have similar molecular weights and subjectivity in reading the results cannot be avoided when very weak bands are detected. This may explain the independent results

(Pearson test, $P > 0.05$) provided by the ELISA-IgG2 and WB. Moreover, since the antigen treatments in the ELISA and WB differed strongly, each technique identified a different set of epitopes, and this explains the lack of association in animal cohorts with a predominance of individuals with low humoral immunoresponses. In conclusion, visceral leishmaniasis in sick dogs from areas of endemicity can be easily diagnosed. It is characterized by a high humoral immunoresponse that is measurable by conventional serological techniques (e.g., IFAT and ELISA) and a high parasite burden that is detectable by parasitological and PCR methods. However, when we deal with asymptomatic animals, particularly in epidemiological studies, immunological techniques do not discriminate between infected and noninfected animals. Antibody detection alone and DTH or LPA, which are used to estimate the infected dog population (5, 6, 7, 25), are not suitable tools,

TABLE 2. Statistical analysis of results (positive/negative) obtained by various diagnostic techniques in three dog cohorts: (i) the whole dog population studied, (ii) dogs considered to be infected with *L. infantum*, and (iii) asymptomatic dogs with a cryptic *Leishmania* infection

Technique(s)	Whole dog sample				Infected dogs				Dogs with cryptic infections			
	<i>n</i> ^a	PP ^b	CC ^c	PMcN ^d	<i>n</i>	PP	CC	PMcN	<i>n</i>	PP	CC	PMcN
Culture-PCR	66	0.000	0.432	0.629	56	0.003	0.369	0.629	47	0.017	0.329	0.607
Culture-IgG2	72	0.000	0.389	0.000	61	0.017	0.293	0.000	51	0.065	0.251	0.001
Culture-WB	67	0.245	0.140	0.001	58	0.489	0.091	0.004	49	0.743	0.047	0.002
Culture-DTH	72	0.577	0.066	0.860	61	0.980	0.003	1	51	0.909	0.016	0.690
Culture-LPA	40	0.583	0.087	0.052	34	0.397	0.144	0.115	31	0.675	0.075	0.031
PCR-IgG2	66	0.001	0.380	0.027	56	0.052	0.252	0.027	47	0.183	0.191	0.041
PCR-WB	62	0.304	0.129	0.008	54	0.636	0.064	0.043	45	0.885	0.035	0.021
PCR-DTH	66	0.086	0.205	1	56	0.280	0.143	0.839	47	0.491	0.100	1
PCR-LPA	35	0.070	0.291	0.210	29	0.020	0.396	0.383	27	0.058	0.343	0.167
IgG2-WB	67	0.085	0.206	0.541	58	0.297	0.136	1	49	0.466	0.104	1
IgG2-DTH	72	0.154	0.166	0.007	61	0.526	0.081	0.001	51	0.583	0.077	0.015
IgG2-LPA	40	0.491	0.108	0.832	34	0.171	0.228	0.503	31	0.332	0.172	1
WB-DTH	67	0.628	0.059	0.008	58	0.745	0.043	0.011	49	0.869	0.024	0.029
WB-LPA	35	0.927	0.016	0.049	31	0.889	0.025	0.118	29	0.653	0.083	0.180
LPA-DTH	40	0.855	0.029	0.027	34	0.656	0.076	0.064	31	0.675	0.031	0.075

^a *n*, number of dogs.

^b PP, Pearson test *P* value.

^c CC, Pearson contingency coefficient.

^d PMcN, McNemar test *P* value.

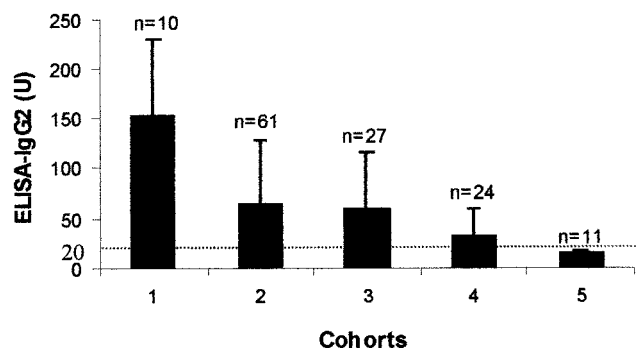


FIG. 1. IgG2 expression in *L. infantum*-infected dogs is related to the pathophysiology. Columns indicate mean values, and error bars indicate standard deviations. Dogs are divided into cohorts as follows: (column 1) symptomatic dogs, i.e., infected animals with external signs of leishmanial disease; (column 2) infected dogs, i.e., animals found positive by direct examination, culture, PCR, or at least two immunological techniques; (column 3) infected asymptomatic dogs with biochemical alterations; (column 4) infected asymptomatic dogs without biochemical alterations; (column 5) noninfected dogs. n, number of dogs in each cohort. The dotted line indicates the cutoff separating positive and negative results.

and parasitological methods and PCR offer more accurate results.

This study was supported by the EU, project FAIR CT98-4104. Financial support was also obtained from the Spanish and Catalan governments, projects PB94-0865 and 1999SGR00072.

We thank the veterinarians and dog owners for their collaboration in sampling and R. Rycroft for correcting the English version of the manuscript.

REFERENCES

- Aisa, M. J., S. Castillejo, M. Gállego, R. Fisa, M. C. Riera, M. de Colmenares, S. Torras, X. Roura, J. Sentís, and M. Portús. 1998. Diagnostic potential of Western blot analysis of sera from dogs with leishmaniasis in endemic areas and significance of the pattern. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **58**:154-159.
- Alvarado, R., C. Enk, K. Jaber, L. Schnur, and S. Frankenburg. 1989. Delayed-type hypersensitivity and lymphocyte proliferation in response to *Leishmania major* infection in a group of children in Jericho. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **83**:189-192.
- Ashford, D. A., M. Bozza, M. Freire, J. C. Miranda, I. Sherlock, C. Eulalio, U. Lopes, O. Fernandes, W. Degraive, R. H. Barker, Jr., R. Badaro, and J. R. David. 1995. Comparison of the polymerase chain reaction and serology for the detection of canine visceral leishmaniasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **53**:251-255.
- Berrahal, F., C. Mary, M. Roze, A. Berenger, K. Escoffier, D. Lamouroux, and S. Dunan. 1996. Canine leishmaniasis: identification of asymptomatic carriers by polymerase chain reaction and immunoblotting. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **55**:273-277.
- Bulle, B., L. Millon, J.-M. Bart, M. Gállego, F. Gambarelli, M. Portús, L. Schnur, and C. L. Jaffe. 2002. Practical approach for typing strains of *Leishmania infantum* by microsatellite analysis. *J. Clin. Microbiol.* **40**:3391-3397.
- Cabral, M., J. O'Grady, and J. Alexander. 1992. Demonstration of *Leishmania* specific cell mediated and humoral immunity in asymptomatic dogs. *Parasite Immunol.* **14**:531-539.
- Cabral, M., J. E. O'Grady, S. Gomes, J. C. Sousa, H. Thompson, and J. Alexander. 1998. The immunology of canine leishmaniasis: strong evidence for a developing disease spectrum from asymptomatic dogs. *Vet. Parasitol.* **76**:173-180.
- Cardoso, L., F. Neto, J. C. Sousa, M. Rodrigues, and M. Cabral. 1998. Use of a leishmanin skin test in the detection of canine *Leishmania*-specific cellular immunity. *Vet. Parasitol.* **79**:213-220.
- Carrera, L., M. L. Fermín, M. Tesouro, P. García, E. Rollán, J. L. González, S. Méndez, M. Cuquerella, and J. M. Alunda. 1996. Antibody response in dogs experimentally infected with *Leishmania infantum*: infection course antigen markers. *Exp. Parasitol.* **82**:139-146.
- Cavaliero, T., P. Arnold, A. Mathis, T. Glaus, R. Hofmann-Lehmann, and P. Deplazes. 1999. Clinical, serologic, and parasitologic follow-up after long-term allopurinol therapy of dogs naturally infected with *Leishmania infantum*. *J. Vet. Intern. Med.* **13**:330-334.
- Dye, C., E. Vidor, and J. Dereure. 1993. Serological diagnosis of leishmaniasis: on detecting as well as disease. *Epidemiol. Infect.* **103**:647-656.
- Fernández-Pérez, F. J., S. Méndez, C. de la Fuente, M. Cuquerella, M. T. Gómez, and J. M. Alunda. 1999. Value of Western blotting in the clinical follow-up of canine leishmaniasis. *J. Vet. Diagn. Invest.* **11**:170-173.
- Fisa, R., M. Gállego, M. Portús, and J. Gállego. 1991. Evolución de la leishmaniasis canina en zona endémica a través de su seguimiento serológico. *Cienc. Vet.* **4**:69-76.
- Fisa, R., C. Riera, M. Gállego, J. Manubens, and M. Portús. 2001. Nested PCR for diagnosis of canine leishmaniasis in peripheral blood, lymph node and bone marrow aspirates. *Vet. Parasitol.* **99**:105-111.
- Howard, M. K., M. M. Pharoah, F. Ashall, and M. A. Miles. 1991. Human urine stimulates growth of *Leishmania* in vitro. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **85**:477-479.
- Kemp, M., M. B. Hansen, and T. G. Theander. 1992. Recognition of *Leishmania* antigens by T lymphocytes from nonexposed individuals. *Infect. Immun.* **60**:2246-2251.
- Kemp, M., A. S. Hey, J. A. L. Kurtzhals, C. B. V. Christensen, A. Gaafar, M. D. Mustafa, A. A. Y. Kordofani, A. Ismail, A. Kharazmi, and T. G. Theander. 1994. Dichotomy of the human T cell response to *Leishmania* antigens. I. Th1-like response to *Leishmania major* promastigote antigens in individuals recovered from cutaneous leishmaniasis. *Clin. Exp. Immunol.* **96**:410-415.
- Lannote, G., J. A. Rioux, J. Perrières, and Y. Vollhardt. 1979. Ecologie des leishmaniasis dans le sud de la France. 10. Les formes évolutives de la leishmaniose viscérale canine. Elaboration d'une typologie bio-clinique à finalité épidémiologique. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.* **54**:277-295.
- Mary, C., D. Lamouroux, S. Dunan, and M. Quilici. 1992. Western blot analysis of antibodies to *Leishmania infantum* antigens: potential of the 14-kD and 16-kD antigens for diagnosis and epidemiologic purposes. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **47**:764-771.
- Pinelli, E., R. Killick-Kendrick, J. Wagenaar, W. Bernadina, G. del Real, and J. Ruitenber. 1994. Cellular and humoral immune responses in dogs experimentally and naturally infected with *Leishmania infantum*. *Infect. Immun.* **62**:229-235.
- Portús, M., R. Fisa, T. Serra, M. Gállego, and M. Mora. 1987. Estudios seroepidemiológicos sobre la leishmaniasis canina en Cataluña. *Med. Vet.* **4**:569-575.
- Rhalem, A., H. Sahibi, N. Guessous-Idrissi, S. Lasri, A. Natami, M. Riyad, and B. Berrag. 1999. Immune response against *Leishmania* antigens in dogs naturally and experimentally infected with *Leishmania infantum*. *Vet. Parasitol.* **81**:173-184.
- Riera, C., J. E. Valladares, M. Gállego, M. J. Aisa, S. Castillejo, R. Fisa, N. Ribas, J. Carrió, J. Alberola, and M. Arboix. 1999. Serological and parasitological follow-up in dogs experimentally infected with *Leishmania infantum* and treated with meglumine antimoniate. *Vet. Parasitol.* **84**:33-47.
- Sassi, A., H. Louzir, A. Ben Salah, M. Mokni, A. Ben Osman, and K. Dellagi. 1999. Leishmanin skin test lymphoproliferative responses and cytokine production after symptomatic or asymptomatic *Leishmania major* infection in Tunisia. *Clin. Exp. Immunol.* **116**:127-132.
- Sideris, V., G. Papadopoulou, E. Dotsika, and E. Karagouni. 1999. Asymptomatic canine leishmaniasis in Greater Athens area, Greece. *Eur. J. Epidemiol.* **15**:271-276.
- Solano-Gallego, L., J. Llull, G. Ramos, C. Riera, M. Arboix, J. Alberola, and L. Ferrer. 2000. The Ibiza hound presents a predominantly cellular immune response against natural *Leishmania* infection. *Vet. Parasitol.* **90**:37-45.
- Solano-Gallego, L., P. Morell, M. Arboix, J. Alberola, and L. Ferrer. 2001. 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.* **39**:560-563.

IMMUNOGLOBULIN G AND E RESPONSES IN VARIOUS STAGES
OF CANINE LEISHMANIOSIS

INMUNOGLOBULINA G Y E EN VARIOS ESTADIOS DE LEISHMANIOSIS CANINA

Laura Iniesta, Montserrat Gállego y Montserrat Portús

VETERINARY IMMUNOLOGY AND IMMUNOPATHOLOGY, 2005, Vol. 103, p. 77-81.

En este trabajo se analizan los niveles de IgG, IgG1, IG2 e IgE específicas anti-*Leishmania* en 109 sueros procedentes de animales de zona de alta endemia (no infectados, con infección asintomática y con infección clínica) y zona no endémica de leishmaniosis, con el fin de determinar la expresión de dichas clases y subclases de inmunoglobulinas en las distintas formas clínicas de la infección.

Los resultados muestran que los niveles de IgG1 e IgE únicamente varían significativamente entre los animales infectados sintomáticos y asintomáticos, pero no entre los infectados asintomáticos y no infectados de áreas endémicas.

Por otro lado, el nivel de IgG e IgG2 desciende consecutivamente entre los grupos de animales infectados sintomáticos, infectados asintomáticos, no infectados de zona endémica y no infectados de zona no endémica. Estas inmunoglobulinas presentes en animales considerados no infectados de zona endémica pueden reflejar la memoria inmunológica de pasadas infecciones o la respuesta frente a inoculaciones parasitarias en animales resistentes que desarrollan una respuesta Th1.

La expresión de IgG e IgG2 se detecta en todos los animales infectados, mientras que la de IgG1 e IgE únicamente se detecta en animales que desarrollan la enfermedad lo que señala su potencial papel como marcadoras de leishmaniosis canina activa.

Immunoglobulin G and E responses in various stages of canine leishmaniosis

Laura Iniesta, Montserrat Gállego, Montserrat Portús*

*Laboratori de Parasitologia, Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona,
Avda. Diagonal s/n, Barcelona, E-08028, Spain*

Received 1 April 2004; received in revised form 27 July 2004; accepted 26 August 2004

Abstract

Pathogenesis in visceral leishmaniosis is associated with depressed cellular immunity and a significant rise of antileishmanial antibodies. We assessed the relative levels of immunoglobulin E anti-*Leishmania infantum*, together with those of IgG, IgG1 and IgG2, using the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) test, in non-infected and infected dogs with or without symptoms, and their association with symptoms to differentiate the stages of the infection. The expression of all immunoglobulins (IgG, IgG1, IgG2 and IgE) was higher in symptomatic dogs than in all other categories. IgG and IgG2 expression was higher in the infected asymptomatic group than in the non-infected group, whereas IgG1 and IgE expression was only higher in symptomatic animals. This correlation between the expression of IgG1 and IgE and the pathology of leishmaniosis points to their potential role as markers of the active disease.

© 2004 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: *Leishmania infantum*; Dog; IgG; IgG1; IgG2; IgE

In canine leishmaniosis, high levels of specific IgG antibodies have been associated with pathophysiological disorders and active phases of the disease (Pinelli et al., 1994; Carrera et al., 1996; Iniesta et al., 2002). Nevertheless, the lack of these immunoglobulins does not rule out leishmanial infection, and positive cultures have been obtained from dogs without or

with low IgG levels (Ashford et al., 1993; Pinelli et al., 1994; Iniesta et al., 2002). Seroepidemiological studies carried out in endemic areas have demonstrated that many asymptomatic dogs have anti-*Leishmania* antibodies (Portús et al., 1987; Abranches et al., 1991; Sideris et al., 1999) that can be maintained for years without leishmanial disease developing (Lanotte et al., 1979; Fisa et al., 1991).

Human visceral leishmaniosis may become firmly established and progress to a symptomatic state associated with Th2-cell type response (Carvalho et al., 1985, 1992; Sundar et al., 1997). The IgG subclasses in Sudanese, Venezuelan and Indian

Abbreviations: DTH, delayed type hypersensitivity test; PBS-TM, phosphate-buffered saline tween 1% milk; WB, Western blot

* Corresponding author. Tel.: +34 934024500;
fax: +34 934024504.

E-mail address: mportus@ub.edu (M. Portús).

patients are significantly over expressed, especially IgG1, during the active phase of human visceral leishmaniosis (Elassad et al., 1994; Ulrich et al., 1995; Anam et al., 1999a, 1999b). Also, high values of specific IgE have been reported during acute phases of disease for Indian kala-azar patients (Anam et al., 1999b) and patients with *L. chagasi* (Atta et al., 1998).

Most studies dealing with immunoglobulins expression in dogs have focused on the IgG, IgG1 and IgG2 response (Deplazes et al., 1995; Cavaliero et al., 1999; Solano-Gallego et al., 2001; Quinnell et al., 2003), but there are no data about the expression of other immunoglobulins during *Leishmania* infection. Here, we study the level of IgG, IgG1, IgG2, and IgE in naturally infected symptomatic and asymptomatic dogs from the northeast of Spain to improve our understanding of the immunoresponse of dogs during the infection and to diagnose the stage of the disease using serology.

We examined 109 dog serum samples, 90 from highly endemic areas in the northeast of Spain and 19 from a non-endemic area in France (Besançon). These sera, from our serobank, corresponded to dogs included in a large survey of animals from endemic areas that had been screened for leishmaniosis in previous studies, through various parasitological (direct examination and culture of popliteal lymph node aspirate), immunological (ELISA and Western blot with protein A and delayed type hypersensitivity tests) and molecular (PCR) techniques. These techniques are described in Iniesta et al., 2002. Clinical signs, consistent with canine leishmaniosis (skin abnormalities, onychogryposis, weight loss, epistaxis, apathy, ocular and other lesions and lymph node enlargement, among others) were also recorded. Animals with at least two of these clinical signs were considered symptomatic. Animals were considered infected by *Leishmania* when they were positive by direct examination, culture or PCR or at least two immunological techniques (ELISA and WB, ELISA and DTH or WB and DTH). Fifty-two sera corresponded to animals considered infected when sampling was performed, and 57 to non-infected animals. Dogs were classified in four categories: (1) 19 animals from non-endemic areas; (2) 38 non-infected animals from endemic areas; (3) 29 infected asymptomatic animals; (4) 23 infected symptomatic animals.

Anti-*Leishmania* antibodies were quantitatively detected by ELISA as described by Riera et al.

(1999) with some modifications regarding the dilutions and conjugates used.

Sera and conjugate concentrations were determined by a checker-board titration method with four sera (two from infected animals and two from dogs from the non-endemic zone). Anti-dog IgG peroxidase, anti-dog IgG1 peroxidase, anti-dog IgG2 peroxidase and anti-dog IgE peroxidase (Bethyl Laboratories, Montgomery, TX, USA) were used as second antibodies. The concentration of serum was 1:400 in phosphate-buffered saline-tween 1% milk (PBS-TM) (Sigma, St Louis, MO, USA), for IgG detection; 1:200 for IgG1 and IgG2 detection and 1:100 for IgE detection. The conjugate working dilution was 1:5000 in PBS-TM for anti-dog IgG peroxidase; 1:200 for anti-dog IgG1 peroxidase; 1:7500 for anti-dog IgG2 peroxidase and 1:100 for anti-dog IgE peroxidase. The reaction was quantified in ELISA units (U) by reference to a positive serum, obtained from a euthanized infected dog in the acute phase of disease and used as calibrator and arbitrarily set at 100 U. The mid point optical density obtained with the calibrator was 1.000 for IgG, 1.300 for IgG2, 0.350 for IgG1 and 0.550 for IgE.

Student's *t*-test was performed by using the SPSS programme.

When analysing the antibody response in the different groups of animals (Fig. 1), in infected dogs IgG1 and IgE are only significantly high in symptomatic animals (Student's *t*-test, $P = 0.002$ to IgG1 and $P = 0.000$ to IgE) while IgG and IgG2 are high in both, asymptomatic ($P = 0.000$ to IgG and $P = 0.001$ to IgG2) and symptomatic ($P = 0.000$ to IgG and $P = 0.000$ to IgG2) animals. This is the consequence of the different Th-cell type response in symptomatic and asymptomatic animals. In mice infected by *L. major* and *L. donovani*, the progression of the disease and the Th2 response (IL-4, IL-5 and IL-10 and IgG1) are clearly associated, as are resistance and Th1 (IFN- γ and IgG2a) (Bretscher et al., 1992; Afrin and Ali, 1997, 1998). Also in human visceral leishmaniosis, the relationship between the Th-cell type response and the evolution of the disease have been reported (Carvalho et al., 1985, 1992; Elassad et al., 1994; Ulrich et al., 1995; Sundar et al., 1997; Atta et al., 1998; Anam et al., 1999a, 1999b).

In dogs high levels of specific antibodies, mainly of IgG class, have been related with pathophysiological

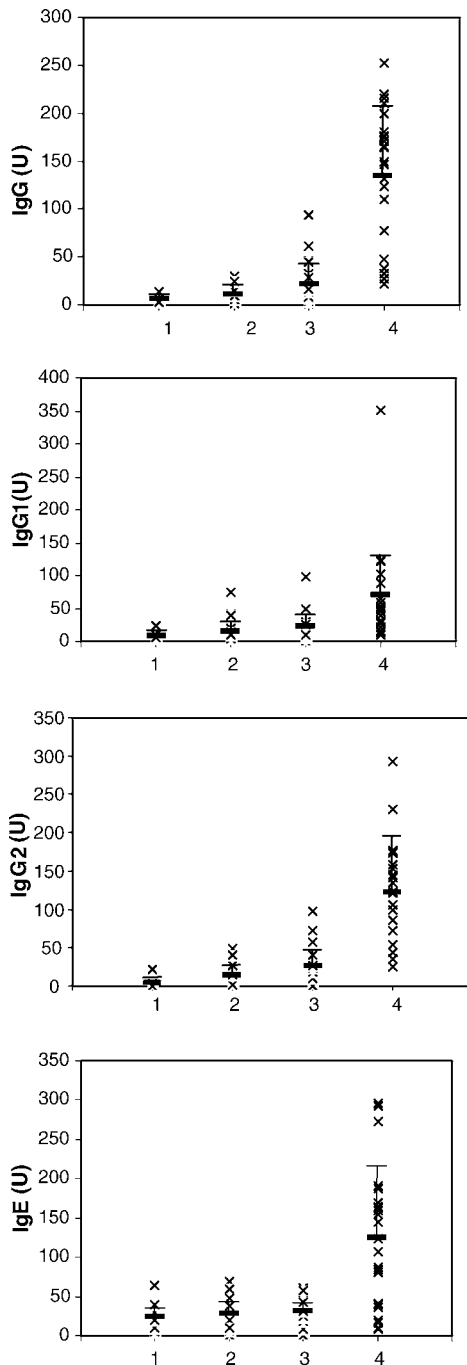


Fig. 1. Specific anti-*Leishmania* immunoglobulins detected by ELISA units (U) in non-infected (from non-endemic and endemic areas) and infected (asymptomatic and symptomatic) dogs. Solid bars indicate mean value and error bars indicate S.D. of immunoglobulins expressed by ELISA units in each cohort. Dogs are divided

into cohorts as follows: (1) animals from non-endemic area; (2) non-infected animals from endemic area; (3) infected asymptomatic dogs; (4) symptomatic dogs, infected animals with external signs of leishmanial disease.

disorders and active phases of the disease (Pinelli et al., 1994; Carrera et al., 1996; Iniesta et al., 2002). The relationship between high IgG2 expression with asymptomatic infections and high IgG1 expression with disease have been stated (Deplazes et al., 1995; Bourdoiseau et al., 1997; Solano-Gallego et al., 2001) associated with upregulation of specific IgG1 (Quinnell et al., 2003), as it is observed in our dogs.

IgE in dogs is classically associated with atopic (IgE-mediated hypersensitivity to environmental allergens) (Halliwell and DeBoer, 2001; Foster et al., 2003) and worm diseases (Snowden and Hammerberg, 1987; Gasser et al., 1993), but there is no information on IgE in dogs infected by *L. infantum*. We found high values of specific IgE only in symptomatic infected dogs as reported for Indian kala-azar patients (Anam et al., 1999b).

IgE and IgG1 expression in asymptomatic infected dogs and non-infected animals from endemic areas were not significantly different ($P = 0.718$ for IgE and $P = 0.079$ for IgG1). In contrast, non-infected dogs from endemic areas, in our study, had higher IgG expression than dogs from non-endemic areas ($P = 0.000$ for IgG and $P = 0.001$ for IgG2). In endemic areas, low levels of specific antibodies are found in healthy animals that do not develop the disease for many years, if at all (Lanotte et al., 1979; Fisa et al., 1991). This causes one of the main problems in epidemiological studies on canine leishmaniosis in such areas: how to identify infected animals. In the present study the antibodies found were of the IgG2 subclass and may reflect the immunological memory from past infections or just the response of antibodies to parasite inoculations in resistant animals that develop a Th1 response.

Our data demonstrate that IgG and IgG2 antibodies in canine leishmaniosis are expressed by all infected animals, both asymptomatic and symptomatic, whereas IgG1 and IgE are only expressed by animals that develop the pathology, which points to their potential role as markers of the active disease.

into cohorts as follows: (1) animals from non-endemic area; (2) non-infected animals from endemic area; (3) infected asymptomatic dogs; (4) symptomatic dogs, infected animals with external signs of leishmanial disease.

Acknowledgements

This study was supported by the EU, project FAIR CT98-4104. Financial support was also obtained from the Spanish and Catalan governments, projects PB94-0865 and 1999SGR00072. We thank Prof. R. Piarroux from the Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, Faculté de Médecine et de Pharmacie, Université de Franche-Comté, Besançon (France) for providing sera from Franche Comté (France), and the veterinarians and dog owners for their collaboration in sampling. The careful revision of two anonymous reviewers and their comments and suggestions is also appreciated.

References

- Abranches, P., Silva-Pereira, M.C., Conceicao-Silva, F.M., Santos-Gomes, G.M., Janz, J.G., 1991. Canine leishmaniasis: pathological and ecological factors influencing transmission of infection. *J. Parasitol.* 77, 557–561.
- Afrin, F., Ali, N., 1997. Adjuvanticity and protective immunity elicited by *Leishmania donovani* antigens encapsulated in positively charged liposomes. *Infect. Immun.* 65, 2371–2377.
- Afrin, F., Ali, N., 1998. Isotype profiles of *Leishmania donovani*-infected BALB/c mice: preferential stimulation of IgG2a/b by liposome-associated promastigote antigens. *J. Parasitol.* 84, 743–748.
- Anam, K., Afrin, F., Banerjee, D., Pramanik, N., Guha, S.K., Goswami, R.P., Gupta, P.N., Saha, S.K., Ali, N., 1999a. Immunoglobulin subclass distribution and diagnostic value of *Leishmania donovani* antigen-specific immunoglobulin G3 in Indian kala-azar patients. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 6, 231–235.
- Anam, K., Afrin, F., Banerjee, D., Pramanik, N., Guha, S.K., Goswami, R.P., Saha, S.K., Ali, N., 1999b. Differential decline in *Leishmania* membrane antigen-specific immunoglobulin G (IgG), IgM, IgE, and IgG subclass antibodies in Indian kala-azar patients after chemotherapy. *Infect. Immun.* 67, 6663–6669.
- Ashford, D.A., Badaro, R., Eulalio, C., Freire, M., Miranda, C., Zalis, M.G., David, J.R., 1993. Studies on the control of visceral leishmaniasis: validation of the Falcon assay screening test—enzyme-linked immunosorbent assay (FAST-ELISA) for field diagnosis of canine visceral leishmaniasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 48, 1–8.
- Atta, A.M., D'Oliveira Jr., A., Correa, J., Atta, M.L., Almeida, R.P., Carvalho, E.M., 1998. Anti-leishmanial IgE antibodies: a marker of active disease in visceral leishmaniasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 59, 426–430.
- Bourdoiseau, G., Bonnefont, C., Hoareau, E., Boehringer, C., Stolle, T., Chabanne, L., 1997. Specific IgG1 and IgG2 antibody and lymphocyte subset levels in naturally *Leishmania infantum*-infected treated and untreated dogs. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 59, 21–30.
- Bretscher, P.A., Wei, G., Menon, J.N., Bielefeldt-Ohmann, H., 1992. Establishment of stable, cell-mediated immunity that makes “susceptible” mice resistant to *Leishmania major*. *Science* 257, 539–542.
- Carrera, L., Fermin, M.L., Tesouro, M., Garcia, P., Rollan, E., Gonzalez, J.L., Mendez, S., Cuquerella, M., Alunda, J.M., 1996. Antibody response in dogs experimentally infected with *Leishmania infantum*: infection course antigen markers. *Exp. Parasitol.* 82, 139–146.
- Carvalho, E.M., Badaro, R., Reed, S.G., Jones, T.C., Johnson Jr., W.D., 1985. Absence of gamma interferon and interleukin 2 production during active visceral leishmaniasis. *J. Clin. Invest.* 76, 2066–2069.
- Carvalho, E.M., Barral, A., Pedral-Sampaio, D., Barral-Netto, M., Badaro, R., Rocha, H., Johnson Jr., W.D., 1992. Immunologic markers of clinical evolution in children recently infected with *Leishmania donovani chagasi*. *J. Infect. Dis.* 165, 535–540.
- Cavaliero, T., Arnold, P., Mathis, A., Glaus, T., Hofmann-Lehmann, R., Deplazes, P., 1999. Clinical, serologic, and parasitologic follow-up after long-term allopurinol therapy of dogs naturally infected with *Leishmania infantum*. *J. Vet. Int. Med.* 13, 330–334.
- Deplazes, P., Smith, N.C., Arnold, P., Lutz, H., Eckert, J., 1995. Specific IgG1 and IgG2 antibody responses of dogs to *Leishmania infantum* and other parasites. *Parasite Immunol.* 17, 451–458.
- El Assad, A.M., Younis, S.A., Siddig, M., Grayson, J., Petersen, E., Ghalib, H.W., 1994. The significance of blood levels of IgM, IgA, IgG and IgG subclasses in Sudanese visceral leishmaniasis patients. *Clin. Exp. Immunol.* 95, 294–299.
- Fisa, R., Gállego, M., Portús, M., Gállego, J., 1991. Evolución de la leishmaniosis canina en zona endémica a través de su seguimiento serológico. *Cienc. Vet.* 4, 69–76.
- Foster, A.P., Knowles, T.G., Moore, A.H., Cousins, P.D., Day, M.J., Hall, E.J., 2003. Serum IgE and IgG responses to food antigens in normal and atopic dogs, and dogs with gastrointestinal disease. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 92, 113–124.
- Gasser, R.B., Jenkins, D.J., Paolillo, E., Parada, L., Cabrera, P., Craig, P.S., 1993. Serum antibodies in canine echinococcosis. *Int. J. Parasitol.* 23, 579–586.
- Halliwell, R.E., DeBoer, D.J., 2001. The ACVD task force on canine atopic dermatitis (III): the role of antibodies in canine atopic dermatitis. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 81, 159–167.
- Iniesta, L., Fernández-Barredo, S., Bulle, B., Gómez, M.T., Piarroux, R., Gállego, M., Alunda, J.M., Portús, M., 2002. Diagnostic techniques to detect cryptic leishmaniasis in dogs. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 9, 1137–1141.
- Janotte, G., Rioux, J.A., Perieres, J., Vollhardt, Y., 1979. Ecologie des leishmanioses dans le sud de la France. 10. Les formes évolutives de la leishmaniose viscérale canine. Elaboration d'une typologie bio-clinique à finalité épidémiologique. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.* 54, 277–295.
- Pinelli, E., Killick-Kendrick, R., Wagenaar, J., Bernadina, W., del Real, G., Ruitenbergh, J., 1994. Cellular and humoral immune

- responses in dogs experimentally and naturally infected with *Leishmania infantum*. *Infect. Immun.* 62, 229–235.
- Portús, M., Fisa, R., Serra, T., Gállego, M., Mora, M., 1987. Estudios seroepidemiológicos sobre la leishmaniosis canina en Cataluña. *Med. Vet.* 4, 569–575.
- Quinnell, R.J., Courtenay, O., Garcez, L.M., Kaye, P.M., Shaw, M.A., Dye, C., Day, M.J., 2003. IgG subclass responses in a longitudinal study of canine visceral leishmaniasis. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 91, 161–168.
- Riera, C., Valladares, J.E., Gállego, M., Aisa, M.J., Castillejo, S., Fisa, R., Ribas, N., Carrió, J., Alberola, J., Arboix, M., 1999. Serological and parasitological follow-up in dogs experimentally infected with *Leishmania infantum* and treated with meglumine antimoniate. *Vet. Parasitol.* 84, 33–47.
- Sideris, V., Papadopoulou, G., Dotsika, E., Karagouni, E., 1999. Asymptomatic canine leishmaniasis in Greater Athens area, Greece. *Eur. J. Epidemiol.* 15, 271–276.
- Snowden, K., Hammerberg, B., 1987. Dynamics of immune responses related to clinical status in *Brugia pahangi*-infected dogs. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 37, 143–151.
- Solano-Gallego, L., Riera, C., Roura, X., Iniesta, L., Gállego, M., Valladares, J.E., Fisa, R., Castillejo, S., Alberola, J., Ferrer, L., Arboix, M., Portús, M., 2001. *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.* 96, 265–276.
- Sundar, S., Reed, S.G., Sharma, S., Mehrotra, A., Murray, H.W., 1997. Circulating T helper 1 (Th1) cell- and Th2 cell-associated cytokines in Indian patients with visceral leishmaniasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 56, 522–525.
- Ulrich, M., Rodríguez, V., Centeno, M., Convit, J., 1995. Differing antibody IgG isotypes in the polar forms of leprosy and cutaneous leishmaniasis characterized by antigen-specific T cell anergy. *Clin. Exp. Immunol.* 100, 54–58.

IDIOTYPE EXPRESSION OF IgG1 AND IgG2 IN DOGS NATURALLY INFECTED
WITH *Leishmania infantum*

EXPRESIÓN IDIOTÍPICA DE IgG1 E IgG2 EN PERROS NATURALMENTE
INFECTADOS CON *Leishmania infantum*

Laura Iniesta, Montserrat Gállego y Montserrat Portús

VETERINARY IMMUNOLOGY AND IMMUNOPATHOLOGY, 2007, Vol 119, Nº 3-4, p. 189-197.

En este estudio se analiza mediante ELISA y *western blot* la expresión de IgG1 e IgG2 específicas en perros naturalmente infectados por *Leishmania infantum* para detectar marcadores relacionados con la infección, el estado clínico y las fases tempranas de la enfermedad. Se estudian 109 sueros procedentes de 50 perros de zonas de alta endemia del noreste peninsular en su mayoría pertenecientes a un grupo de animales a los que se realizó un seguimiento, habitualmente anual, durante un período de tiempo variable (entre dos y nueve años). El diagnóstico de la leishmaniosis se realizó mediante pruebas inmunológicas (ELISA y DTH), parasitológicas (examen directo y cultivo) y moleculares (PCR).

El número de fracciones polipeptídicas reconocidas por IgG1 e IgG2 en el antígeno de *Leishmania* es similar y disminuye de forma paralela a los valores relativos de ambas inmunoglobulinas detectadas mediante ELISA.

El cálculo de la especificidad y la sensibilidad de cada banda en relación al análisis parasitológico, permite considerar un *western blot* positivo aquel que detecta alguna de las siguientes bandas 24, 20, 18, 16 ó 14 kDa para IgG1 y 48, 31, 24, 18, 16 ó 14 kDa para IgG2.

El reconocimiento de fracciones polipeptídicas de bajo peso molecular 14, 16 y 18 kDa para IgG1 y 14 y 16 kDa para IgG2 permite detectar diagnósticos falsos negativos mediante pruebas parasitológicas y moleculares en las fases tempranas de la infección, fundamentalmente por parte de las IgG1.

Idiotype expression of IgG1 and IgG2 in dogs naturally infected with *Leishmania infantum*

Laura Iniesta*, Montserrat Gállego, Montserrat Portús

Laboratori de Parasitologia, Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona, Avda. Joan XXIII s/n, E-08028 Barcelona, Spain

Received 22 January 2006; received in revised form 8 May 2007; accepted 10 May 2007

Abstract

Here we analyzed, by Western blot analysis, the idiotype expression of IgG1 and IgG2 in 109 canine sera corresponding to 50 dogs from endemic areas of leishmaniosis in order to detect markers related to *Leishmania infantum* infection and clinical condition (asymptomatic or symptomatic). Twenty-four dogs from an area free of leishmaniosis were used as controls.

IgG1 and IgG2 responses in symptomatic and asymptomatic *L. infantum* infections differed mainly in subclass production (ELISA values), with higher IgG2 production occurring particularly in symptomatic dogs. Nevertheless, we observed little difference in the idiotype expression of these IgG subclasses, which, in general, recognized the same antigenic fractions. While early *L. infantum* infection was characterized by recognition of polypeptide fractions of low molecular weight, mainly fractions of 14, 16 and 18 kDa by IgG1 and 14 and 16 kDa by IgG2, symptomatology was associated with recognition by both IgG subclasses of a 24 kDa fraction and other antigens belonging to the AG24 family.

© 2007 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: *Leishmania infantum*; Dog; IgG1; IgG2; Western blot

1. Introduction

Canine leishmaniosis (CaL), is a severe systemic disease caused by *Leishmania infantum* with a high prevalence in Mediterranean countries (Bettini and Gradoni, 1986; Amela et al., 1995; Fisa et al., 1999). Sero-epidemiological studies on CaL have reported a large number of asymptomatic seropositive animals (Lanotte et al., 1979; Portús et al., 1987; Abranches et al., 1991; Fisa et al., 1999; Sideris et al., 1999) exhibiting antibody levels at the detection threshold

where artefacts and crossed reactions are also commonly found. Moreover, longitudinal studies have demonstrated that, in many cases, antibodies remain at this threshold for years without the development of leishmanial disease (Lanotte et al., 1979; Fisa et al., 1991). Thus, conventional serological techniques using whole *L. infantum* antigen (immunofluorescent antibody test, direct agglutination test, ELISA, among others) performed during clinical and epidemiological studies often fail to distinguish between non-infected and infected animals when a low level of antibodies is detected, or to differentiate between disease phases (Ashford et al., 1995; Iniesta et al., 2002; Mettler et al., 2005). Recombinant antigen rK39 is a useful tool in diagnosing active phases of leishmaniosis (Badaro et al., 1996); however, it sometimes lacks sensitivity (Iqbal et al., 2002) and occasionally remains positive for up to 2 years after treatment (Zijlstra et al., 1998).

Abbreviations: CC, contingency coefficient; CaL, canine leishmaniosis; PBS-TM, phosphate-buffered saline-Tween 1% milk; TS-T, Tris-Tween; WB, Western blot

* Corresponding author at: Laboratori de Parasitologia, Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona, Avda. Diagonal s/n, E-08028 Barcelona, Spain. Tel.: +34 93 402 45 02; fax: +34 93 402 45 04.

E-mail address: laura.iniesta@gmail.com (L. Iniesta).

Western blot (WB) analysis is a sensitive and specific technique that has improved diagnostic capabilities for canine (Aisa et al., 1998; Carrera et al., 1996; Fernández-Pérez et al., 1999) and human (Mary et al., 1992; Cardeñosa et al., 1995) leishmaniosis, mainly in subjects with low antibody expression, such as in *Leishmania*/HIV co-infected patients. IgG1 and IgG2 expression during CaL has been related to host Th1/Th2 response and disease evolution (Deplazes et al., 1995; Cavaliero et al., 1999; Solano-Gallego et al., 2001; Quinnell et al., 2003). In infections of *L. donovani* in humans, qualitative analyses of immunoblot data indicate that certain leishmanial antigens are recognized mainly by a particular subclass of IgGs during distinct phases of the disease (Ghosh et al., 1995).

Here we used WB to analyze the idiotype expression of IgG1 and IgG2 in dogs naturally infected with *L. infantum* in order to detect markers that are related to infection, mainly when a low level of antibodies is detected, to clinical status (asymptomatic or symptomatic) and also to early phases of disease and, in consequence, to improve the diagnosis.

2. Materials and methods

2.1. Animals and sera

One hundred and nine sera samples from 50 dogs were used. These samples in our serobank were from dogs included in a study of highly endemic areas of CaL in northeastern Spain (Priorat and Sant Jaume de Llierca). Most animals were recruited between dog pounds and hunting societies that were screened for leishmaniosis at yearly intervals. As a result, repeated samples were obtained from several of these animals (only 1 sample was taken from 25 dogs, 2 samples from 11 dogs, 3 from 9 dogs, 4 from 2 dogs and 9 from 3 dogs). In previous studies, these dogs had been screened for leishmaniosis using various parasitological (direct examination and culture), molecular (PCR), and immunological techniques (ELISA-Protein A, Western blot-Protein A and delayed-type hypersensitivity). The techniques and results for most samples are described in Iniesta et al. (2002). External signs consistent with CaL (skin abnormalities, onychogryposis, weight loss, epistaxis, apathy, ocular and other lesions, and lymph node enlargement, among others) were recorded. Biochemical analysis was also performed. Animals with two or more external signs and/or highly altered biochemical parameters (serum proteins >8 g/dl, urea >52 mg/dl, creatinine >1.8 mg/dl and aspartate ami-

notransferase and alanine aminotransferase >42 U/l) were considered symptomatic. However, it should be noted that animals in this study were not recruited in veterinary surgeries due to an ill condition. They were selected at random during epidemiological studies and therefore only a few classified as symptomatic were seriously ill.

Sixty-four samples were from dogs that tested negative during parasite detection (direct examination, culture, and PCR) (cohort 2). The remaining 45 were from animals that tested positive using the parasitological or molecular techniques. Twenty-one of these positive dogs exhibited either two or more external symptoms or altered biochemical parameters at the time blood samples were obtained and were considered symptomatic (cohort 4). The remaining 24 were considered asymptomatic (cohort 3). Animals, from which repeated samples were obtained, were included in the cohort corresponding to their clinical status at the time of taking the sample was. In all cases where a change of cohort was produced, it was in an ascendant sense (from cohort 2 to cohort 3, or from cohort 3 to cohort 4).

A control group of 24 sera samples from 24 dogs from a non-endemic area (Franche-Comté, France) was also studied (cohort 1).

2.2. Antibody response study by ELISA

Anti-*Leishmania* antibodies were detected by ELISA as described by Riera et al. (1999), with some modifications as regards the conjugates and dilutions used. Anti-dog IgG1 peroxidase (1:200 for lot A40-120P-8) and anti-dog IgG2 peroxidase (1:5000 and 1:7500 for two distinct lots, A40-121P-6 and A40-121P-7, respectively) (Bethyl Laboratories, Montgomery, TX, USA) were used as secondary antibodies. Sera were tested at 1:200 dilution in PBS-Tween 1% milk (PBS-TM) for IgG1 and IgG2 determinations. The reaction was quantified in units (U), based on a positive serum used as a calibrator, and then arbitrarily set at 100 U. The cut-off was established at 40 U for IgG1 and 20 U for IgG2 (mean + 4 standard deviations for 39 dogs from various non-endemic areas—Belgium, Franche-Comté and the Canary Islands).

2.3. Immunoblot analysis

Western blot (WB) was performed as described by Aisa et al. (1998). Antigen for immunoblot analysis was obtained during the logarithmic growth phase of promastigotes cultured in Schneider's medium. Cells

were washed, counted, adjusted to a concentration of 3×10^8 promastigotes/ml in sample buffer (0.5 M Tris–HCl, pH 6.8, 0.01 M EDTA, 5% sodium dodecylsulfate [SDS], 5% 2-mercaptoethanol, 0.0125% bromophenol blue), and boiled for 5 min. Electrophoresis was performed on 0.1% SDS–13% polyacrylamide gels. Polypeptides were trans-blotted onto nitrocellulose sheets (Millipore, Bedford, USA). Immunoblot was carried out with sera at 1:100 dilution in 20 mM Tris, 0.13 mM NaCl, pH 7.6, containing 0.05% Tween 20 (TS-T) and 1% dry skimmed milk. Anti-dog IgG1 peroxidase and anti-dog IgG2 peroxidase (Bethyl Laboratories, Montgomery, TX, USA) were used as secondary antibodies. The working dilutions for these secondary antibodies were 1:100 and 1:1000, respectively. Color was developed with 4-chloro-1-naphthol (Sigma, St. Louis, USA) and H_2O_2 , and the reaction was stopped with tap water. The relative molecular weights of the bands detected were calculated with Quantity One software[®] (version 4.1.1. Bio-Rad, Italy).

3. Statistical analysis

The Student's *t*-test of independence and Pearson's correlation coefficient were performed using the SPSS program.

The relationship between the WB bands and the ELISA, and also that of each band with the infection or symptomatology was determined by the χ^2 -test and the contingency coefficient (CC).

4. Results

Sera from infected animals recognized 33 polypeptide fractions of the *L. infantum* antigen, with molecular

weight ranging from 14 to 69 kDa, using anti-IgG1 and anti-IgG2 conjugates (Fig. 1).

The mean ELISA values (Table 1) for IgG1 differed only between dogs from non-endemic (cohort 1) and endemic (cohorts 2–4) areas ($p = 0.000$), and between dogs with negative (cohort 2) and positive (cohorts 3 and 4) parasite detection values ($p = 0.007$). However, no statistical differences between asymptomatic (cohort 3) and symptomatic (cohort 4) animals were found ($p = 0.223$). In contrast, ELISA IgG2 values clearly differed between the cohorts (non-endemic and endemic, $p = 0.000$; negative and positive parasite detection, $p = 0.000$; symptomatic and asymptomatic, $p = 0.000$).

The mean number of polypeptide fractions detected in the overall dog cohort was similar for IgG1 and IgG2 antibodies ($p = 0.270$). The recognition of antigenic fractions was higher in animals from endemic than from non-endemic areas ($p = 0.000$ for IgG1 and IgG2) and it was also higher in dogs with positive than with negative parasite detection ($p = 0.000$ for IgG1 and IgG2). Differences in the number of bands detected between symptomatic and asymptomatic dogs were only significant for IgG2 ($p = 0.011$ for IgG2 and $p = 0.101$ for IgG1) (Table 1).

A comparison of the results obtained by ELISA and WB for each serum showed that the number of bands detected in the immunoblot increased, as expected, with the ELISA value, with better correlation observed in these two parameters for IgG2 ($r = 0.605$) than for IgG1 ($r = 0.378$). The WB reactivity of sera that yield low ELISA values for IgG1 was in most cases characterized by low band intensity rather than low band recognition. Good correlation ($r = 0.704$) was observed between the number of bands identified by IgG1 and IgG2 conjugates.

The specificity for each band revealed in the WB analysis was established with the sera of animals from the negative control group (cohort 1). Sera from 8 dogs in this group showed a weak immunoreactivity to 1–3 polypeptide fractions of the *L. infantum* antigen (69, 63, 60, 52, 46, 45, 43, 40, 38, 36, 33 or 30 kDa for IgG1, and 69, 63, 60, 36 or 33 kDa for IgG2).

Sensitivity for each band was calculated using the positive dogs obtained by direct examination, culture, or PCR testing (cohorts 3 and 4, Tables 2 and 3). The highest sensitivity was for bands of 69 kDa (49%), 48 kDa (49%), 30 kDa (64%), 24 kDa (49%), 20 kDa (44%), 18 kDa (64%), 16 kDa (71%) and 14 kDa (60%) for IgG1 and 69 kDa (62%), 36 kDa (51%), 31 kDa (40%), 30 kDa (51%), 24 kDa (38%), 18 kDa (44%), 16 kDa (71%) and 14 kDa (67%) for IgG2. Sensitivity

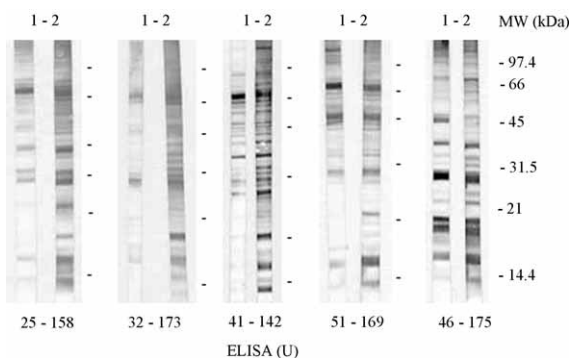


Fig. 1. Pattern of bands recognized in the *Leishmania infantum* antigen in IgG1 (1) and IgG2 (2) WB analysis of sera from five infected symptomatic dogs, and IgG1 and IgG2 ELISA units for each serum.

Table 1

Leishmania infantum IgG1 and IgG2 ELISA (U) and WB (number of bands) analysis in sera of different cohorts of dogs (mean values \pm standard deviation)

	Cohort 1 (n = 24)	Cohort 2 (n = 64)	Cohort 3 (n = 24)	Cohort 4 (n = 21)
ELISA				
IgG1	7.9 \pm 4.1	19.5 \pm 15.9	25.4 \pm 19.1	31.9 \pm 15.3
IgG2	3.6 \pm 3.3	22.5 \pm 20.7	50.2 \pm 29.2	102.8 \pm 55.6
WB				
IgG1	0.7 \pm 1.1	4.5 \pm 3.4	7.8 \pm 3.8	9.7 \pm 3.7
IgG2	0.3 \pm 0.6	3.6 \pm 3.3	7.7 \pm 3.5	10.8 \pm 4.3

Cohort 1: dogs from a non-endemic area. Cohort 2: dogs from endemic areas that tested negative in any of the parasitological or molecular techniques performed (direct examination, culture, and PCR). Cohort 3: asymptomatic dogs positive in any of the parasitological or molecular techniques performed. Cohort 4: symptomatic dogs positive in any of the parasitological or molecular techniques performed. *n*: number of sera from dogs in each cohort.

Table 2

Western blot IgG1 response

Band (kDa)	Cohort 1 (n = 24)	Cohort 2 (n = 64)	Cohort 3 (n = 24)	Cohort 4 (n = 21)	Parasite detection		Symptoms	
					<i>p</i> ^a	CC ^b	<i>p</i> ^a	CC ^b
69	8.3	20.8	32.5	57.1	0.000	0.306	0.300	0.153
66	0	14.6	12.5	9.5	0.816	0.020	0.751	0.047
63	4.2	16.7	15	14.3	0.626	0.042	0.826	0.033
62	0	0	2.5	4.8	0.046	0.170	0.923	0.014
60	4.2	8.3	22.5	19	0.306	0.088	0.835	0.031
58	0	2.1	7.5	9.5	0.392	0.074	0.472	0.107
56	0	22.9	7.5	23.8	0.527	0.055	0.322	0.146
54	0	12.5	5	9.5	0.668	0.037	0.889	0.021
52	4.2	16.7	27.5	28.6	0.139	0.127	0.787	0.040
50	0	12.5	15	14.3	0.336	0.083	0.234	0.175
48	0	31.3	47.5	42.9	0.004	0.245	0.449	0.112
46	12.5	2.1	5	19	0.261	0.097	0.113	0.230
45	4.2	18.8	15	28.6	0.025	0.191	0.787	0.040
43	8.3	6.3	7.5	4.8	0.974	0.003	0.632	0.071
42	8.3	8.3	22.5	9.5	0.217	0.106	0.176	0.198
40	4.2	8.3	10	9.5	0.395	0.074	0.751	0.047
39	0	8.3	2.5	4.8	0.261	0.097	0.280	0.159
38	4.2	12.5	7.5	23.8	0.090	0.145	0.322	0.146
36	4.2	12.5	15	19	0.075	0.153	0.881	0.022
34	0	6.3	12.5	14.3	0.029	0.186	0.826	0.033
33	4.2	4.2	32.5	33.3	0.003	0.253	0.763	0.045
32	0	8.3	12.5	14.3	0.060	0.161	0.826	0.033
31	0	4.2	2.5	33.3	0.001	0.268	0.011	0.356
30	4.2	18.8	60	57.1	0.000	0.410	0.338	0.141
28	0	10.4	17.5	23.8	0.004	0.242	0.926	0.014
26	0	12.5	12.5	23.8	0.010	0.219	0.811	0.036
24	0	6.3	25	71.4	0.000	0.439	0.005	0.389
22	0	22.9	15	9.5	0.411	0.071	0.176	0.198
21	0	8.3	15	47.6	0.000	0.306	0.025	0.316
20	0	10.4	27.5	52.4	0.000	0.394	0.316	0.148
18	0	18.8	50	81	0.000	0.410	0.030	0.307
16	0	20.8	57.5	76.2	0.000	0.453	0.482	0.104
14	0	18.8	40	76.2	0.000	0.412	0.038	0.295

Percentage of sera in each cohort recognizing polypeptide fractions in *L. infantum* antigen. Relationship of band recognition with parasite detection (cohorts 3 and 4) and symptoms (cohort 4). In bold, bands with the strongest relationships with parasite detection and symptoms ($p < 0.05$, $CC \geq 0.350$).

^a *p*, Pearson's test *p*-value.

^b CC, Pearson's contingency coefficient.

Table 3
Western blot IgG2 response

Band (kDa)	Cohort 1 (n = 24)	Cohort 2 (n = 64)	Cohort 3 (n = 24)	Cohort 4 (n = 21)	Parasite detection		Symptoms	
					<i>p</i> ^a	CC ^b	<i>p</i> ^a	CC ^b
69	8.3	25	52.5	61.9	0.000	0.342	0.967	0.006
66	0	6.3	7.5	4.8	0.604	0.045	0.632	0.071
63	8.3	20.8	25	28.6	0.256	0.098	0.787	0.040
62	0	2.1	2.5	0	0.308	0.088	–	–
60	4.2	14.6	12.5	28.6	0.061	0.160	0.338	0.141
58	0	6.3	7.5	14.3	0.154	0.123	0.526	0.094
56	0	12.5	15	33.3	0.004	0.245	0.344	0.140
54	0	4.2	12.5	14.3	0.069	0.156	0.860	0.026
52	0	20.8	10	23.8	0.765	0.026	0.153	0.208
50	0	4.2	12.5	28.6	0.001	0.287	0.338	0.141
48	0	6.3	22.5	42.9	0.000	0.361	0.114	0.229
46	0	2.1	12.5	23.8	0.029	0.186	0.545	0.090
45	0	25	35	42.9	0.016	0.204	0.714	0.054
43	0	14.6	12.5	0	0.548	0.052	0.027	0.314
42	0	8.3	20	28.6	0.000	0.345	0.731	0.051
40	0	8.3	5	19	0.012	0.213	0.545	0.090
39	0	8.3	5	19	0.395	0.074	0.113	0.230
38	0	4.2	10	19	0.001	0.268	0.835	0.031
36	8.3	20.8	37.5	47.6	0.000	0.348	0.661	0.065
34	0	8.3	10	19	0.012	0.213	0.835	0.031
33	4.2	8.3	22.5	42.9	0.000	0.290	0.205	0.186
32	0	6.3	22.5	4.8	0.261	0.097	0.205	0.186
31	0	6.3	20	47.6	0.000	0.429	0.329	0.144
30	0	25	37.5	57.1	0.000	0.324	0.449	0.112
28	0	14.6	15	19	0.493	0.059	0.545	0.090
26	0	6.3	10	23.8	0.002	0.264	0.550	0.089
24	0	6.3	15	57.1	0.000	0.396	0.012	0.350
22	0	2.1	7.5	4.8	0.766	0.026	0.923	0.014
21	0	2.1	7.5	33.3	0.004	0.240	0.011	0.356
20	0	2.1	17.5	33.3	0.001	0.285	0.194	0.190
18	0	0	20	61.9	0.000	0.490	0.027	0.312
16	0	18.8	52.5	81	0.000	0.472	0.173	0.199
14	0	18.8	42.5	76.2	0.000	0.475	0.205	0.186

Percentage of sera in each group of dogs recognizing polypeptide fractions in *L. infantum* antigen. Relationship of bands with parasite detection (cohorts 3 and 4) and symptoms (cohort 4). In bold, bands with the strongest relationships with parasite detection and symptoms ($p < 0.05$, $CC \geq 0.350$).

^a *p*, Pearson's test *p*-value.

^b CC, Pearson's contingency coefficient.

of WB analysis increased when a combination of bands was considered, reaching 89% for the two immunoglobulin subclasses when a band of 24, 20, 18, 16 or 14 kDa for IgG1, and 24, 18, 16 or 14 kDa for IgG2 was detected.

The relation of each band to positive parasitological analysis (χ^2), and the intensity of this relation (CC–Pearson's contingency coefficient) were then calculated (Tables 2 and 3). The strongest relationships ($p < 0.05$, $CC > 0.350$) occurred in the following bands: 30, 24, 20, 18, 16 and 14 kDa for IgG1 and 48, 31, 24, 18, 16 and 14 kDa for IgG2. On the basis of these results, we considered the WB to be positive when any of the latter bands were present, with the exception of the 30 kDa for

IgG1, which was detected in the sera of one dog from a non-endemic area. Sera from symptomatic dogs (cohort 4) recognized more frequently than sera from asymptomatic dogs (cohort 3) bands of 24 kDa (IgG1 and IgG2), 31 kDa (IgG1) and 21 kDa (IgG2).

A comparison of qualitative results (positive/negative) obtained with ELISA and WB is shown in Table 4. A large number of sera from dogs from endemic areas which had tested negative for parasite detection (cohort 2) were positive to IgG1 and/or IgG2 specific antibodies using one or both serological techniques.

In most cases, dogs had a positive culture or PCR at their subsequent examination, often 1 year later,

Table 4

Positive/negative results for ELISA and WB-IgG1 and -IgG2 for sera of dogs from endemic areas

Cohort 2 (n = 64)					
ELISA-IgG1 ^a	WB-IgG1 ^b		ELISA-IgG2 ^a	WB-IgG2 ^b	
	neg	pos		neg	pos
neg	35	19	neg	29	6
pos	4	6	pos	10	19

Cohort 3 (n = 24)

ELISA-IgG1 ^a	WB-IgG1 ^b		ELISA-IgG2 ^a	WB-IgG2 ^b	
	neg	pos		neg	pos
neg	2	17	neg	1	1
pos	1	4	pos	2	20

Cohort 4 (n = 21)

ELISA-IgG1 ^a	WB-IgG1 ^b		ELISA-IgG2 ^a	WB-IgG2 ^b	
	neg	pos		neg	pos
neg	0	4	neg	0	0
pos	2	15	pos	2	19

^a ELISA was considered positive when it was ≥ 22 U for IgG1 and ≥ 20 U for IgG2.

^b WB was considered positive when any of fractions (24, 20, 18, 16 and 14 kDa for IgG1, and 48, 31, 24, 18, 16 and 14 kDa for IgG2) of the *L. infantum* antigen was recognized.

although in exceptional cases parasitological positivity lasted many years. Sixteen sera in cohort 2, positive to IgG1 (5/6 positive with ELISA and WB, 2/4 positive only with ELISA and 9/19 positive only with WB), and 26 sera positive to IgG2 (16/19 positive with ELISA and WB, 7/10 positive only with ELISA and 3/6 positive only with WB) corresponded to dogs that

exhibited this reversion from negative to positive parasitological results. Nineteen sera from infected asymptomatic dogs (cohort 3) were negative to one or both serological techniques, WB-IgG1 being more sensitive than ELISA-IgG1. The sensitivity of ELISA and WB was similar for IgG2 detection. Also, in symptomatic dogs (cohort 4), WB analysis proved more sensitive than ELISA in discriminating between positive and negative results in sera with low IgG1 levels.

In 8 of the 25 animals from which repeated yearly samples were obtained, a negative-to-positive reversion of serological and parasitological results occurred. In five, early diagnosis was made using WB and the polypeptide fractions that were identified early were those of 18, 16 and 14 kDa for IgG1, and 16 and 14 kDa for IgG2 (Fig. 2).

5. Discussion

Here we studied IgG1 and IgG2 expression in dogs naturally infected with *L. infantum* to identify markers of infection and disease evolution. Quantitatively, IgG1 response to leishmanial antigens in infected dogs was variable, generally low and with no clear relationship with the disease, while IgG2 response directly correlated with pathophysiological status, and higher levels of this immunoglobulin subclass were detected in symptomatic than in asymptomatic dogs. Many studies have attempted to associate polarized T-cell helper responses with the clinical evolution of *Leishmania* infections. Presumably, the immune response of dogs to *L. infantum* is not exclusively cellular or humoral, but rather a combination of Th1 and Th2, and animals

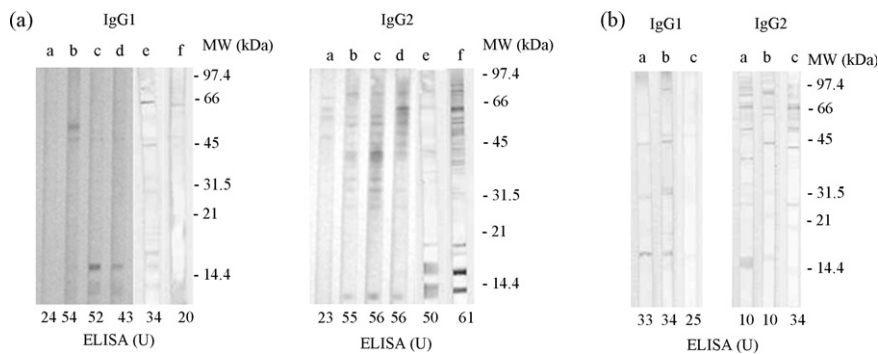


Fig. 2. IgG1 and IgG2 WB and ELISA analysis of sera from two dogs in which a parasitological reversion was detected. (1) Early identification of polypeptide fractions 16 and 14 kDa for IgG1 and IgG2. Lane (a) corresponds to year 1995; lane (b), 1997; lane (c), 1998; lane (d), 1999; lane (e), 2001; lane (f), 2002. Culture was positive in lane (e). The dog remained asymptomatic throughout the study period (1995–2002). Lanes correspond to three distinct nitrocellulose sheets (lanes a–d, lane e and lane f). (2) Early identification of polypeptide fractions 16 for IgG1 and 14 for IgG2. Lane (a) corresponds to year 2000; lane (b), 2001; lane (c), 2002. Culture was positive in lane (c). The dog remained asymptomatic throughout the study period (2000–2002). Lanes correspond to three distinct nitrocellulose sheets.

present a wide spectrum of responses (Abranches et al., 1991; Pinelli et al., 1994; Carrera et al., 1996; Cabral et al., 1998). Various studies have described the levels of specific *Leishmania* IgG subclasses (IgG1 and IgG2) in sick, asymptomatic, and treated dogs. However, conflicting results regarding the up-regulation of these subclasses have been reported. Most of these studies used the same commercial polyclonal antisera as reported here and concluded that the main humoral immunological response in CaL belongs to an IgG2 subclass (Bourdoiseau et al., 1997; Boceta et al., 2000; Solano-Gallego et al., 2001; Leandro et al., 2001; Iniesta et al., 2002). In contrast, Quinnell et al. (2003), using a monoclonal antibody panel, concluded that CaL is associated with the up-regulation of specific antibodies, particularly the IgG1, IgG3 and IgG4 subclasses.

In our study, the number of polypeptide fractions that reacted with IgG1 and IgG2 was similar. A previous report on human *L. donovani* infection (Ravindran et al., 2004) indicates a greater number of polypeptides reacting with the former, while more polypeptides are recognized by anti-leishmanial IgG2 antibodies than by IgG1 in infected dogs (Nieto et al., 1999; Vercamen et al., 2002; Fernández-Pérez et al., 2003). In our opinion, the small sample of dogs examined in some of these studies and the differences in sensitivity of the used technique, mainly because of varying sera and conjugate concentrations, may explain the lack of consistency between findings.

The low IgG1 response detected in most infected dogs places their ELISA values in a narrow margin around the threshold, often in a grey zone in which it is very difficult to distinguish between positives and negatives. The qualitative character of WB analysis allows distinguishing between specific and crossed reactions when such low antibody level is present (Mary et al., 1992; Carrera et al., 1996; Aisa et al., 1998; Fernández-Pérez et al., 1999) which increases the sensitivity. The high sensitivity of WB analysis, mainly in early phases of the infection, may explain that most diagnostic bands were also recognized by some sera from dogs from endemic areas that tested negative to parasite detection (cohort 2).

We observed that symptomatic infection coincided with a high humoral immuno-response, characterized by a highly polyclonal antigenic stimulation despite the low IgG1 response. Antigens belonging to the AG24 family (Couvreur et al., 1997) (31 and 24 kDa for IgG1 and 24 and 21 kDa for IgG2) previously described for their high immunicity and sensitivity for diagnosis (Le Ray et al., 1975) were those mainly related with

symptoms ($p < 0.05$, $CC \geq 0.350$) and were considered clinical markers.

The polypeptide fractions recognized by IgG1 and IgG2 during early humoral immuno-response in infected dogs were, as has been previously reported for IgG in canine (Aisa et al., 1998) and human (Mary et al., 1992) visceral leishmaniosis, antigenic fractions of low molecular weight. Both IgG subclasses were expressed from the beginning of the infection in response to 14 and 16 kDa antigenic fractions, while the IgG1 subclass also exhibited an early response to the 18 kDa fraction.

In conclusion, the present study shows that IgG1 and IgG2 responses in asymptomatic and symptomatic *L. infantum* infections in dogs differs mainly in the amount of each subclass produced, with higher IgG2 production occurring particularly in symptomatic dogs. Nevertheless there is scant difference in the idiotype expression of these two subclasses, which, in general, recognize the same antigenic fractions. While the early *L. infantum* infection is characterized by the recognition of polypeptide fractions of low molecular weight, mainly fractions of 14, 16 and 18 kDa by IgG1 and 14 and 16 kDa by IgG2, the symptomatology is related to recognition by both IgG subclasses of antigens belonging to the AG24 family.

Acknowledgements

This study was supported by the EU project FAIR CT98-4104. Financial support was also obtained from the Spanish and Catalan governments; projects PB94-0865 and 1999SGR00072. We thank Prof. R. Piarroux from the Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, Faculté de Médecine et de Pharmacie, Université de Franche-Comté, Besançon (France) for providing sera from Franche Comté (France), and the veterinarians and dog owners for their collaboration in sampling. Special thanks go to Dr. J. Cairó and Miss R. Ferrer for their help. It has been followed the ethical process described in the Spanish RD 1201/2005, 10th October, about protection of animals used for experimentation and other scientific purposes.

References

- Abranches, P., Silva-Pereira, M.C., Conceicao-Silva, F.M., Santos-Gomes, G.M., Janz, J.G., 1991. Canine leishmaniasis: pathological and ecological factors influencing transmission of infection. *J. Parasitol.* 77, 557–561.
- Aisa, M.J., Castillejo, S., Gállego, M., Fisa, R., Riera, C., de Colmenares, M., Torras, S., Roura, X., Sentís, J., Portús, M., 1998. Diagnostic potential of Western blot analysis of sera from dogs

- with leishmaniasis in endemic areas and significance of the pattern. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 58, 154–159.
- Amela, C., Méndez, I., Torcal, J.M., Medina, G., Pachón, I., Cañavate, C., Alvar, J., 1995. Epidemiology of canine leishmaniasis in the Madrid region, Spain. *Eur. J. Epidemiol.* 11, 157–161.
- Ashford, D.A., Bozza, M., Freire, M., Miranda, J.C., Sherlock, I., Eulálio, C., Lopes, U., Fernandes, O., Degraive, W., Barker Jr., R.H., Badaró, R., David, J.R., 1995. Comparison of the polymerase chain reaction and serology for the detection of canine visceral leishmaniasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 53, 251–255.
- Badaró, R., Benson, D., Eulálio, M.C., Freire, M., Cunha, S., Netto, E.M., Pedral-Sampaio, D., Madureira, C., Burns, J.M., Houghton, R.L., David, J.R., Reed, S.G., 1996. rK39: a cloned antigen of *Leishmania chagasi* that predicts active visceral leishmaniasis. *J. Infect. Dis.* 173, 758–761.
- Bettini, S., Gradoni, L., 1986. Canine leishmaniasis in the Mediterranean area and its implications for human leishmaniasis. *Insect Sci. Appl.* 7, 241–245.
- Boceta, C., Alonso, C., Jiménez-Ruiz, A., 2000. Leucine-rich repeats are the main epitopes in *Leishmania infantum* PSA during canine and human visceral leishmaniasis. *Parasite Immunol.* 22, 55–62.
- Bourdoiseau, G., Bonnefont, C., Hoareau, E., Boehringer, C., Stolle, T., Chabanne, L., 1997. Specific IgG1 and IgG2 antibody and lymphocyte subset levels in naturally *Leishmania infantum* infected treated and untreated dogs. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 59, 21–30.
- Cabral, M., O'Grady, J.E., Gomes, S., Sousa, J.C., Thompson, H., Alexander, J., 1998. The immunology of canine leishmaniasis: strong evidence for a developing disease spectrum from asymptomatic dogs. *Vet. Parasitol.* 76, 173–180.
- Cardenaosa, N., Riera, C., Cortés, P., March, F., Muñoz, C., Portús, M., Prats, G., 1995. Detection and characterization by immunoblot analysis of potentially diagnostic *Leishmania infantum* polypeptides in human visceral leishmaniasis. *Parasite Immunol.* 17, 509–516.
- Carrera, L., Fermín, M.L., Tesouro, M., García, P., Rollán, E., González, J.L., Méndez, S., Cuquerella, M., Alunda, J.M., 1996. Antibody response in dogs experimentally infected with *Leishmania infantum*: infection course antigen markers. *Exp. Parasitol.* 82, 139–146.
- Cavaliero, T., Arnold, P., Mathis, A., Glaus, T., Hofmann-Lehmann, R., Deplazes, P., 1999. Clinical, serologic, and parasitologic follow-up after long-term allopurinol therapy of dogs naturally infected with *Leishmania infantum*. *J. Vet. Intern. Med.* 13, 330–334.
- Couvreur, B., Jacquet, D., Bollen, A., Le Ray, D., 1997. Molecular characterization of antigen 24, a specific immunodominant antigen family from *Leishmania infantum*. *Parasitology* 115, 611–619.
- Deplazes, P., Smith, N.C., Arnold, P., Lutz, H., Eckert, J., 1995. Specific IgG1 and IgG2 antibody responses of dogs to *Leishmania infantum* and other parasites. *Parasite Immunol.* 17, 451–458.
- Fernández-Pérez, F.J., Méndez, S., de la Fuente, C., Cuquerella, M., Gómez, M.T., Alunda, J.M., 1999. Value of Western blotting in the clinical follow-up of canine leishmaniasis. *J. Vet. Diagn. Invest.* 11, 170–173.
- Fernández-Pérez, F.J., Gómez-Muñoz, M.T., Méndez, S., Alunda, J.M., 2003. *Leishmania*-specific lymphoproliferative responses and IgG1/IgG2 immunodetection patterns by Western blot in asymptomatic, symptomatic and treated dogs. *Acta Trop.* 86, 83–91.
- Fisa, R., Gállego, M., Portús, M., Gállego, J., 1991. Evolución de la leishmaniosis canina en zona endémica a través de su seguimiento serológico. *Cienc. Vet.* 4, 69–76.
- Fisa, R., Gállego, M., Castillejo, S., Aisa, M.J., Serra, T., Riera, C., Carrió, J., Gállego, J., Portús, M., 1999. Epidemiology of canine leishmaniosis in Catalonia (Spain). The example of the Priorat focus. *Vet. Parasitol.* 83, 87–97.
- Ghosh, A.K., Dasgupta, S., Ghose, A.C., 1995. Immunoglobulin G subclass-specific antileishmanial antibody responses in Indian kala-azar and post-kala-azar dermal leishmaniasis. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 2, 291–296.
- Iniesta, L., Fernández-Barredo, S., Bulle, B., Gómez, M.T., Piarroux, R., Gállego, M., Alunda, J.M., Portús, M., 2002. Diagnostic techniques to detect cryptic leishmaniasis in dogs. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 9, 1137–1141.
- Iqbal, J., Hira, P.R., Saroj, G., Philip, R., Al-Ali, F., Mada, P.J., Sher, A., 2002. Imported visceral leishmaniasis: diagnostic dilemmas and comparative analysis of three assays. *J. Clin. Microbiol.* 40, 475–479.
- Lanotte, G., Rioux, J.A., Périères, J., Vollhardt, Y., 1979. Ecologie des leishmanioses dans le sud de la France. 10. Les formes évolutives de la leishmaniose viscérale canine. Elaboration d'une typologie bio-clinique à finalité épidémiologique. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.* 54, 277–295.
- Leandro, C., Santos-Gomes, G.M., Campino, L., Romao, P., Cortes, S., Rolao, N., Gomes-Pereira, S., Riça Capela, M.J., Abranches, P., 2001. Cell mediated immunity and specific IgG1 and IgG2 antibody response in natural and experimental canine leishmaniosis. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 79, 273–284.
- Le Ray, D., Afchain, D., Capron, A., 1975. Contribution de la connaissance des antigènes de *Leishmania* à l'immunologie des Trypanosomatidae. *Colloques Internationaux du CNRS n° 239. Ecologie des Leishmanioses*, pp. 63–73.
- Mary, C., Lamouroux, D., Quilici, M., 1992. Western blot analysis of antibodies to *Leishmania infantum* antigens: potential of the 14-kDa and 16-kDa antigens for diagnosis and epidemiologic purposes. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 47, 764–771.
- Mettler, M., Grimm, F., Capelli, G., Camp, H., Deplazes, P., 2005. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assays, an immunofluorescent-antibody test, and two rapid tests (immunochromatographic-dipstick and gel tests) for serological diagnosis of symptomatic and asymptomatic *Leishmania* infections in dogs. *J. Clin. Microbiol.* 43, 5515–5519.
- 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 totals and recombinant antigens of *Leishmania infantum*: correlation with disease progression in canine experimental leishmaniasis. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 67, 117–130.
- Pinelli, E., Killick-Kendrick, R., Wagenaar, J., Bernadina, W., del Real, G., Ruitenber, J., 1994. Cellular and humoral immune responses in dogs experimentally and naturally infected with *Leishmania infantum*. *Infect. Immun.* 62, 229–235.
- Portús, M., Fisa, R., Serra, T., Gállego, M., Mora, M., 1987. Estudios seroepidemiológicos sobre la leishmaniosis canina en Cataluña. *Med. Vet.* 4, 569–575.
- Quinnell, R.J., Courtenay, O., Garcez, L.M., Kaye, P.M., Shaw, M.A., Dye, C., Day, M.J., 2003. IgG subclass responses in a longitudinal study of canine visceral leishmaniasis. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 91, 161–168.
- Ravindran, R., Anam, K., Bairagi, B.C., Saha, B., Pramanik, N., Guha, S.K., Goswami, R.P., Banerjee, D., Ali, N., 2004. Characterization of immunoglobulin G and its subclass response to Indian kala-azar infection before and after chemotherapy. *Infect. Immun.* 72, 863–870.

- Riera, C., Valladares, J.E., Gállego, M., Aisa, M.J., Castillejo, S., Fisa, R., Ribas, N., Carrió, J., Alberola, J., Arboix, M., 1999. Serological and parasitological follow-up in dogs experimentally infected with *Leishmania infantum* and treated with meglumine antimoniate. *Vet. Parasitol.* 84, 33–47.
- Sideris, V., Papadopoulou, G., Dotsika, E., Karagouni, E., 1999. Asymptomatic canine leishmaniasis in Greater Athens area, Greece. *Eur. J. Epidemiol.* 15, 271–276.
- Solano-Gallego, L., Riera, C., Roura, X., Iniesta, L., Gállego, M., Valladares, J.E., Fisa, R., Castillejo, S., Alberola, J., Ferrer, L., Arboix, M., Portús, M., 2001. *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.* 96, 265–276.
- Vercamen, F., Fernández-Pérez, F., del Amo, C., Alunda, J.M., 2002. Follow-up of *Leishmania infantum* naturally infected dogs treated with allopurinol: immunofluorescence antibody test, ELISA and Western blot. *Acta Trop.* 84, 175–181.
- Zijlstra, E.E., Daifalla, N.S., Kager, P.A., Khalil, A.G., El-Hassan, A.M., Reed, S.G., Ghalib, H.W., 1998. rK39 enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of *Leishmania donovani* infection. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 5, 717–720.

DETECTION OF ANTI-*LEISHMANIA* IMMUNOGLOBULIN G ANTIBODIES IN
URINE SPECIMENS OF DOGS WITH LEISHMANIASIS

DETECCIÓ DE INMUNOGLOBULINAS G ANTI-*Leishmania* EN
ORINA DE PERROS CON LEISHMANIOSIS

Laia Solano-Gallego, Alhelí Rodríguez, Laura Iniesta, Margarita Arboix,
Montserrat Portús y Jordi Alberola

CLINICAL AND DIAGNOSTIC LABORATORY IMMUNOLOGY, Sept. 2003, Vol. 10, No. 5 p. 849–855.

En este trabajo, realizado conjuntamente con miembros del Departamento de Farmacología de la *Facultat de Veterinària* de la *Universitat Autònoma de Barcelona*, se analiza la presencia de anticuerpos específicos anti-*Leishmania* en orina de perros con el fin de determinar su valor en el diagnóstico de la enfermedad. Se estudian mediante ELISA (proteína A e IgG2) 95 orinas pertenecientes a 30 perros con leishmaniosis confirmada, 20 con otras patologías y 45 animales de los que se carece de información.

La presencia de anticuerpos específicos en orina se detecta en 35 de los animales con diagnóstico de leishmaniosis o sin información.

El nivel de proteína/creatinina en orina se correlaciona con la tasa de anticuerpos en la orina. El cálculo del coeficiente de anticuerpos urinarios con relación a los anticuerpos séricos (C) y el análisis de las fracciones proteicas reveladas mediante *western blot*, sugieren que la presencia de anticuerpos anti-*Leishmania* en orina está causada mayoritariamente por un fallo del filtrado glomerular y, en menor medida, por una producción local.

Detection of Anti-*Leishmania* Immunoglobulin G Antibodies in Urine Specimens of Dogs with Leishmaniasis

L. Solano-Gallego,^{1*} A. Rodríguez,¹ L. Iniesta,² M. Arboix,¹ M. Portús,² and J. Alberola¹

Departament de Farmacologia, Terapèutica, i Toxicologia, Facultat de Veterinària, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra,¹ and Laboratori de Parasitologia, Departament de Microbiologia i Parasitologia Sanitàries, Universitat de Barcelona, 08028 Barcelona,² Barcelona, Spain

Received 10 January 2003/Returned for modification 10 March 2003/Accepted 7 May 2003

For years, anti-*Leishmania* immunoglobulin G (IgG) antibodies have been detected in the sera of dogs living in areas of leishmaniasis endemicity. They have also been found in the aqueous humor and cerebrospinal fluid. In contrast, a review of the literature failed to identify the detection of anti-*Leishmania* antibodies in urine samples from dogs with leishmaniasis. Ninety-five dog urine samples were examined for the presence of anti-*Leishmania* antibodies by using a protein A enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Twenty additional urine samples were collected from healthy dogs as controls. An IgG2 ELISA was performed on 26 urine samples found positive by the protein A ELISA. Twenty-three urine samples found positive to anti-*Leishmania* antibodies were tested for the local production of anti-*Leishmania* antibodies in the urinary tract by means of the urine antibody coefficient. Ten urine samples (and the corresponding serum samples) were compared by Western blot (WB) analysis. Thirty-five out of the 95 urine samples were found positive, 57 were found negative, and 3 were found inconclusive for antibody detection by the protein A ELISA. A high correlation between protein A and IgG2 levels was found in positive urine samples. Anti-*Leishmania* antibodies were present in the urine of dogs that had leishmaniasis, urinary protein/creatinine (U P/C) ratios of greater than one, and normal urinary sediment. A statistically significant correlation was observed between the U P/C ratios and the levels of anti-*Leishmania* antibodies in positive urine samples. In general, WB analysis and the urine antibody coefficient suggested that the presence of anti-*Leishmania* antibodies in urine was the consequence of an impairment of filtration of the glomerular barrier. However, in some dogs, WB analysis could be interpreted as suggesting that the presence of anti-*Leishmania* antibodies was caused, to a lesser extent, by local antibody production in the urinary tract. Antibody detection in urine could be a noninvasive method for leishmaniasis diagnosis and prognosis in dogs with glomerulonephropathies.

Canine leishmaniasis, caused by the protozoan parasite *Leishmania infantum*, is a severe systemic disease highly prevalent in the Mediterranean basin. Clinical manifestations of the disease include nonpruritic skin lesions, such as exfoliative dermatitis and ulcerations; local or generalized lymphadenopathy; loss of weight; poor appetite; ocular lesions; epistaxis; lameness; renal failure; and diarrhea (8, 12, 21, 36). Dogs with leishmaniasis have high anti-*Leishmania* immunoglobulin G (IgG) antibody levels in sera (23), and clinicopathological findings include anemia, hypoalbuminemia, hyperglobulinemia, hypercreatinemia, and proteinuria (22).

In the vast majority of cases, the fatal course of canine leishmaniasis is due to renal involvement (5, 32). The major renal lesion in canine (32) and human (7, 11) leishmaniasis is glomerulonephritis. However, interstitial nephritis, tubular nephropathy, and glomerular amyloidosis in conjunction with glomerulonephritis have also been found in dogs with leishmaniasis (30). The pathogenesis of renal lesions in both human (7, 40) and canine (38) visceral leishmaniasis is mainly attributed to immune complex deposition and subsequent glomerular injury. There have been reports of immunoglobulins and immune complex deposition in the glomerular capillaries and

mesangial matrix of human (7) and canine (28, 32) patients with leishmaniasis. Moreover, immune complexes have been found in the sera of human (19) and canine (26, 32) patients.

Because of the importance of glomerular injury in canine leishmaniasis, several tests, such as protein/creatinine (U P/C) ratios (31) and enzymuria (30), have been used to detect early renal damage in canine leishmaniasis to establish a prognosis and appropriate treatment. A recent study demonstrated that a large number of dogs with leishmaniasis (46%) have U P/C ratios of greater than one (22).

For years, anti-*Leishmania* IgG antibodies have been detected in the sera of dogs living in areas of leishmaniasis endemicity (6). They have also been found, but less frequently, in the aqueous humor (14) and cerebrospinal fluid (39). Moreover, investigators have detected anti-*Leishmania* antibodies in the urine of human patients with visceral leishmaniasis (20) and in the urine of *Leishmania donovani*-infected hamsters in association with glomerulonephritis (34). Nevertheless, a review of the literature failed to identify the detection of anti-*Leishmania* antibodies in urine samples from dogs with leishmaniasis.

We hypothesized that in dogs with *Leishmania*-associated glomerular injury, anti-*Leishmania* antibodies can pass through the glomerular barrier and therefore that urine from these dogs may contain anti-*Leishmania* antibodies. The first objective of this study was to investigate the presence of anti-*Leishmania* antibodies in the urine of dogs with leishmaniasis. The

* Corresponding author. Present address: Veterinary Teaching Hospital, Lynn Hall of Veterinary Medicine, 625 Harrison St., West Lafayette, IN 47907-2026. Phone: (765) 494-1107. Fax: (765) 496-6393. E-mail: lsolanog@purdue.edu.

second objective was to determine whether the presence of anti-*Leishmania* antibodies in the urine was caused by an impairment of the charge and/or size selectivity of the glomerular capillary wall or whether the antibodies were locally produced in the urinary tract.

MATERIALS AND METHODS

Urine and serum samples. Ninety-five dog urine samples collected from patients examined for a variety of diseases or disorders at the Veterinary Teaching Hospital of the Universitat Autònoma de Barcelona (VTH-UAB) between the years 2000 and 2002 were obtained from the sample bank kept at the Veterinarian Clinical Biochemistry Service of the Universitat Autònoma de Barcelona.

The urine samples were analyzed at the Veterinarian Clinical Biochemistry Service for U/P/C ratios. For the 95 urine samples, we were able to obtain clinicopathological data for 50 dogs from complete records maintained at the VTH-UAB (30 dogs with leishmaniasis and 20 dogs with other disorders). Partial information for 6 of the remaining 45 dogs was obtained from a database developed at the Serological Diagnostic Laboratory of Leishmaniasis of the Universitat Autònoma de Barcelona. For urine samples from 39 dogs, we had no information at all.

The 95 dog urine samples were examined for the presence of anti-*Leishmania* antibodies by a protein A enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Twenty urine samples were collected from healthy dogs as controls.

In order to ensure the detection of *Leishmania*-specific IgG by the protein A ELISA, 26 urine samples positive for protein A were screened for the presence of anti-*Leishmania* IgG2 antibodies. Twenty-three urine samples had anti-*Leishmania* antibodies, and their corresponding serum samples were used to assess the local production of anti-*Leishmania* antibodies in the urinary tract. Ten urine samples (and the corresponding serum samples) were used for immunoblot analysis.

All urine and serum samples used in this study were stored frozen at -20°C until assayed.

ELISA for the detection of anti-*Leishmania* antibodies in urine samples. All urine samples were tested for the presence of anti-*Leishmania* antibodies by the protein A ELISA. An ELISA that had been used for dog serum samples was adapted for urine samples (33). Microtiter plates were coated with $20\ \mu\text{g}$ of *L. infantum* antigen ml^{-1} in 0.1 ml of coating buffer (0.1 M carbonate-bicarbonate [pH 9.6]) and incubated overnight at 4°C . One hundred microliters of dog urine, diluted 1:100 in phosphate-buffered saline (PBS)-0.05% Tween 20 (PBST)-1% dried skim milk (PBST-M), was incubated in each well for 1 h at 37°C . After three washes with PBST and one wash with PBS, $100\ \mu\text{l}$ of protein A (1:5,000 dilution in PBST-M) conjugated to horseradish peroxidase (HRPO) (Sigma, St. Louis, Mo.) was added to each well. The plates were incubated for 1 h at 37°C and then rewashed. The substrate solution (*ortho*-phenylenediamine [0.4 mg/ml] [Sigma]- H_2O_2 [0.4 μl /ml] in 0.1 M phosphate-citrate buffer [pH 5.0]) was added at 200 μl /well and developed for 20 min at 24°C . The reaction was stopped with 50 μl of 3 M H_2SO_4 . Absorbance values were read at 492 nm with an automatic microELISA reader (Anthos 2001; Anthos Labtec Instruments GmbH, Wales, Austria).

An anti-dog IgG2-HRPO conjugate (1:2,500 dilution in PBST-M) (Bethyl Laboratories, Montgomery, Ala.) was also used with some of the urine samples to verify that the results were mainly due to IgG. The Bethyl anti-dog antiserum specific to IgG2 react with the four fractions of IgG so that the anti-dog IgG2-HRPO conjugate can be considered a reagent that measures total IgG (27).

The reaction was quantified as units relative to a positive urine sample used as a calibrator and arbitrarily set at 100 U. The cutoff values were established at 10 U for protein A and 16 U for IgG2 (mean and 4 standard deviations for 20 urine samples from healthy dogs). Negative results were established at 6 U for protein A and 10 U for IgG2 (mean and 2 standard deviations for 20 urine samples from healthy dogs). Uncertain results were established between positive and negative ELISA results for both conjugates.

All determinations included one serum sample from a sick dog with confirmed infection as a positive control.

Demonstration of the local production of anti-*Leishmania* antibodies in the urinary tract. Twenty-three urine samples found positive for anti-*Leishmania* antibodies were tested for local production in the urinary tract. The testing was performed as follows.

An ELISA to detect anti-*Leishmania* antibodies was performed with urine and serum samples from the same animal as described before but with some modifications. To assess the relative concentrations of antibodies in the two samples, the quantification was expressed as a titer (maximal dilution at which the sample

gave the same optical density as the negative control). A 1:15,000 dilution of protein A-HRPO was used for urine and serum samples from each dog. Urine and serum samples from each dog were assessed on the same microtiter plate.

Total IgG amounts in both serum and urine samples from the same dog were measured by a sandwich ELISA. The ELISA was performed according to the manufacturer's instructions (Dog IgG ELISA; Bethyl Laboratories) but with some modifications. Briefly, microtiter plates were coated with affinity-purified sheep anti-dog IgG at $10\ \mu\text{g}\ \text{ml}^{-1}$ in 0.1 M carbonate-bicarbonate buffer and incubated overnight at 4°C . Serum and urine samples were diluted 1:28,000 and 1:1,786, respectively, in PBST-M and were additionally diluted twofold four times for each tested sample. One hundred microliters of diluted dog serum or urine sample was incubated in each well for 1 h at 37°C . Reference serum dilutions were used to construct the standard curve. After three washes with PBST and one wash with PBS, $100\ \mu\text{l}$ of sheep anti-dog IgG (1:80,000) conjugated to HRPO was added to each well and incubated for 1 h at 37°C . The substrate solution contained *ortho*-phenylenediamine. The reaction was stopped with 3 M H_2SO_4 . Absorbance values were read at 492 nm with an automatic microELISA reader. Urine samples from eight healthy dogs were also tested.

The results for titers and total amounts of IgG in urine and serum samples from each dog were used to calculate the urine antibody coefficient (*C*) with the following formula adapted from previous studies of feline (24) and human (10) toxoplasmosis: $C = (\text{anti-}Leishmania\ \text{antibody\ titer\ for\ urine} \times \text{total\ IgG\ concentration\ in\ serum}) / (\text{anti-}Leishmania\ \text{antibody\ titer\ for\ serum} \times \text{total\ IgG\ concentration\ in\ urine})$.

Test results were interpreted as follows (10, 24): a *C* of <1 did not support the local production of antibody, a *C* of between 1 and 8 was suggestive of the local production of antibody, and a *C* of >8 was definitive evidence of the local production of antibody.

Immunoblot analysis. Western blot (WB) analysis was performed as described elsewhere (1) to confirm the positive results found for urine samples and to identify and compare the parasite antigens recognized by urine and serum samples from dogs with leishmaniasis. Immunoblotting was performed for 10 protein A ELISA-positive urine samples and for four protein A ELISA-negative urine samples. Urine and serum samples were collected on the same day from each patient. Antigen for immunoblot analysis was obtained from cultures of promastigotes in the logarithmic growth phase in Schneider's medium. Promastigotes were washed, counted, adjusted to a concentration of $3 \times 10^8/\text{ml}$ in sample buffer (0.5 M Tris-HCl [pH 6.8], 0.01 M EDTA, 5% sodium dodecyl sulfate, 5% 2-mercaptoethanol, 0.0125% bromophenol blue), and boiled for 5 min. Electrophoresis was performed with 0.1% sodium dodecyl sulfate-13% polyacrylamide gels. Polypeptides were transblotted onto nitrocellulose sheets (Millipore, Bedford, Mass.). Immunoblot analysis was carried out with serum samples at a 1:100 dilution and urine samples at a 1:25 dilution in 20 mM Tris-0.13 mM NaCl (pH 7.6) containing 0.05% Tween 20 and 1% dry skim milk. Protein A-HRPO and anti-dog IgG2-HRPO were used at 1:1,000 dilutions. Color was developed with 4-chloro-1-naphthol (Sigma) and H_2O_2 , and the reaction was stopped with tap water. The relative molecular weights of the detected bands were calculated with Quantity One software (version 4.1.1; Bio-Rad, Hercules, Calif.).

Statistical analysis. The Student *t* test of independence and the Pearson coefficient *r* analysis were performed by using the SPSS program.

RESULTS

Detection of anti-*Leishmania* antibodies in urine samples by ELISA. Of the 95 urine samples tested, 35 were found positive, 57 were found negative, and 3 were found inconclusive for antibody detection by the protein A ELISA. For the 35 positive urine samples, we had records from the VTH-UAB for 20 dogs (20 out of 30 dogs with leishmaniasis), and we had a diagnosis of leishmaniasis for six more dogs from the Serological Diagnostic Laboratory of Leishmaniasis of the Universitat Autònoma de Barcelona. The remaining nine dogs with positive urine samples were from the 39 dogs for which we had no information at all.

The levels of anti-*Leishmania* antibodies in positive urine samples ranged from 10.9 to 268.1 ELISA units, with a mean and standard deviation of 84.3 ± 81.5 ELISA units. The levels of anti-*Leishmania* antibodies in negative urine samples ranged from 0 to 5.6 ELISA units, with a mean and standard

TABLE 1. Clinicopathological data for 30 leishmaniasis patients^a

Type of analysis	Parameter	Value for the following group of dogs with leishmaniasis:		Normal range	t test value
		1 (n = 20)	2 (n = 10)		
Serum	Urea (mg/dl)	57.4 ± 46.0	53.6 ± 23.9	21.4–59.9	NS
	Creatinine (mg/dl)	1.2 ± 0.8	1.2 ± 0.6	0.5–1.5	NS
	Total protein (g/dl)	8 ± 1.6 ^b	7.6 ± 1.3 ^b	5.4–7.1	NS
	Gamma globulin (g/dl)	3.4 ± 1.5 ^b	2.1 ± 1 ^b	0.5–1.3	P < 0.05
	Beta globulin (g/dl)	2 ± 0.4 ^b	1.9 ± 0.5 ^b	0.9–1.6	NS
	Alpha 2 globulin (g/dl)	0.8 ± 0.2	0.8 ± 0.2	0.3–1.1	NS
	Alpha 1 globulin (g/dl)	0.3 ± 0.08	0.4 ± 0.1	0.2–0.5	P < 0.01
	Albumin (g/dl)	1.6 ± 0.4 ^b	2.3 ± 0.4	2.6–3.3	P < 0.001
	A/G ratio	0.26 ± 0.11 ^b	0.5 ± 0.2	>0.45	P < 0.001
Urine	U P/C ratio	5.8 ± 5 ^b	0.7 ± 0.6	<1	P < 0.01
	Density (g/ml)	1,031 ± 8.8	1,030 ± 9.8	>1,020	NS
	pH	7 ± 0.6	ND		

^a Data are reported as means and standard deviations. NS, not significant; ND, not determined.

^b Altered parameter.

deviation of 1.5 ± 1.5 ELISA units. The levels of anti-*Leishmania* antibodies in inconclusive urine samples ranged from 8.3 to 10 ELISA units, with a mean and standard deviation of 8.9 ± 0.9 ELISA units.

The IgG2 ELISA was performed for 26 out of 35 urine samples found positive by the protein A ELISA. All 26 urine samples were also found positive by the IgG2 ELISA. The levels of anti-*Leishmania* IgG2 in urine samples ranged from 22.6 to 324.0 ELISA units, with a mean and standard deviation of 149.0 ± 105.0 ELISA units. The levels of anti-*Leishmania* antibodies detected by the protein A ELISA in the 26 urine samples ranged from 13.6 to 300.0 ELISA units, with a mean and standard deviation of 103.0 ± 87.6 ELISA units. A high correlation between protein A and IgG2 ELISA results ($r = 0.9$, $P < 0.001$) was found for the 26 positive urine samples.

Clinicopathological data for dogs. The records kept at the VTH-UAB showed that 30 urine samples were from leishmaniasis patients and that 20 were from patients with other disorders.

All 30 leishmaniasis patients showed high anti-*Leishmania* antibody levels in sera. Twenty out of these 30 leishmaniasis patients were also positive for antibody detection in urine (designated group 1), while the remaining 10 were negative for antibody detection in urine and positive for antibody detection in sera (designated group 2). All 20 patients with other disorders were negative for antibody detection in both urine and sera.

Dogs with leishmaniasis and with antibodies in urine had nonspecific clinical signs related to glomerulonephritis or renal involvement, such as loss of weight, lethargy, anorexia, polydipsia-polyuria, and vomiting. Dogs with leishmaniasis and without antibodies in urine had nonspecific clinical signs of leishmaniasis, such as loss of weight, cutaneous and ocular lesions, and lymphadenopathy.

The results of serum and urine analyses for dogs previously diagnosed with leishmaniasis are recorded in Table 1. Serum analysis showed that in both leishmaniasis groups, the altered parameters were higher concentrations of gamma globulin and beta globulin and a lower concentration of albumin. However, dogs in group 1 had a statistically significant higher concentra-

tion of gamma globulin and a lower concentration of albumin than those in group 2. In addition, dogs in group 1 had an altered albumin/globulin (A/G) ratio and a significantly lower A/G ratio than dogs in group 2. In the urine analysis, dogs in group 1 had a U P/C ratio of greater than one and normal urinary sediment. Dogs in group 1 had a statistically significant higher U P/C ratio than dogs in group 2. In summary, as shown in Table 1, dogs with antibodies in urine had clinicopathological abnormalities related to glomerulonephritis or renal involvement, such as hypoalbuminemia, hyperglobulinemia, and proteinuria (U P/C ratio of greater than one).

A statistically significant correlation between U P/C ratios and levels of anti-*Leishmania* antibodies was found for the 20 positive urine samples ($r = 0.72$, $P < 0.0001$). The results are shown in Fig. 1.

Local production of anti-*Leishmania* antibodies in the urinary tract. Twenty-three urine samples positive for anti-*Leishmania* antibodies were tested for local production in the urinary tract, and only one had a C of greater than 1 (1.036). As expected, the anti-*Leishmania* antibody titers and concentrations of IgG in the urine samples were much lower than the anti-*Leishmania* antibody titers and concentrations of IgG in the serum samples for all dogs (Table 2).

The IgG concentration in the urine of eight healthy dogs showed a mean and standard deviation of 0.0026 ± 0.0036 mg/ml. This IgG concentration in the urine of healthy dogs was significantly lower than that in the urine of dogs with leishmaniasis (P value determined by the t test, 0.05).

Immunoblot analysis. All positive samples (urine and serum samples) recognized numerous polypeptide fractions of the *L. infantum* antigen with masses ranging from 12 to 85 kDa, with most bands at 16 to 69 kDa. The most frequent polypeptide fractions observed in both urine and serum samples were those of 14, 16, 20, 30, 31, 48, and 69 kDa. The immunoblot analysis did not reveal any polypeptide fractions of the *L. infantum* antigen in ELISA-negative urine samples.

The band pattern revealed by urine from dogs with high levels of specific anti-*Leishmania* antibodies detected by the ELISA was more intense than the pattern revealed by urine

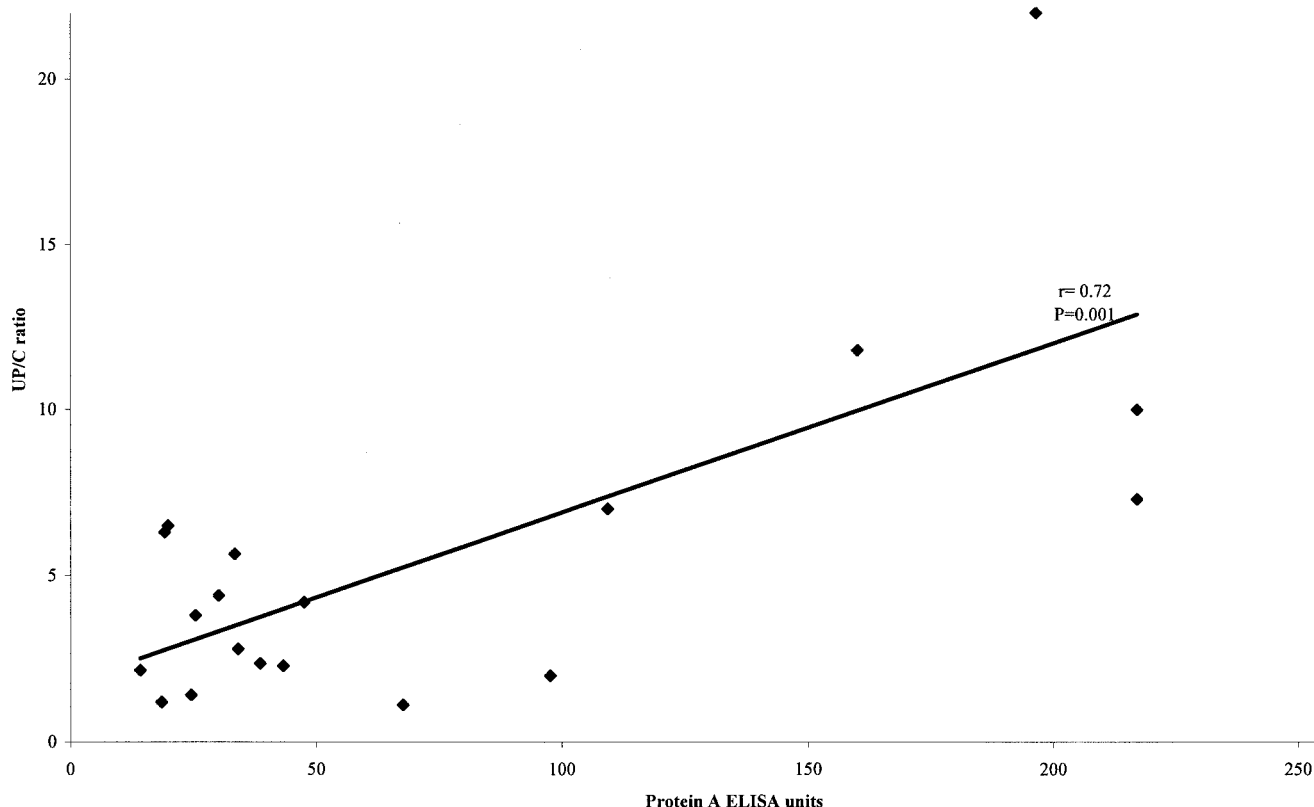


FIG. 1. Relationship between U P/C ratios and anti-*Leishmania* antibody levels, as determined by the protein A ELISA, for 20 positive urine samples.

from dogs with low levels of anti-*Leishmania* antibodies detected by the ELISA.

In general, when the patterns obtained by immunoblotting for the urine and serum samples from the same dog were compared, we found that the number of bands revealed by serum antibodies and the intensity of those bands were higher than those of bands revealed by urine antibodies. The patterns of bands revealed by protein A and IgG2 conjugates showed slight differences. When the anti-IgG2 conjugate was used, some differences were observed in the patterns of bands revealed by urine and serum antibodies over the molecular mass range. In some cases, urine antibodies revealed bands that were not observed with the corresponding serum antibodies, and in other cases, some bands revealed by urine antibodies showed a higher intensity than the homologous bands in the serum strips (Fig. 2). When the protein A conjugate was used, some additional differences were observed, mainly in the region of low molecular mass (less than 30 kDa).

TABLE 2. Antibody detection and C for 23 dogs with leishmaniasis

Parameter	Anti- <i>Leishmania</i> antibody titer in:		IgG concn (mg/ml) in:		C
	Urine	Serum	Urine	Serum	
Mean	3,791	799,165	0.707	46.618	0.397
SD	5,956	616,092	0.913	25.485	0.258

DISCUSSION

Immunoglobulins have been found in the urine of human patients with glomerular disease in a variety of disorders (4, 3, 25, 29). Moreover, several infectious diseases are diagnosed by the finding of specific antibodies in urine, such as *Helicobacter pylori* infection (18), filariasis (17), or schistosomiasis (35). The presence of anti-*Leishmania* antibodies in the urine of human patients with visceral leishmaniasis (16, 20) and in the urine of *L. donovani*-infected hamsters (34) has also been described. In contrast, there is a lack of information about immunoglobulins in the urine of healthy and sick dogs. In this study, we report the presence of anti-*Leishmania* antibodies in the urine of dogs with leishmaniasis. In addition, we describe, for the first time, the detection of total IgG concentrations in the urine of healthy dogs and dogs with leishmaniasis.

One of the common features of canine leishmaniasis is the development of hyperglobulinemia, and the elevation occurs in the IgG fraction. Dogs with leishmaniasis have high *Leishmania*-specific IgG levels in sera (23). The diagnosis of canine leishmaniasis can be performed by serological tests, such as the dot ELISA (13), the ELISA (33), and WB (1), with protein A as the detection probe to detect *Leishmania*-specific immunoglobulins. The reactivity of protein A with immunoglobulins from dogs is quite strong. Protein A reacts with all subclasses of IgG and partially reacts with dog IgA and IgM (15). To verify that the results found for urine by the ELISA and WB

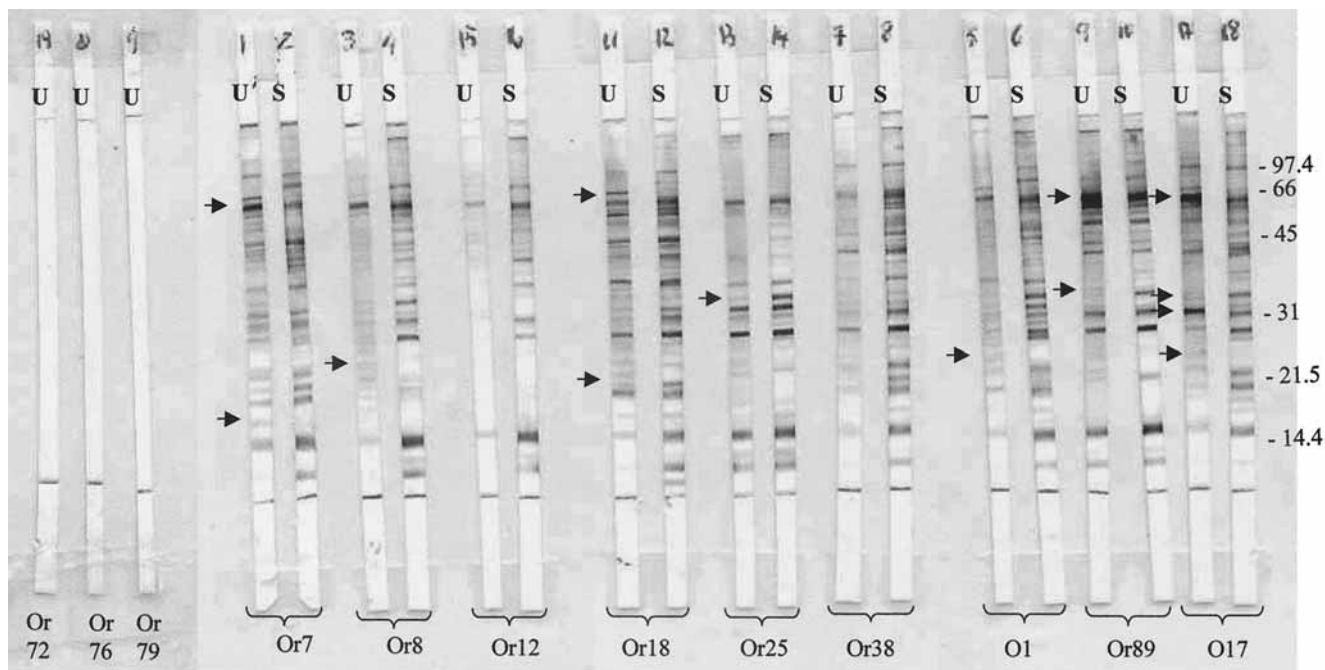


FIG. 2. Results of WB analysis with an IgG2-HRPO conjugate. U, urine; S, serum. Or7, Or8, Or12, Or18, Or25, Or38, O1, Or89, and O17 represent positive dogs. Or72, Or76, and Or79 represent negative controls. The urine from dogs Or7, Or8, and Or12 had low levels of *Leishmania*-specific IgG detected by the ELISA. The urine from dogs Or18, Or25, and Or38 had medium levels of *Leishmania*-specific IgG. The urine from dogs O1, Or89, and O17 had high levels of *Leishmania*-specific IgG. Arrows indicate idiotypic differences between serum and urine samples from the same dog. Numbers at right are kilodaltons.

were mainly due to the detection of IgG, an anti-dog IgG2-HRPO conjugate was also used with some of the urine samples. Previous studies demonstrated that the anti-dog IgG2-HRPO conjugate used (Bethyl) reacts with all subclasses of IgG (27) and that the levels of anti-*Leishmania* antibodies detected with this conjugate correlate with those detected with an anti-dog IgG-HRPO conjugate (37).

The correlation found between protein A and IgG2 ELISA units in positive urine samples was high. Therefore, we could consider that the anti-*Leishmania* antibodies found in urine were predominantly IgG. Immunofluorescence studies of pathological kidneys from dogs with leishmaniasis have described IgG and other immunoglobulins, such as IgM and IgA, in the affected glomeruli (28). Further studies are needed to determine the importance of other immunoglobulins in dogs with leishmaniasis.

For clinical veterinarians, it is very important to check the renal status of dogs with leishmaniasis in order to provide appropriate prognosis and treatment. The U P/C ratio has proven useful for detecting proteinuria as an index of renal failure in dogs (41). Furthermore, it has been demonstrated that the total urinary protein level and the U P/C ratio have better diagnostic value than a serum biochemical renal profile for detecting early renal lesions in canine leishmaniasis (31). For these reasons, clinician veterinarian practitioners use the U P/C ratio to detect proteinuria in dogs with leishmaniasis both at diagnosis and during follow-up treatment. However, few extensive studies are available concerning U P/C ratios in dogs with leishmaniasis at diagnosis and during follow-up treatment (22). A recent study demonstrated that a large num-

ber of dogs with leishmaniasis (21 out of 45) had U P/C ratios of greater than one. After 4 months of allopurinol treatment, most of the proteinuric dogs (15 of 17) not only did not experience any further deterioration of their renal function but also showed a decrease in (8 of 15) or even a disappearance of (4 of 15) proteinuria at the end of the trial (22). This previous study demonstrated the usefulness of assessing proteinuria at the time of diagnosis and during treatment to obtain an accurate prognosis for a patient with leishmaniasis. However, infection and marked blood contamination of urine samples could result in an abnormal U P/C ratio in the absence of glomerular disease. Consequently, the U P/C ratio alone does not distinguish between the types of proteinuria. Total serum protein, albumin, and urinary sediment evaluations would complete the screening profile to differentiate prerenal, renal, or postrenal proteinuria (2). Therefore, techniques that evaluate the renal status of dogs with leishmaniasis are of great value.

As we expected, dogs that had anti-*Leishmania* antibodies in their urine had U P/C ratios of greater than one and urinary sediment findings compatible with renal disease. Moreover, we found a statistically significant correlation between U P/C ratios and anti-*Leishmania* antibody levels in urine. In contrast, dogs that had leishmaniasis demonstrated by high anti-*Leishmania* antibody levels in sera but that were nonproteinuric were found negative for anti-*Leishmania* antibodies in urine. Because the detection of anti-*Leishmania* antibodies in urine is a more specific test than the U P/C ratio, it might be a useful tool for establishing appropriate prognosis and treatment. Further studies are needed to investigate the usefulness of detec-

tion of anti-*Leishmania* antibodies in urine samples for the follow-up of treated dogs with leishmaniasis.

Due to the clinical and retrospective points of view of this study, we did not perform histopathological studies of the kidneys from any of the dogs. However, for 23 dogs, we tried to predict whether the presence of anti-*Leishmania* antibodies in the urine was caused by an inability of the glomeruli to properly filter or by local production in the urinary tract. In the majority of cases (22 out of 23), *C* was suggestive of passage from plasma through the glomerular barrier. None of the dogs had a *C* of greater than eight, which is considered strong evidence of local production (10). Therefore, our results compared favorably with those of previous histopathological studies. Because the major renal lesion in canine leishmaniasis is glomerulonephritis (32), most dogs appear to have glomerular injury. This nonselective proteinuria can explain the finding of IgG in the urine. Nonselective proteinuria in human patients has been defined as increased urinary excretion of high-molecular-weight plasma proteins, such as IgG, and this finding is a good indicator of renal disease progression (3).

Studies that have compared the WB patterns in different samples from patients with *Toxoplasma gondii* infections (9) have considered the detection of specific oligoclonal IgG bands in cerebrospinal fluid to be indicative of a local immune response. In the present study, slight differences were observed in the patterns of polypeptide fractions in the *Leishmania* antigens recognized by urine and serum samples from dogs with leishmaniasis. The passage of IgM through the glomerular barrier may be restricted due to its high molecular weight, thus resulting in differences in the patterns revealed by urine and serum samples when protein A is used. Nevertheless, this restriction will not be evident when only the IgG2 isotype is investigated. In this situation, if all specific antibodies present in urine were of blood origin, the proportions of the different idiotypes in serum and urine would be the same. Consequently, the findings observed suggest that the presence of *Leishmania*-specific antibodies in urine is mainly caused by the passage into the urinary tract of blood-derived immunoglobulins and, to a lesser extent, by the local production of antibodies. This local production of anti-*Leishmania* antibodies in the urinary tract might be explained by the presence of a predominant tubulointerstitial nephritis lesion in dogs (32) or by lesions in other urinary or genital organs, such as the bladder, urethra, or prostate.

In conclusion, this is the first study that describes the detection of anti-*Leishmania* IgG antibodies in urine samples from dogs with leishmaniasis. Our results showed that urine antibodies were found only in proteinuric dogs. Further studies are needed to evaluate the meaning and usefulness of the presence of anti-*Leishmania* IgG antibodies in urine. However, the findings suggest that anti-*Leishmania* antibody detection in urine is a more specific and more reliable noninvasive method for leishmaniasis diagnosis and prognosis than is the U/P/C ratio for dogs with glomerulonephropathies.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to the patients and veterinarians from VTH-UAB and to the Veterinarian Clinical Biochemistry Service of the Universitat Autònoma de Barcelona for collaboration in this study.

REFERENCES

- Aisa, M. J., S. Castillejo, M. Gállego, R. Fisa, C. Riera, M. de Colmenares, S. Torras, X. Roura, J. Sentis, and M. Portús. 1998. Diagnostic potential of western blot analysis of sera from dogs with leishmaniasis in endemic areas and significance of the pattern. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **58**:154–159.
- Bagley, R. S., S. A. Center, R. M. Lewis, S. Shin, S. A. Dougherty, J. F. Randolph, and H. Erb. 1991. The effect of experimental cystitis and iatrogenic blood contamination on the urine protein/creatinine ratio in the dog. *J. Vet. Intern. Med.* **5**:66–70.
- Bakoush, O., A. Grubb, B. Rippe, and J. Tencer. 2001. Urine excretion of protein HC in proteinuric glomerular diseases correlates to urine IgG but not to albuminuria. *Kidney Int.* **60**:1904–1909.
- Bakoush, O., J. Tencer, J. Tapia, B. Rippe, and O. Torffvit. 2002. Higher urinary IgM excretion in type 2 diabetic nephropathy compared to type 1 diabetic nephropathy. *Kidney Int.* **61**:203–208.
- Benderitter, T., P. Casanova, L. Nashkidachvili, and M. Quilici. 1988. Glomerulonephritis in dogs with canine leishmaniasis. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* **82**:335–341.
- Bettini, S., and L. Gradoni. 1986. Canine leishmaniasis in the Mediterranean area and its implications for human leishmaniasis. *Insect Sci. Appl.* **7**:241–245.
- Brito, T., S. Hashino-Shimizu, V. AmatoNato, I. S. Duarte, and D. O. Penna. 1975. Glomerular involvement in human Kala-azar. A light immunofluorescent and electron microscope study based on kidney biopsies. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **24**:9–18.
- Ciaramella, P., G. Oliva, R. de Luna, L. Gradoni, R. Ambrosio, L. Cortese, A. Scalone, and A. Persechino. 1997. A retrospective clinical study of canine leishmaniasis in 150 dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. *Vet. Rec.* **141**:539–543.
- Contini, C., E. Fainardi, R. Cultrera, R. Canipari, F. Peyron, S. Delia, E. Paolino, and E. Granieri. 1998. Advanced laboratory techniques for diagnosing *Toxoplasma gondii* encephalitis in AIDS patients: significance of intrathecal production and comparison with PCR and ECL-Western blotting. *J. Neuroimmunol.* **92**:29–37.
- Desmonts, G. 1966. Definitive serological diagnosis of ocular toxoplasmosis. *Arch. Ophthalmol.* **76**:839–851.
- Dutra, M., R. Martinelli, E. M. de Carvalho, L. E. Rodrigues, E. Brito, and H. Rocha. 1985. Renal involvement in visceral leishmaniasis. *Am. J. Kidney Dis.* **6**:22–27.
- Ferrer, L., R. Rabanal, D. Fondevila, J. A. Ramos, and M. Domingo. 1988. Skin lesions in canine leishmaniasis. *J. Small Anim. Pract.* **29**:381–388.
- Fisa, R., M. Gállego, C. Riera, M. J. Aisa, D. Valls, T. Serra, M. de Colmenares, S. Castillejo, and M. Portús. 1997. Serologic diagnosis of canine leishmaniasis by dot-ELISA. *J. Vet. Diagn. Invest.* **9**:50–55.
- García-Alonso, M., A. Blanco, D. Reina, F. J. Serrano, C. Alonso, and C. G. Nieto. 1996. Immunopathology of the uveitis in canine leishmaniasis. *Parasite Immunol.* **18**:617–623.
- Goudswaard, J., J. A. van der Donk, A. Noordzij, R. H. van Dam, and J. P. Vaerman. 1978. Protein A reactivity of various mammalian immunoglobulins. *Scand. J. Immunol.* **8**:21–28.
- Islam, M. Z., M. Itoh, S. M. Shamsuzzaman, R. Mirza, F. Matin, I. Ahmed, A. K. Shamsuzzaman Choudhury, M. A. Hossain, X. G. Qiu, N. Begam, M. Furuya, J. L. Leafasia, Y. Hashiguchi, and E. Kimura. 2002. Diagnosis of visceral leishmaniasis by enzyme-linked immunosorbent assay using urine samples. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **9**:789–794.
- Itoh, M., M. V. Weerasooriya, G. Qiu, N. K. Gunawardena, M. T. Anantaphruti, S. Tesana, P. Rattanaxay, Y. Fujimaki, and E. Kimura. 2001. Sensitive and specific enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of *Wuchereria bancrofti* infection in urine samples. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **65**:362–365.
- Kato, S., T. Tachikawa, K. Ozawa, M. Konno, M. Okuda, T. Fujisawa, Y. Nakazato, H. Tajiri, and K. Linuma. 2001. Urine-based enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of *Helicobacter pylori* infection in children. *Pediatrics* **107**:E87.
- Kharazmi, A., H. R. Rezai, M. Fani, and N. C. Behforouz. 1982. Evidence for the presence of circulating immune complexes in serum and C3b and C3d on red cells of kala-azar patients. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **76**:793–796.
- Kohanteb, J., S. M. Ardehali, and H. R. Rezai. 1987. Detection of *Leishmania donovani* soluble antigen and antibody in the urine of visceral leishmaniasis patients. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **81**:578–580.
- Koutinas, A. F., Z. S. Polizopoulou, M. N. Saridomichelakis, D. Argyriadis, A. Fytianou, and K. G. Plevraki. 1999. Clinical considerations on canine visceral leishmaniasis in Greece: a retrospective study of 158 cases (1989–1996). *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.* **35**:376–383.
- Koutinas, A. F., M. N. Saridomichelakis, M. E. Mylonakis, L. Leontides, Z. Polizopoulou, C. Billinis, D. Argyriadis, N. Diakou, and O. Papadopoulos. 2001. A randomised, blinded, placebo-controlled clinical trial with allopurinol in canine leishmaniasis. *Vet. Parasitol.* **98**:247–261.
- Lanotte, G., J. A. Rioux, J. Perieres, and Y. Vollhardt. 1979. Ecologie des leishmaniose dans le sud de la France. 10. Les formes évolutives de la

- leishmaniose viscerale canine. Elaboration d'une typologie bio-clinique à finalité épidémiologique. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.* **54**:227–295.
24. **Lappin, M. R., S. M. Roberts, M. G. Davidson, C. C. Powell, and J. S. Reif.** 1992. Enzyme-linked immunosorbent assays for the detection of *Toxoplasma gondii*-specific antibodies and antigens in the aqueous humor of cats. *Am. Vet. Med. Assoc.* **201**:1010–1016.
 25. **Lee, T. M., S. F. Su, and C. H. Tsai.** 2002. Effect of pravastatin on proteinuria in patients with well-controlled hypertension. *Hypertension* **40**:67–73.
 26. **Lopez, R., R. Lucena, M. Novales, P. J. Ginel, E. Martin, and J. M. Molleda.** 1996. Circulating immune complexes and renal function in canine leishmaniasis. *Zentbl. Vetmed. Reihe B* **43**:469–474.
 27. **Mazza, G., W. P. Duffus, C. J. Elson, C. R. Stokes, A. D. Wilson, and A. H. Whiting.** 1993. The separation and identification by monoclonal antibodies of dog IgG fractions. *J. Immunol. Methods* **161**:193–203.
 28. **Nieto, C. G., I. Navarrete, M. A. Habela, F. Serrano, and E. Redondo.** 1992. Pathological changes in kidneys of dogs with natural *Leishmania* infection. *Vet. Parasitol.* **45**:33–47.
 29. **Norden, A. G., M. Lapsley, P. J. Lee, C. D. Pusey, S. J. Scheinman, F. W. Tam, R. V. Thakker, R. J. Unwin, and O. Wrong.** 2001. Glomerular protein sieving and implications for renal failure in Fanconi syndrome. *Kidney Int.* **60**:1885–1892.
 30. **Palacio, J., F. Liste, and M. Gascon.** 1997. Enzymuria as an index of renal damage in canine leishmaniasis. *Vet. Rec.* **140**:477–480.
 31. **Palacio, J., F. Liste, and M. Gascón.** 1995. Urinary protein/creatinine ration in the evaluation of renal failure in canine leishmaniasis. *Vet. Rec.* **137**:567–568.
 32. **Poli, A., F. Abramo, F. Mancianti, M. Nigro, S. Pieri, and A. Bionda.** 1991. Renal involvement in canine leishmaniasis. A light-microscopic, immunohistochemical and electron-microscopic study. *Nephron* **57**:444–452.
 33. **Riera, C., J. E. Valladares, M. Gállego, M. J. Aisa, S. Castillejo, R. Fisa, N. Ribas, J. Carrió, J. Alberola, and M. Arboix.** 1999. Serological and parasitological follow-up in dogs experimentally infected with *Leishmania infantum* and treated with meglumine antimoniate. *Vet. Parasitol.* **84**:33–47.
 34. **Sartori, A., A. V. De Oliveira, M. C. Roque-Barreira, M. A. Rossi, and A. Campos-Neto.** 1987. Immune complex glomerulonephritis in experimental kala-azar. *Parasite Immunol.* **9**:93–103.
 35. **Shaker, Z. A., M. A. Kaddah, S. B. Hanallah, and M. I. El-Khodary.** 1998. Production of monoclonal antibodies against target schistosomal antigen secreted in the urine of *Schistosoma mansoni*-infected patients. *Int. J. Parasitol.* **28**:1893–1901.
 36. **Slappendel, R. J.** 1988. Canine leishmaniasis: a review based on 95 cases in the Netherlands. *Vet. Q.* **10**:1–16.
 37. **Solano-Gallego, L., C. Riera, X. Roura, L. Iniesta, M. Gállego, J. E. Valladares, R. Fisa, S. Castillejo, J. Alberola, L. Ferrer, M. Arboix, and M. Portús.** 2001. *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.* **96**:265–276.
 38. **Tafari, W. L., M. S. Michalick, M. Dias, O. Genaro, V. H. Leite, A. J. Barbosa, E. A. Bambirra, C. A. da Costa, M. N. Melo, and M. W. Mayrink.** 1989. Optical and electron microscopic study of the kidney of dogs naturally and experimentally infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi*. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* **31**:139–145.
 39. **Vinuelas, J., M. Garcia-Alonso, L. Ferrando, I. Navarrete, I. Molano, C. Miron, J. Carcelen, C. Alonso, and C. G. Nieto.** 2001. Meningeal leishmaniasis induced by *Leishmania infantum* in naturally infected dogs. *Vet. Parasitol.* **101**:23–27.
 40. **Weisinger, J. R., A. Pinto, G. A. Velazquez, I. Bronstein, J. J. Dessene, J. F. Duque, J. Montenegro, F. Tapanes, and A. R. de Rouse.** 1978. Clinical and histological kidney involvement in human kala-azar. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **27**:357–359.
 41. **White, J. V., N. B. Olivier, K. Reimann, and C. Johnson.** 1984. Use of protein-to-creatinine ratio in a single urine specimen for quantitative estimation of canine proteinuria. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **185**:882–885.

CROSS-SECTIONAL SEROSURVEY OF FELINE LEISHMANIASIS IN
ECOREGIONS AROUND THE NORTHWESTERN MEDITERRANEAN

ESTUDIO SEROLÓGICO TRANSVERSAL DE LEISHMANIOSIS FELINA
EN REGIONES DEL NOROESTE MEDITERRÁNEO

Laia Solano-Gallego, Alhelí Rodríguez-Cortés, Laura Iniesta, Josefina Quintana, Joseph Pastor,
Yvonne Espada, Montserrat Portús y Jordi Alberola

AMERICAN JOURNAL OF TROPICAL MEDICINE AND HYGIENE, 2007, Vol. 76, Nº 4, p. 676-680.

En este trabajo, realizado también en colaboración con la *Facultat de Veterinària de la Universitat Autònoma de Barcelona*, se analizan mediante ELISA y *western blot* los anticuerpos específicos anti-*Leishmania* de 445 sueros de gatos de zona endémica para la leishmaniosis con el objetivo de determinar el papel del gato como reservorio de esta zoonosis.

Los resultados muestran una alta prevalencia de seropositividad que alcanza el 6,29 %, si bien con una tasa de anticuerpos específicos mucho menor a la encontrada en perros, lo que se corresponde a los pocos casos clínicos descritos en la zona. El patrón de fracciones proteicas revelado por el *western blot* concuerda con el encontrado en humanos y en perros. Estos resultados apoyan la hipótesis de que el gato actúa como verdadero reservorio de la leishmaniosis y no como un hospedador accidental, tal como se viene considerando.

CROSS-SECTIONAL SEROSURVEY OF FELINE LEISHMANIASIS IN ECOREGIONS AROUND THE NORTHWESTERN MEDITERRANEAN

LAIA SOLANO-GALLEGO, ALHELÍ RODRÍGUEZ-CORTÉS, LAURA INIESTA, JOSEFINA QUINTANA,
JOSEPH PASTOR, YVONNE ESPADA, MONTSERRAT PORTÚS, AND JORDI ALBEROLA*

Departament de Farmacologia, Terapèutica i Toxicologia and Departament de Medicina i Cirurgia Animals, Facultat de Veterinària,
Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra (Barcelona), Spain; Laboratori de Parasitologia, Departament de Microbiologia i
Parasitologia Sanitàries, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain

Abstract. A cross-sectional serosurvey using *Leishmania infantum* ELISA was performed on 445 cats living in ecoregions around the Northwestern Mediterranean basin; 58 cats from an area of the US where leishmaniasis is not endemic were used as negative controls. ELISA results were further confirmed in 69 cats by Western blot (WB). Finally, 76 of them were also tested for FeLV and FIV. Seroprevalence by ELISA-prot A was 6.29%, and that by ELISA-IgG was 5.25%. Positive cat sera recognized patterns of polypeptides in WB, including *L. infantum*-specific antigenic fractions. There was no association with retroviruses. *Leishmania*-specific antibodies are prevalent in cats living in ecoregions around the Northwestern Mediterranean basin; thus, leishmaniasis must be included in the differential diagnosis of diseases in cats living in these ecoregions. Their role as peridomestic reservoirs for *L. infantum* needs further characterization, but it could be hypothesized that the cat is a secondary reservoir host, rather than an accidental one.

INTRODUCTION

Leishmaniasis are endemic in 88 countries on 4 continents. In terms of global disease load, the leishmaniasis are the third most important vector-borne disease, after malaria and lymphatic filariasis, causing 2.4 million disability-adjusted life years lost and 59,000 deaths in 2001.¹ The causative agents are parasitic protozoan of the genus *Leishmania*. Over 20 species and subspecies of *Leishmania* infect human beings, and sand flies from the genus *Phlebotomus* spp. and *Lutzomyia* spp. are the proven vectors of human visceral and cutaneous and also of canine (CaL) leishmaniasis. *Leishmania* can cause a broad spectrum of clinical outcomes, ranging from self-healing skin ulcers, to severe, life-threatening disease. Some leishmaniasis are a widespread serious zoonotic disease with a great impact on public health. Understanding how the disease behaves in domestic and wild animals is therefore of great value both in human and veterinary medicine.

Dog is the main peridomestic reservoir for zoonotic leishmaniasis caused by *Leishmania infantum* (= *L. chagasi*) in the Palearctic and in the Neotropic ecozones. The prevalence of infection in dogs living in the ecoregions around the Northwestern Mediterranean basin reaches a remarkable 67% in areas where it is highly endemic,² much higher than previously published results. Because of the feeding habits of sand flies and marked lack of host preference,³ other vertebrate species are potential reservoir hosts. In fact, strains of *L. infantum* have been isolated and identified in mammals other than humans and dogs living in Western Palearctic, such as foxes,^{4,5} rats,⁶ horses,⁷ and cats.⁸

Leishmaniasis in cats was first described in 1912 in Algeria in a sample of bone marrow from a 4-month old kitten⁹ living as a pet in the same house where a dog suffered from CaL and a child was affected by visceral leishmaniasis. Since then, asymptomatic infection or clinical disease in domestic cats caused by *L. infantum* has been reported in ecoregions

around the Mediterranean basin sporadically. Cutaneous forms consisting of ulcerocrusted dermatitis, nodular dermatitis, alopecia, and scaling are those most frequently described in feline leishmaniasis,^{10–14} and visceral forms with liver, spleen, lymph nodes, and kidney involvement have been less commonly described.^{11,15–18} Coinfection with immunosuppressive viruses, both feline leukemia virus (FeLV) and feline immunodeficiency virus (FIV), has been recently confirmed.¹² Experimental infection with *L. infantum* has also been achieved with cats showing serum antibody titers but without clinical symptoms.¹⁹

Little information is available about epidemiology of feline leishmaniasis caused by *L. infantum* in the Southwestern Palearctic.²⁰ Over the past years, 8 epidemiologic studies have been carried out in these ecoregions,^{12,21–27} with seroprevalences ranging from 62% to 0.9%. In Spain, 115 of 117 cats screened using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) were negative and 2 were uncertain for *L. infantum* antibody detection.²⁶

The aim of the present study was to characterize the epidemiology of feline leishmaniasis in ecoregions around the Northwestern Mediterranean basin by means of a broad cross-sectional serosurvey, to gain an understanding of the role of the cat in this zoonosis.

MATERIAL AND METHODS

Study subjects. Sera collected from 445 cats from the Northeastern Iberian Peninsula and Balearic Islands were studied. Cats were from three different areas: Barcelona ($N = 390$), Tarragona ($N = 12$), and the island of Mallorca ($N = 43$). Clinical veterinarians collected all samples. Samples from Barcelona had two different origins: 255 stray cats from the animal pound of Barcelona and 135 cats examined at the Veterinary Teaching Hospital of the Universitat Autònoma de Barcelona.

Complete history was not available for all cats. One hundred and one were male and 76 cats were female. Ninety-three were clinically healthy and 63 presented clinical signs for a variety of diseases. The mean \pm SD age for 134 cats was 4.1 ± 4.1 years, ranging from 3.6 months to 17 years. Breed

* Address correspondence to Jordi Alberola, Departament de Farmacologia, Terapèutica i Toxicologia, Facultat de Veterinària, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Barcelona, Spain. E-mail: Jordi.Alberola@uab.es.

was known for 168 cats with 152 European, 9 Persian, and 7 Siamese. No other information was available.

Sera collected from 58 cats seen for medical reasons at the North Carolina State University Veterinary Teaching Hospital, Raleigh, NC, where leishmaniasis is not endemic, were used as negative controls to establish the cut-off for serological techniques.

ELISA. To increase the robustness of the serosurvey results, 2 different ELISAs were carried out. ELISA-prot A (prot A) was performed on all cat samples, and ELISA-Immunoglobulin (Ig) G was performed on a subset of 305 samples.

An ELISA previously described for dog sera was adapted to cat sera.²⁸ Briefly, microtiter plates were coated with 0.1 mL of *L. infantum* (MHOM/FR/78/LEM-75 zymodeme MON-1) antigen (20 µg mL⁻¹ in 0.1 M carbonate-bicarbonate, pH 9.6) and incubated overnight at 4°C. One hundred microliters per well of cat sera, diluted 1:200 in PBS-0.05% Tween 20 (PBST)-1% dried skimmed milk (PBST-M), was incubated for 1 h at 37°C. After 3 washes with PBST and 1 wash with PBS, 100 µL per well of protein A (prot A) (0.2 µg mL⁻¹ dilution in PBST-M buffer; Sigma, St. Louis, MO) or anti-cat IgG (1:5000 in PBST-M; Cappel, Durham, NC), both conjugated to horseradish peroxidase (HRPO), was added. These conjugates were incubated for 1 h at 37°C, and then the plates were rewashed. The substrate solution (*ortho*-phenylenediamine, 0.4 mg mL⁻¹; Sigma) plus H₂O₂ (0.4 µL mL⁻¹) in 0.1 M phosphate/citrate buffer, pH 5.0, was added at 200 µL per well and developed for 20 min at 24°C. The reaction was stopped with 50 µL of 3 M H₂SO₄. Absorbance values were read at 492 nm in an automatic micro-ELISA reader (Anthos 2001, Anthos Labtec Instruments, GmbH, Eugendorf, Austria). The reaction was quantified as ELISA units (EU) related to a positive cat sera used as a calibrator and arbitrarily set at 100 EU. This cat has confirmed leishmaniasis by bone marrow cytology, immunohistochemistry staining of ocular tissues, and bone marrow polymerase chain reaction.¹⁸ All determinations included the calibrator serum as a positive control and serum of a cat from an area where leishmaniasis is not endemic as a negative control.

The cut-off was established at 44 EU for prot A and at 53 EU for IgG (mean + 4 standard deviations of sera of 58 cats from an area where leishmaniasis is not endemic). Negative results were established at 29 EU for prot A and at 36 EU for IgG (mean + 2 standard deviations of sera of 58 cats from an area where leishmaniasis is not endemic). Uncertain results were established between positive and negative results for both conjugates.

Immunoblot analysis. To confirm ELISA results, 25 positive cat sera by ELISA and 44 negative cat sera from an area where leishmaniasis is not endemic were assessed by Western blot (WB). WB was performed as described elsewhere.²⁹ Antigen (3 × 10⁸ promastigotes mL⁻¹) in sample buffer (0.5 M Tris-HCl, pH 6.8, 0.01 M EDTA, 5% sodium dodecylsulfate (SDS), 5% 2-mercaptoethanol, 0.0125% bromophenol blue) was run in 0.1% SDS-13% polyacrylamide gels. Immunoblot was carried out with sera at 1:50 dilution in 20 mM Tris, 0.13 mM NaCl, pH 7.6, containing 0.05% Tween 20 (TST) and 1% dry skimmed milk. Prot A-HRPO (Sigma) at 1:1000 dilution was used as secondary detection probe. Color was developed with 4-chloro-1-naphthol (Sigma) and H₂O₂, and the reaction was stopped with tap water. The relative molecular weights of

the bands detected were calculated with Quantity One® software (version 4.1.1, Bio-Rad, Segrate, Italy) related to the biotinylated SDS-PAGE standard (Low Range, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA).

Detection of FeLV antigen and FIV antibody. To evaluate the impact of immunosuppressive retroviruses, 76 of them were tested for FeLV antigen and for FIV antibody. Detection of FeLV antigen (p27) and FIV antibody was performed with a commercial assay kit (SNAP® FIV Antibody/FeLV Antigen Combo Test; IDEXX Laboratories, Westbrook, ME).

Statistical analysis. Chi square was used to test for associations, and McNemar's test to look at the agreement of the tests. Differences were considered significant if the *P* value was < 0.05. The program WinEpinfo 5.0 was used to test for agreement between tests.

RESULTS

ELISA. The seroprevalence by ELISA-prot A was 6.29%, and the seroprevalence by ELISA-IgG was 5.25%. There were also 13.03% and 6.56% of uncertain results for ELISA-prot A and ELISA-IgG, respectively. Levels of *Leishmania*-specific antibodies using prot A in positive cat sera ranged from 44.3 EU to 296.3 EU, with a mean of 79.5 EU (95% confidence interval [CI]: 59.1–99.9), and uncertain levels of *Leishmania*-specific antibodies ranged from 28.6 to 42.9 EU, with a mean of 34.4 EU (95% CI: 33.3–35.5). Levels of *Leishmania*-specific IgG antibodies in positive cat sera ranged from 53.5 to 213.7 EU, with a mean of 88.0 EU (95% CI: 67.4–108.6), and uncertain levels of anti-*Leishmania* IgG antibodies ranged from 36.3 to 52.0 EU, with a mean of 43.5 EU (95% CI: 41.4–45.6). There was an overall good agreement between tests (McNemar's test, *P* = 0.7389). There was not a statistical association between geographical origin, clinical status, age, or sex and positive results for *L. infantum* ELISA.

Immunoblot analysis. ELISA-positive cat sera, including the calibrator cat, recognized variable patterns of polypeptides with molecular masses ranging from 14 through 69 kDa, which included *L. infantum* specific antigen fractions (Figure 1). The highest sensitivity was found for bands of 69 (this value includes fractions of this and higher masses), 54, 34, 28, and 16 kDa (Table 1). Specificity of the bands was determined with those sera from areas where leishmaniasis is not endemic. Sera samples from areas where leishmaniasis is not endemic reacted with 1–5 polypeptides of *L. infantum* antigen, with the most frequent band being detected at 69 kDa (Table 1). No sera from cats living in areas where leishmaniasis is not endemic reacted with polypeptides of low molecular mass (< 26 kDa) that are considered to be the most specific in diagnosis of human and canine leishmaniasis (Figure 1).^{29,30}

Detection of FeLV antigen and FIV antibodies and relationship with *Leishmania* antibodies. FeLV antigens were detected in 7.8% of the cats (6 out of 76), and FIV-specific antibodies were found in 6.5% of the cats (5 out of 76). Both retroviruses were detected in 1.3% of the cats (1 out of 76). Only one cat that was positive to FeLV antigen was also positive to *L. infantum* serology, both by ELISA-prot A and ELISA-IgG. No cat presented FIV- and *L. infantum*-specific antibodies. Therefore, no association was found between FeLV antigens or FIV-specific antibodies and *L. infantum*-specific antibodies.

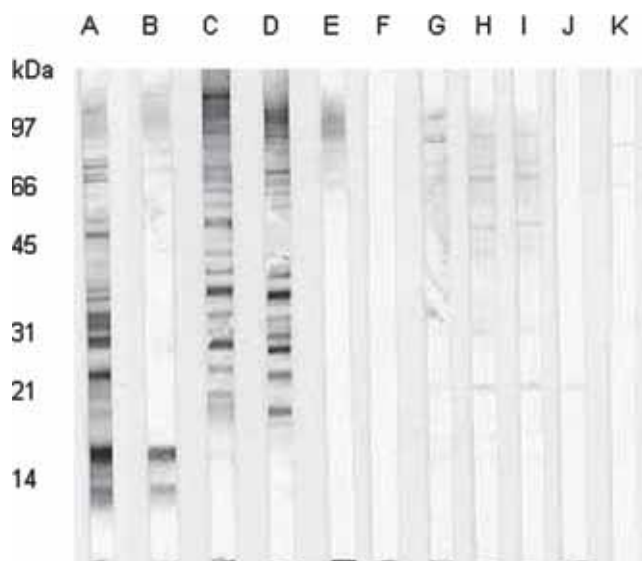


FIGURE 1. PAGE of ELISA-positive cat sera.

DISCUSSION

The main peridomestic reservoir for *L. infantum* in the ecoregions around the Mediterranean basin is the dog, with a seroprevalence ranging from 2% to 30%. In endemic focuses of leishmaniasis in the Northeastern Iberian Peninsula, the seroprevalence of CaL approaches 10%,³¹ and in the island of Mallorca it reaches 30%.² In contrast with the large studies performed in dogs, little information is available about the role of other mammals in the life cycle of *L. infantum*. Sporadic cases of feline leishmaniasis have been reported in the Southwestern Palearctic.^{8,11,12,17} The present study reports seroprevalences for cats living in ecoregions around the Northwestern Mediterranean basin of 6.29% and 5.25% when using ELISA-prot A and ELISA-IgG, respectively. Therefore, the result shows that *L. infantum*-specific antibodies are prevalent in cats from these ecoregions. The ELISA conditions required a 4-fold increase in serum and 3-fold increase in conjugate concentrations as compared with the ELISA routinely used in our laboratory to detect canine antibodies to *L. infantum*. Thus, the actual antibody levels detected in cats are putatively much lower than those observed in dogs. This finding is in agreement with those few clinical feline leishmaniasis cases reported in areas where the disease is endemic.

Data on seroprevalence for feline leishmaniasis are very disparate. In Italy, using indirect fluorescent antibody test, seroprevalence in Liguria and Tuscany was 0.9%,¹² but in Sicily it was 62%.²³ However, the cat populations studied were different: the first study was performed on clinically healthy cats, and the second was performed on FIV-positive cats. These different results obtained in the same biogeographical area could be related to the ELISA conditions used. The higher dilutions of sera and conjugate used in the former study, similar to those used for CaL, possibly prevented the detection of the low rate of antibodies present in feline infections.

WB has shown high sensitivity and specificity for the diagnosis of leishmaniasis in humans and dogs. The pattern of bands observed in ELISA-positive cats is in concordance with that observed in human visceral leishmaniasis and in CaL,

TABLE 1
Recognition of *L. infantum* antigens by sera of cats

Band (kDa)	Total (N = 69)		Endemic (N = 25)		Non-endemic (N = 44)	
	n	%	n	%	n	%
69	31	44.9	16	64.0	15	34.1
67	6	8.7	1	4.0	4	9.1
66	6	8.7	2	8.0	4	9.1
64	8	11.6	5	20.0	3	6.8
63	6	8.7	4	16.0	2	4.5
62	2	2.9	0	0.0	2	4.5
60	4	5.8	0	0.0	4	9.1
59	2	2.9	1	4.0	1	2.3
56	14	20.3	6	24.0	8	18.2
54	13	18.8	10	40.0	3	6.8
52	9	13.0	3	12.0	6	13.6
50	14	20.3	6	24.0	8	18.2
48	9	13.0	6	24.0	3	6.8
46	5	7.2	3	12.0	2	4.5
45	2	2.9	1	4.0	1	2.3
43	4	5.8	3	12.0	1	2.3
42	4	5.8	2	8.0	2	4.5
40	3	4.3	1	4.0	2	4.5
39	1	1.4	1	4.0	0	0.0
36	5	7.2	3	12.0	2	4.5
34	9	13.0	8	32.0	1	2.3
33	6	8.7	4	16.0	2	4.5
32	4	5.8	4	16.0	0	0.0
31	1	1.4	1	4.0	0	0.0
30	8	11.6	5	20.0	3	6.8
28	7	10.1	7	28.0	0	0.0
26	3	4.3	2	8.0	1	2.3
24	6	8.7	6	24.0	0	0.0
22	2	2.9	2	8.0	0	0.0
21	4	5.8	4	16.0	0	0.0
20	3	4.3	3	12.0	0	0.0
18	5	7.2	5	20.0	0	0.0
16	8	11.6	8	32.0	0	0.0
14	4	5.8	4	16.0	0	0.0
Mean number of bands	3.17		5.52		1.84	

with no sera collected from cats living in areas where leishmaniasis is not endemic reacting with low molecular weight polypeptides, which are considered the most specific,^{29,30} thus confirming ELISA results. The significance of bands of high molecular mass, in particular that of 69 kDa, is not clear as it appears both in cats from areas where leishmaniasis is endemic and also in those from areas where it is not endemic; however, this same finding has been described for dogs and humans.²⁹ One possible explanation could be the presence of cross-reactive antibodies to heat shock protein 70 family in the sera of some cats living in areas where leishmaniasis is not endemic, the occurrence of which has been described in a wide variety of medical problems.

The rate of infection among dogs living in an area of leishmaniasis endemicity is considerably higher than previously described in seroepidemiological studies,³² as serology is often not sensitive enough to detect every infection. Other approaches used to determine the rate of infection, such as molecular techniques³³ or cellular immunity tests,^{34,35} resulted in higher rates of prevalence than conventional serological studies. In this manuscript, we studied *Leishmania* exposure in cats only by means of serology, so it is possible that we have underestimated the actual rate of infection. Therefore, further broad surveys using other techniques, such as polymer-

ase chain reaction and cellular immunity tests, should be performed in cats to better estimate *Leishmania* infection and/or exposure.

Whether the low prevalence of infection or disease in cats from areas where leishmaniasis is endemic may be due to underreporting or to the fact that cats have a high degree of natural resistance to *L. infantum* is unknown. On the one hand, the most common manifestation of feline leishmaniasis is not the severe visceral form but the cutaneous one, with cats showing low levels of specific antibodies. On the other hand, naturally infected cats do not recover without specific antileishmanial therapy;¹⁸ furthermore, co-infection with immunosuppressive retroviruses leads to parasite dissemination and visceralization. These findings are in concert with the situation that occurs in humans,³⁶ and also in other mammals such as horses,³⁷ or in the subgroup of resistant dogs living in areas where leishmaniasis is endemic.³⁵ Thus, our hypothesis is that the immune response in cats, mainly cellular immunity, is effective enough to control the infection and confer a certain degree of natural resistance, if there are not immunosuppressive events.

Viral, bacterial, rickettsial, fungal, and protozoan opportunistic infections have been associated with retroviral infections in cats because of the immunosuppressive stage that both FeLV and FIV can induce. The prevalence of infection for FeLV and FIV in the present study was comparable to that observed in other studies in the same ecozone, but no association between these retroviruses and *Leishmania*-specific antibodies was found. Because the infection rate was so low, and the numbers of positive FeLV and FIV cats were so small, any association between leishmaniasis and FeLV or FIV—if it exists—will be very difficult to find. In the study on FIV-positive cats in Sicily, associated seroreactivity to *Leishmania* was much higher (62%) than our results,²³ suggesting that in areas where the disease is endemic there may be retroviral infections in the origin of opportunistic infections like leishmaniasis, as is the case for HIV-infected human patients.³⁶ However, future studies should investigate in greater depth the possible association between *Leishmania*, FeLV, and FIV infections.

Transmission of feline leishmaniasis is presumed to be sand fly-related. Trophotaxis in sand flies depends on the species involved, and sand flies can also behave with a marked lack of host preference.³⁸ *Lutzomyia* spp. sand flies, vectors of leishmaniasis in the Neotropic ecozone, have been reported feeding on cats in Peru.³⁹ Studies performed in the Iberian Peninsula on host-feeding patterns of *Phlebotomus perniciosus*, one of the main vectors of *L. infantum* in the Palearctic ecoregions of the Mediterranean biome, identified cat blood meals in all locations studied.⁴⁰ Consequently, the possibility of sand flies feeding on domestic cats is real. However, to resolve the issue of transmission it should be studied by means such as xenodiagnosis, evaluating the infectiousness of cats to phlebotomine vectors feeding on them.

The present study is by far the largest seroepidemiological survey on feline leishmaniasis to date. On the basis of the results of this and other studies,^{10–18} leishmaniasis must be included in the differential diagnosis of dermatoses or systemic disease in cats living in biogeographical areas of leishmaniasis endemicity. From an epidemiologic point of view, environmental changes, growing demographics, and human and animal mobility are contributing factors to the modifica-

tion of the biogeographical distribution and also to the incorporation of new hosts. These changing features confirm leishmaniasis as reemerging zoonoses.⁴¹ In this setting, the role of the cat as a peridomestic reservoir for *L. infantum* remains controversial and warrants further research, but, according to the reported prevalence and other evidence,^{39,40} it could be hypothesized that cats are a secondary reservoir host rather than simply an incidental one, as has been suggested.⁴²

Received March 29, 2006. Accepted for publication October 21, 2006.

Acknowledgment: This work was supported in part by grant BIO2004-03893 from the Spanish Government to Jordi Alberola.

Authors' addresses: Laia Solano-Gallego, Alhelí Rodríguez-Coertés, Josefina Quintana, and Jordi Alberola, Departament de Farmacologia, Terapèutica i Toxicologia, Facultat de Veterinària, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Barcelona, Spain, Telephone: +34 935811532, Fax: +34 935812059, E-mail: Jordi.Alberola@uab.es. Laura Iniesta and Montserrat Portús, Laboratori de Parasitologia, Departament de Microbiologia i Parasitologia Sanitària, Universitat de Barcelona, 08028 Barcelona, Spain, Telephone: +34 934024497, Fax: +34 934024498, E-mail: mportus@ub.edu. Joseph Pastor and Yvonne Espada, Departament de Medicina i Cirurgia Animals, Facultat de Veterinària, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra (Barcelona), Spain, Telephone: +34 935811091, Fax: +34 935812006, E-mail: d.med.cirurgia.animal@uab.es.

Reprint requests: Jordi Alberola, Departament de Farmacologia, Terapèutica i Toxicologia, Facultat de Veterinària, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Barcelona, Spain, Telephone: +34 935811532, Fax: +34 935812059, E-mail: Jordi.Alberola@uab.es.

REFERENCES

1. World Health Organization, 2002. Annex 3: Burden of Disease in DALYs by Cause, Sex and Mortality Stratum in WHO Regions, Estimates for 2001. *The World Health Report*. Geneva: WHO, 192–197.
2. Solano-Gallego L, Morell P, Arboix M, Alberola J, Ferrer L, 2001. 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* 39: 560–563.
3. Bongiorno G, Habluetzel A, Khoury C, Maroli M, 2003. Host preferences of phlebotomine sand flies at a hypoendemic focus of canine leishmaniasis in central Italy. *Acta Trop* 88: 109–116.
4. Gramiccia M, Maazoun R, Lanotte G, Rioux JA, Leblanco S, Evans DA, Peters W, Bettini S, Gradoni L, Pozio E, 1982. Enzymatic typing of 11 isolates of *Leishmania* collected from visceral infections in rodents, dogs and foxes on the Italian mainland: demonstration of an enzyme variant in the parasite of the fox (*Vulpes vulpes*) and dog. *Ann Parasitol Hum Comp* 57: 527–531.
5. Abranches P, Silva FMC, Ribeiro MMS, Lopes FJ, Gomes LT, 1983. Kala-Azar in Portugal. 4. The wild reservoir—the Isolation of a *Leishmania* from a fox. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 77: 420–421.
6. González-Castro J, Morillas-Márquez F, Benavides-Delgado I, 1987. *Leishmania infantum* s. str., parasite du rat noir (*Rattus rattus*). A propos du typage enzymatique d'une souche isolée en Espagne, dans la province de Grenade. *Ann Parasitol Hum Comp* 62: 101.
7. Koehler K, Stechele M, Hetzel U, Domingo M, Schonian G, Zahner H, Burkhardt E, 2002. Cutaneous leishmaniasis in a horse in southern Germany caused by *Leishmania infantum*. *Vet Parasitol* 109: 9–17.
8. Ozon C, Marty P, Pratlong F, Breton C, Blein M, Lelievre A, Haas P, 1998. Disseminated feline leishmaniasis due to *Leishmania infantum* in southern France. *Vet Parasitol* 75: 273–277.
9. Sergent E, Sergent E, Lombard J, Quilichini M, 1912. La leishmaniose à Alger. Infection simultanée d'un enfant, d'un chien et d'un chat dans la même habitation. *Bull Soc Pathol Exot* 5: 93–98.

10. Dunan S, Mary C, Garbe L, Breton Y, Olivon B, Ferrey P, Cabasus JP, 1989. A propos d'un cas de leishmaniose chez un chat de la région marseillaise. *Bull Soc Française Parasitol* 7: 17–20.
11. Hervas J, Chacon-M De Lara F, Sanchez-Isarria MA, Pellicer S, Carrasco L, Castillo JA, Gomez-Villamandos JC, 1999. Two cases of feline visceral and cutaneous leishmaniosis in Spain. *J Feline Med Surg* 1: 101–105.
12. Poli A, Abramo F, Barsotti P, Leva S, Gramiccia M, Ludovisi A, Mancianti F, 2002. Feline leishmaniosis due to *Leishmania infantum* in Italy. *Vet Parasitol* 106: 181–191.
13. Pennisi MG, Venza M, Reale S, Vitale F, Lo Giudice S, 2004. Case report of leishmaniosis in four cats. *Vet Res Commun* 28(Suppl 1): 363–366.
14. Rufenacht S, Sager H, Muller N, Schaerer V, Heier A, Welle MM, Roosje PJ, 2005. Two cases of feline leishmaniosis in Switzerland. *Vet Rec* 156: 542–545.
15. Denuzière C, 1977. Un chat leishmanien. *Sem Vet* 32: 1–2.
16. Laurelle Magalon C, Toga I, 1996. Un cas de leishmaniose féline. *Pract Med Chir Animal Comp* 31: 261–266.
17. Hervas J, de Lara FCM, Lopez J, Gomez-Villamandos JC, Guerrero MJ, Moreno A, 2001. Granulomatous (pseudotumoral) iridocyclitis associated with leishmaniosis in a cat. *Vet Rec* 149: 624–625.
18. Leiva M, Lloret A, Pena T, Roura X, 2005. Therapy of ocular and visceral leishmaniosis in a cat. *Vet Ophthalmol* 8: 71–75.
19. Kirkpatrick CE, Farrell JP, Goldschmidt MH, 1984. Leishmania chagasi and *L. donovani*: experimental infections in domestic cats. *Exp Parasitol* 58: 125–131.
20. Mancianti F, 2004. Feline leishmaniosis: what's the epidemiological role of the cat? *Parasitologia* 46: 203–206.
21. Bez M, 1992. La Leishmaniose chez le Chat. Enquete Seroepidemiologique dans les Alpes-Maritimes. Doctoral thesis. Lyon: Ecole Nationale Veterinaire de Lyon.
22. Marechal M, 1993. La Leishmaniose Feline: Cas Sporadique ou Réalité Ignorée? (Étude dans la Région Marseillaise). Doctoral thesis. Lyon: Ecole Nationale Veterinaire de Lyon.
23. Pennisi MG, Masucci M, Catarsini O, 1998. Presenza d'anticorpi anti-Leishmania in gatti FIV che vivono in zona endemica. *Atti Soc Ital Sci Vet* 52: 265–266.
24. Ozon C, Marty P, Lelievre A, Biorgalli J, Corniglion A, Giacomo A, Lamothe J, 1999. Le chat reservoir de *Leishmania infantum* dans le sud de la France? *Proceedings of the 24th WSAVA Congress*. Lyon.
25. Pennisi MG, Maxia L, Vitale F, Massucci M, Borruto G, Caraccappa S, 2000. Studio dell'infezione de *Leishmania* mediante PCR in gatti che vivono in zona endemica. *Atti Soc Ital Sci Vet* 54: 215–216.
26. Portús M, Gállego M, Riera C, Aisa MJ, Fisa R, Castillejo S, 2002. 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* 62: 72–76.
27. Vita S, Santori D, Aguzzi I, Petrotta E, Luciani A, 2005. Feline leishmaniosis and ehrlichiosis: serological investigation in Abruzzo region. *Vet Res Commun* 29(Suppl 2): 319–321.
28. Riera C, Valladares JE, Gallego M, Aisa MJ, Castillejo S, Fisa R, Ribas N, Carrio J, Alberola J, Arboix M, 1999. Serological and parasitological follow-up in dogs experimentally infected with *Leishmania infantum* and treated with meglumine antimoniate. *Vet Parasitol* 84: 33–47.
29. Aisa MJ, Castillejo S, Gallego M, Fisa R, Riera MC, De Colmenares M, Torras S, Roura X, Sentis J, Portus M, 1998. Diagnostic potential of Western blot analysis of sera from dogs with leishmaniosis in endemic areas and significance of the pattern. *Am J Trop Med Hyg* 58: 154–159.
30. Mary C, Lamouroux D, Dunan S, Quilici M, 1992. Western-Blot analysis of antibodies to *Leishmania infantum* antigens: potential of the 14-kD and 16-kD antigens for diagnosis and epidemiologic purposes. *Am J Trop Med Hyg* 47: 764–771.
31. Fisa R, Gállego M, Castillejo S, Aisa MJ, Serra T, Riera C, Carrio J, Gallego J, Portus M, 1999. Epidemiology of canine leishmaniosis in Catalonia (Spain): the example of the Priorat focus. *Vet Parasitol* 83: 87–97.
32. Ben Said M, Jaïem A, Smoorenburg M, Semiao-Santos SJ, Ben Rachid MS, el Harith A, 1992. Canine leishmaniosis in the region of Enfidha (Central Tunisia). Assessment of seroprevalence with direct agglutination (DAT) and indirect immunofluorescence (IFAT). *Bull Soc Pathol Exot* 85: 159–163.
33. Berrahal F, Mary C, Roze M, Berenger A, Escoffier K, Lamouroux D, Dunan S, 1996. Canine leishmaniosis: identification of asymptomatic carriers by polymerase chain reaction and immunoblotting. *Am J Trop Med Hyg* 55: 273–277.
34. Solano-Gallego L, Llull J, Ramos G, Riera C, Arboix M, Alberola J, Ferrer L, 2000. The Ibizian hound presents a predominantly cellular immune response against natural *Leishmania* infection. *Vet Parasitol* 90: 37–45.
35. Cabral M, O'Grady JE, Gomes S, Sousa JC, Thompson H, Alexander J, 1998. The immunology of canine leishmaniosis: strong evidence for a developing disease spectrum from asymptomatic dogs. *Vet Parasitol* 76: 173–180.
36. Alvar J, Canavate C, Gutierrez Solar B, Jimenez M, Laguna F, Lopez Velez R, Molina R, Moreno J, 1997. *Leishmania* and human immunodeficiency virus coinfection: the first 10 years. *Clin Microbiol Rev* 10: 298–319.
37. Fernandez-Bellon H, Solano-Gallego L, Bardagi M, Alberola J, Ramis A, Ferrer L, 2005. Immune response to *Leishmania infantum* in healthy horses in Spain. *Vet Parasitol* 135: 181–185.
38. Guy MW, Killickendrick R, Gill GS, Rioux JA, Bray RS, 1984. Ecology of Leishmaniosis in the south of France. 19. Determination of the hosts of *Phlebotomus ariasi* Tonnoir, 1921 in Cevennes by bloodmeal analyses. *Ann Parasitol Hum Comp* 59: 449–458.
39. Ogusuku E, Perez JE, Paz L, Nieto E, Monje J, Guerra H, 1994. Identification of bloodmeal sources of *Lutzomyia* spp. in Peru. *Ann Trop Med Parasitol* 88: 329–335.
40. De Colmenares M, Portús M, Botet J, Dobano C, Gállego M, Wolff M, Seguí G, 1995. Identification of blood meals of *Phlebotomus perniciosus* (Diptera: Psychodidae) in Spain by a competitive enzyme-linked immunosorbent assay, biotin/avidin method. *J Med Entomol* 32: 229–233.
41. Ashford RW, 2000. The leishmaniases as emerging and reemerging zoonoses. *Int J Parasitol* 30: 1269–1281.
42. Gramiccia M, Gradoni L, 2005. The current status of zoonotic leishmaniases and approaches to disease control. *Int J Parasitol* 35: 1169–1180.

DISCUSIÓN

1. UTILIDAD DIAGNÓSTICA Y PRONÓSTICA DE LA RESPUESTA INMUNE FRENTE A LEISHMANIA EN EL PERRO

La respuesta inmune juega un papel fundamental en la defensa del hospedador frente a *Leishmania*. En modelos murinos experimentales y en pacientes humanos y caninos, se ha observado que la eliminación de este parásito requiere el desarrollo de una inmunidad mediada por células ya que los anticuerpos específicos no resuelven la infección por microorganismos intracelulares (Carvalho *et al.*, 1989, Abranches *et al.*, 1991a, Locksley y Louis, 1992, Pinelli *et al.*, 1994, Akuffo *et al.*, 1996, Carrera *et al.*, 1996, Cabral *et al.*, 1998, Miles *et al.*, 2005).

Existen varias células implicadas en la defensa contra *Leishmania*, de entre las cuales, las células T *helper* son las más relevantes. Varios trabajos intentan asociar la respuesta de estas células T *helper* con las diferentes fases de la infección. Se han estudiado citoquinas y clases y subclases de inmunoglobulinas y su asociación con el perfil clínico de diferentes poblaciones murinas, humanas y caninas para intentar entender los mecanismos que controlan la persistencia y la multiplicación del parásito en el interior de los hospedadores.

En ratones infectados con *L. major* se ha encontrado una respuesta polarizada Th1/Th2 (Reed y Scott, 1993, Reiner y Locksley, 1995). En estos animales la progresión de la enfermedad se asocia claramente a un predominio Th2, con la secreción propia de IL-4, IL-10 e IgG1, y la resistencia a Th1 caracterizada por una secreción de IFN- γ e IgG2 (Bretscher *et al.*, 1992, Afrin y Ali, 1997, Afrin y Ali, 1998).

En humanos se ha observado una relación inversa entre la respuesta celular y la evolución de la enfermedad (Carvalho *et al.*, 1985, Ellassad *et al.*, 1994, Ulrich *et al.*, 1995, Sundar *et al.*, 1997, Atta *et al.*, 1998, Anam *et al.*, 1999a, Anam *et al.*, 1999b), aunque la polarización Th1/Th2 no está clara (Anam *et al.*, 1999b, Mary *et al.*, 1999) al igual que en ratones infectados con *L. infantum* (Kaye *et al.*, 1991, Miralles *et al.*, 1994, Honoré *et al.*, 1998) y en perros (Cabral *et al.*, 1998). En estos casos se aboga por una respuesta mixta, una combinación de ambos clones, Th1 y Th2, con un amplio espectro de respuestas (Abranches *et al.*, 1991a, Cabral *et al.*, 1992, Pinelli *et al.*, 1994, Carrera *et al.*, 1996, Cabral *et al.*, 1998).

La utilidad diagnóstica que pueda tener esta respuesta inmune en el perro y su capacidad para detectar distintas formas y fases de la infección ha sido el objetivo global de este trabajo.

La aplicación de diferentes técnicas inmunológicas (ELISA, *western blot*, IFI, intradermorreacción y linfoestimulación) junto con el estudio de las inmunoglobulinas específicas tipo IgG, IgG1, IgG2 e IgE en busca de marcadores de evolución, realizado en el transcurso de este trabajo, permite observar que:

La mayoría de los perros estudiados muestran una mezcla de respuesta inmune celular y humoral.

Se considera que la inmunidad mediada por células es el mecanismo de defensa primario contra la infección por *Leishmania*. Para poner de manifiesto esta respuesta celular específica se aplican técnicas como el test de Montenegro o la linfoestimulación, aunque este último método se considera poco útil para trabajos de campo dado que requiere una infraestructura sofisticada. En cambio el test de Montenegro o intradermorreacción es mucho más útil en estudios epidemiológicos por lo que es la técnica que hemos aplicado fundamentalmente en la elaboración de esta tesis.

En humanos, una respuesta celular positiva se asocia a infecciones pasadas y curadas (Pampiglione *et al.*, 1975, Sacks *et al.*, 1987), a pesar de que se han observado casos de individuos no expuestos a *Leishmania* que han desarrollado una respuesta linfoproliferativa positiva a este antígeno (Kemp *et al.*, 1992).

En perros, la respuesta positiva al antígeno de *Leishmania* detectada mediante intradermorreacción y/o linfoestimulación se ha asociado a infecciones asintomáticas y, al contrario, esta respuesta celular positiva no se muestra en los animales con leishmaniosis canina activa (Pinelli *et al.*, 1994, Cardoso *et al.*, 1998, Rhalem *et al.*, 1999). En consecuencia, se apuesta por una dicotomía en la respuesta inmune de las infecciones caninas.

Al analizar los resultados extraídos de las diferentes poblaciones de perros estudiadas en este trabajo, se observa que algunos perros asintomáticos cursan con una respuesta DTH positiva y sin expresión significativa de anticuerpos. También se han encontrado varios casos de animales sintomáticos que cursan con una elevada respuesta humoral a la vez que una intradermorreacción y/o linfoestimulación positiva y animales infectados asintomáticos que expresan niveles de IgG2 por encima del *cut-off* de positividad

(Iniesta *et al.*, 2002). Estos resultados demuestran que no existe tal dicotomía humoral/celular en la respuesta inmunitaria relacionada con la infección sintomática o asintomática de los perros, sino que la mayoría de los animales presentan una mezcla de respuesta inmune celular y humoral. Nuestros resultados corroboran que, al igual que ocurre en la leishmaniosis humana (Badaró *et al.*, 1986), la leishmaniosis canina cursa con un abanico de manifestaciones clínicas que abarcan desde las formas polisintomáticas a los casos asintomáticos.

Respuesta humoral

La leishmaniosis visceral es una enfermedad que cursa con una elevada producción de anticuerpos (Abranches *et al.*, 1991a). Al tratarse de una infección parasitaria crónica, los anticuerpos mayoritarios y, en consecuencia, los más estudiados, son las inmunoglobulinas tipo G. Sin embargo, la interpretación de la presencia de estas inmunoglobulinas es compleja y su papel en pacientes con kala-azar aún no está esclarecido. Las IgG fracasan en el mantenimiento de la protección frente a patógenos intracelulares y, además, contribuyen a la progresión de la enfermedad que tiene mayoritariamente una base inmune. En ratones se ha observado que la administración pasiva de IgG anti-*Leishmania* aumenta la lesión cutánea (Miles *et al.*, 2005).

Los diferentes isotipos y subclases de inmunoglobulinas específicas segregadas por las células B en interacción con las células T y con las citoquinas secretadas por éstas se han relacionado, en modelos murinos, con la dicotomía Th1/Th2. Se ha observado que el clon Th1 es inductor de la producción de IgG2 e IgG3, mientras que el Th2 lo es de IgA, IgE, IgG1 e IgG4 (Coffman *et al.*, 1987, Snapper y Paul 1987, Yanagihara *et al.*, 1995, Abbas *et al.*, 1996, Afrin y Ali, 1997, Atta *et al.*, 1998).

En perros, la producción de inmunoglobulinas varía en función de varios factores como son la forma clínica de la enfermedad, la cantidad de parásitos y la cronicidad de la infección (Pinelli *et al.*, 1994, Carrera *et al.*, 1996, Reis *et al.*, 2006).

En todos los grupos de perros de zonas endémicas analizados en este trabajo se han detectado, en mayor o menor medida, anticuerpos específicos anti-*Leishmania*. Como era de esperar y como se ha observado con anterioridad (Deplazes *et al.*, 1995, Bourdoiseau *et al.*, 1997, Cavaliero *et al.*, 1999), la producción de anticuerpos específicos es mayor en los animales sintomáticos que en los asintomáticos, aunque el

hecho de encontrar estas IgG no es sinónimo de enfermedad manifiesta. Además, la ausencia de estos anticuerpos tampoco indica ausencia de infección como demuestra la existencia de animales seronegativos con pruebas de cultivo y/o PCR positivas (Iniesta *et al.*, 2002).

La respuesta de anticuerpos en la infección por *Leishmania* en el perro es fundamentalmente de tipo IgG2 y su expresión está directamente relacionada con la presencia de desórdenes patofisiológicos.

En cuanto a las subclases de inmunoglobulinas tipo G, varios estudios llevados a cabo con animales en distintas situaciones clínicas (asintomáticos, enfermos, sometidos o no a tratamiento) describen sus niveles, aunque se han obtenido resultados no concordantes entre sí. Una de las causas de esta falta de concordancia puede ser el material utilizado, dado que los estudios realizados con el mismo antisuero comercial concluyen que la respuesta inmunológica humoral mayoritaria es de tipo IgG2 (Bourdoiseau *et al.*, 1997, Boceta *et al.*, 2000, Leandro *et al.*, 2001), mientras que otros que utilizan anticuerpos monoclonales encuentran asociación entre la leishmaniosis canina y la sobre-expresión de IgG1, IgG3 e IgG4 (Quinell *et al.*, 2003). Esta diferencia en el protocolo de actuación sumada al pequeño número de animales estudiados en algunos de estos trabajos y las diferentes técnicas aplicadas puede explicar la falta de coherencia entre resultados.

Los resultados sobre la expresión de anticuerpos de este trabajo no se basan en medidas absolutas de densidad óptica, sino que están cuantificados en unidades referidas a los valores, arbitrariamente situados en 100 U, obtenidos del suero de un perro experimentalmente infectado, eutanasiado en la fase aguda de la enfermedad y considerado calibrador. El hecho de que se trate de valores relativos, sumado a otros factores como son la diferente afinidad del conjugado, la concentración utilizada de dicho conjugado, la presencia de otras inmunoglobulinas que puedan unirse al antígeno de la placa, entre otras, dificultan la comparación cuantitativa de las diversas inmunoglobulinas, ya que en ningún caso se trata de niveles absolutos. Esta dificultad, ya de por sí importante para la discusión de resultados de un mismo trabajo, lo es aún mayor cuando se trata de relacionar valores obtenidos por autores distintos.

La utilización de un suero calibrador para la cuantificación de los niveles de inmunoglobulina en ELISA *versus* la utilización de valores de densidad óptica presenta la ventaja de obviar los sesgos o variaciones producidas en la reacción enzimática, ajenos a la reacción inmune. Sin embargo, presenta el inconveniente de no detectar la intensidad de la reacción global. De esta manera, los resultados de densidad óptica obtenidos mediante la técnica de ELISA para las inmunoglobulinas específicas de tipo IgG1 e IgE son mucho menores que para las IgG2. Estos mayores valores de IgG2, sumados al hecho de que los resultados de IgG anti-*Leishmania* son paralelos a los de IgG2 ($r = 0,948$, $p < 0,001$), hace pensar que la mayoría de los anticuerpos específicos expresados por los perros analizados en este trabajo son de tipo IgG2 (Solano-Gallego *et al.*, 2001b).

Este nivel de IgG2 específicas es mayor en perros infectados sintomáticos que en asintomáticos (t de Student, $p = 0,000$), éste mayor que en perros de zona endémica con pruebas parasitológicas negativas (t de Student, $p = 0,001$) y éste a su vez más elevado que en el grupo de perros de zona no endémica (t de Student, $p = 0,001$) (Iniesta *et al.*, 2005). Esta baja tasa de IgG2 encontrada en perros de zona endémica considerados no infectados puede reflejar la memoria inmunológica de pasadas infecciones o la fase inicial de infecciones recientes que aún no se detectan mediante las técnicas parasitológicas.

Existen trabajos que asocian la tasa de IgG2 con una respuesta inmune Th1 ligada a infecciones asintomáticas (Deplazes *et al.*, 1995). Sin embargo, en nuestro estudio observamos que estas IgG2 específicas anti-*Leishmania*, no sólo están expresadas por todos los animales infectados (tanto asintomáticos como sintomáticos), sino que están directamente relacionadas con la presencia de desórdenes patofisiológicos detectados durante los exámenes físicos y analíticos de los perros (Iniesta *et al.*, 2002, Iniesta *et al.*, 2005), lo que rechaza la idea anterior de que las IgG2 son marcadoras de infección asintomática.

En el caso de los animales sintomáticos a los que se les aplica tratamiento farmacológico específico, aquellos que respondieron de manera positiva a dicho tratamiento, tanto los natural como los experimentalmente infectados, mostraron un descenso significativo en todas las inmunoglobulinas. Concretamente, el nivel de IgG2 en animales que responden al tratamiento desciende notablemente (t de Student, $p <$

0,001) mientras que en los que no responden el descenso es menos marcado (t de Student, $p = 0,053$) (Solano-Gallego *et al.*, 2001b).

La expresión de IgG1 e IgE específicas únicamente se detecta en animales que desarrollan la enfermedad lo que señala su potencial papel como marcadoras de leishmaniosis canina activa.

Al contrario de lo que ocurre con las IgG2, cuya expresión guarda relación directa con la sintomatología, la tasa de IgG1 es muy variada y, además, no guarda relación con la de IgG totales detectada ($r = 0,008$, $p = 0,934$) (Solano-Gallego *et al.*, 2001b). En los casos de perros asintomáticos con tasas de IgG e IgG2 bajas, el nivel de IgG1 es variable, mientras que para animales asintomáticos con elevados niveles de IgG e IgG2 las IgG1 siempre resultan bajas. Estos animales asintomáticos permanecen con tasas bajas de IgG1 durante su seguimiento a lo largo de varios años, incluso cuando las IgG y las IgG2 aumentan significativamente (Solano-Gallego *et al.*, 2001b).

Estas IgG1 específicas, junto con las IgE, únicamente se detectan en animales que desarrollan síntomas de la enfermedad. Al calcular el valor medio de ELISA para cada inmunoglobulina en los diferentes grupos de animales analizados, se observa que la expresión de ambas en perros infectados sintomáticos es significativamente mayor que en infectados asintomáticos (t de Student, $p = 0,002$ para las IgG1 y $p = 0,000$ para las IgE), mientras que los valores de IgG1 e IgE son similares entre los animales infectados asintomáticos y los no infectados de zona endémica (t de Student, $p = 0,079$ para IgG1 y $p = 0,718$ para IgE) (Iniesta *et al.*, 2005).

Por tanto, esta elevada expresión de IgG1 específicas anti-*Leishmania* se asocia con la enfermedad al igual que se había observado anteriormente (Deplazes *et al.*, 1995, Bourdoiseau *et al.*, 1997, Quinnell *et al.*, 2003).

Por su parte, las IgE se han asociado tradicionalmente a enfermedades atópicas como la hipersensibilidad a alérgenos ambientales (Halliwell y DeBoer, 2001, Foster *et al.*, 2003) y a enfermedades helmínticas (Snowden y Hammerberg, 1987, Gasser *et al.*, 1993). Últimamente también se ha relacionado la expresión de IgE con el kala-azar humano en el que se detecta una elevada expresión de IgG1 e IgE durante las fases activas de la enfermedad (Elassad *et al.*, 1994, Atta *et al.*, 1998, Anam *et al.*, 1999b). Esta observación concuerda con los resultados obtenidos en los perros analizados en

este trabajo los cuales muestran una sobre-expresión de IgG1 e IgE durante la leishmaniosis activa, lo que permiten señalar a ambas inmunoglobulinas como marcadoras de leishmaniosis canina activa.

El número de fracciones polipeptídicas del antígeno de *Leishmania* reconocidas por las IgG1 y las IgG2 es similar y disminuye de forma paralela a los valores relativos de ambas inmunoglobulinas detectadas mediante ELISA.

En cuanto a los idiotipos de estas inmunoglobulinas, estudios anteriores realizados en humanos infectados con *L. donovani* observan que el subtipo que reacciona con un mayor número de polipéptidos es la IgG1 (Ravindran *et al.*, 2004). Por el contrario, en el caso de los perros, existe un mayor número de polipéptidos del antígeno de *Leishmania* reconocidos por el subtipo IgG2 que por el IgG1 (Nieto *et al.*, 1999, Vercammen *et al.*, 2002, Fernández-Pérez *et al.*, 2003). Quizá el reducido número de animales que conforman la muestra de algunos de estos estudios o la diferente sensibilidad de las técnicas debido a las concentraciones de suero y conjugado utilizadas puedan explicar la falta de similitud entre dichos resultados y los encontrados en nuestro estudio. En este trabajo se observa que el número de fracciones polipeptídicas del antígeno de *Leishmania* reconocidas en el inmunoblot por IgG1 e IgG2 es similar y disminuye de forma paralela a los valores relativos de ambas inmunoglobulinas detectadas mediante ELISA, siendo la correlación entre los valores de ELISA (U) y el número de bandas detectadas mediante el *western blot* mayor para las IgG2 que para las IgG1 ($r = 0,605$ para IgG2 y $r = 0,378$ para IgG1). La diferencia entre los patrones de fracciones polipeptídicas revelados por una y otra inmunoglobulina, tanto para los animales asintomáticos como para los sintomáticos, estriba en la intensidad de las bandas reveladas por cada subclase pero no en la variedad ni el número de fracciones antigénicas reconocidas (Iniesta *et al.*, 2007).

Los antígenos pertenecientes a la familia AG24 (Couvreur *et al.*, 1997) (31 y 24 kDa para IgG1 y 24 y 21 kDa para IgG2) previamente descritos por su elevada inmunogenicidad y sensibilidad para el diagnóstico (Le Ray *et al.*, 1975) son los que están más relacionados con la sintomatología, por lo que son considerados marcadores de leishmaniosis canina activa (Iniesta *et al.*, 2007).

Bajos niveles de IgG1 post-tratamiento en animales con elevados niveles de IgG1 previos al tratamiento son un indicador de buen pronóstico.

Al comparar la expresión de IgG1 en respuesta al tratamiento específico se observa que, en los animales que responden positivamente al tratamiento, el nivel de IgG1 desciende de manera brusca (t de Student, $p < 0,01$), mientras que el descenso mostrado en los animales que no responden es menos marcado ($p = 0,112$) (Solano-Gallego *et al.*, 2001b), de manera similar a lo que ocurre en casos descritos con anterioridad (Deplazes *et al.*, 1995). Además, el nivel de IgG1 en el momento del diagnóstico fue significativamente mayor en los que respondieron ($X \pm DE = 94 \text{ U} \pm 89$) que en los que no respondieron ($X \pm DE = 35 \text{ U} \pm 25$) ($p = 0,02$). Por todo ello, se considera que bajos niveles de IgG1 post-tratamiento son indicadores de buen pronóstico, siempre y cuando los niveles de IgG1 previos al tratamiento sean elevados (Solano-Gallego *et al.*, 2001b).

El daño glomerular presente en perros polisintomáticos puede manifestarse mediante la eliminación de anticuerpos por la orina.

Entre el amplio abanico de manifestaciones clínicas con las que cursa la leishmaniosis canina activa, la mayor complicación y la principal causa de muerte en los animales infectados es la afectación renal (Benderitter *et al.*, 1988, Poli *et al.*, 1991), la cual es debida mayoritariamente a la deposición de inmunocomplejos que provocan lesiones glomerulares (Tafari *et al.*, 1989). Este daño glomerular puede manifestarse mediante la eliminación de anticuerpos por la orina, hecho que se ha demostrado anteriormente en pacientes humanos con leishmaniosis visceral (Kohanteb *et al.*, 1987) y en hamsters experimentalmente infectados con *L. donovani* (Sartori *et al.*, 1987). El análisis mediante ELISA (proteína A e IgG2) de 95 orinas pertenecientes a 30 perros con leishmaniosis confirmada, 20 con otras patologías y 45 animales de los que se carece de información, demuestra la presencia de inmunoglobulinas específicas anti-*Leishmania*, mayoritariamente de tipo IgG2, en la orina de 35 de los perros analizados (Solano-Gallego *et al.*, 2003b).

La presencia de anticuerpos anti-*Leishmania* en orina es debida mayoritariamente a un fallo en la filtración glomerular y, en menor medida, a una producción local.

Para determinar si la presencia de estos anticuerpos específicos encontrados en las muestras de orina es debida a un fallo en la filtración glomerular o a una producción local en el tracto urinario, se analizó el coeficiente de anticuerpos urinarios (C) y el patrón de fracciones proteicas del antígeno de *L. infantum* reveladas para cada pareja orina-suero de los perros positivos mediante ELISA. Para todos los animales, el título de IgG específicas en las muestras de orina fue mucho menor que en las del suero correspondiente.

Los polipéptidos más frecuentemente revelados por ambas muestras fueron los de 14, 16, 20, 30, 31, 48 y 69 kDa. Las orinas con resultados negativos mediante ELISA no revelaron ninguna fracción polipeptídica del antígeno de *L. infantum*.

Al comparar los patrones de ambas muestras del mismo animal encontramos que, en general, el número y la intensidad de las bandas reveladas por los anticuerpos presentes en el suero es mayor que las reveladas por los anticuerpos presentes en la orina. Sin embargo, se observaron ligeras diferencias entre los patrones revelados. En algunos casos los anticuerpos de la orina revelaron fracciones polipeptídicas no observadas para el correspondiente suero y en otros casos algunas bandas reveladas por los anticuerpos de la orina mostraron una mayor intensidad que las del suero homólogo, lo que indica una producción local.

Por tanto, los resultados obtenidos sugieren que la presencia de anticuerpos anti-*Leishmania* en la orina de los perros está causada mayoritariamente por un fallo en la filtración glomerular y, en menor medida por una producción local (Solano-Gallego *et al.*, 2003b).

2. DIAGNÓSTICO DE LA LEISHMANIOSIS CANINA CRÍPTICA

Investigaciones llevadas a cabo sobre la leishmaniosis canina han demostrado que el número de perros infectados en áreas endémicas es mucho mayor del que se obtiene al considerar únicamente los animales clínicamente enfermos (Fisa *et al.*, 1999).

Estudios seroepidemiológicos en zonas de alta endemia para esta enfermedad han demostrado la existencia de un gran número de animales asintomáticos seropositivos (Portús *et al.*, 1987, Fisa *et al.*, 1991, Sideris *et al.*, 1999). El seguimiento a lo largo del tiempo de estos animales seropositivos asintomáticos muestra que algunos de ellos se encuentran en la fase prepatente de la infección, que otros se encuentran en la fase

regresiva de la enfermedad y que un tercer grupo mantiene sus niveles de anticuerpos sin desarrollar la enfermedad durante varios años, lo que se ha dado en llamar leishmaniosis críptica (Lanotte *et al.*, 1979, Fisa *et al.*, 1991, Aisa *et al.*, 1998).

Estos animales seropositivos asintomáticos generalmente cursan con una baja respuesta humoral con una tasa de anticuerpos situada alrededor del umbral de positividad (Pinelli *et al.*, 1994, Cardoso *et al.*, 1998), zona gris donde coinciden también las reacciones cruzadas e inespecificidades de la técnica. En estos casos, los test serológicos convencionales no distinguen si se trata de animales infectados o no, ni diferencian las fases de la enfermedad en la que se encuentran.

Por su parte, las técnicas parasitológicas ofrecen la única evidencia incuestionable de la presencia del parásito en la muestra y proporcionan unos resultados muy específicos, aunque de menor sensibilidad cuando el número de parásitos es escaso. Incrementa el problema la variable capacidad de crecimiento de las diferentes cepas de *Leishmania*. La aplicación de técnicas más sensibles como la PCR y la optimización del cultivo mejoran la tasa de detección aunque sigue sin encontrarse una técnica diagnóstica definitiva que pueda ser considerada un *gold standard*, lo cual es un inconveniente para los estudios epidemiológicos de la enfermedad. La identificación de los animales con leishmaniosis críptica tiene un valor diagnóstico y epidemiológico notable, ya que la detección de la extensión de la infección es de gran importancia para el control de la enfermedad. Además, la clave determinante de parámetros como la sensibilidad, la especificidad y el valor predictivo para las técnicas diagnósticas es la determinación de si un perro se encuentra o no infectado.

Con el objetivo de determinar la utilidad de diferentes técnicas parasitológicas, inmunológicas y moleculares para detectar estas leishmaniosis caninas crípticas se aplicaron varias pruebas diagnósticas a un grupo de perros de zonas endémicas para esta zoonosis. Al analizar los resultados se observa que existe asociación entre la tasa de IgG2 detectada mediante ELISA y los resultados obtenidos mediante PCR cuando se tienen en cuenta el conjunto total de perros (Pearson, $p = 0,001$) y la cohorte de animales considerados infectados (tanto sintomáticos como asintomáticos) (Pearson, $p = 0,052$). En cambio, los resultados obtenidos de la PCR y el ELISA-IgG2 son independientes cuando se considera el grupo de animales con infección críptica (infectados asintomáticos) (Pearson, $p = 0,183$) (Iniesta *et al.*, 2002). Esto puede ser debido a la baja respuesta inmune humoral de dichos animales asintomáticos (Mary *et*

al., 1992, Berrahal *et al.*, 1996) que sitúa el nivel de anticuerpos en la región gris *borderline* de detección ya comentada anteriormente, donde los resultados positivos pueden incluir artefactos y posibles reacciones cruzadas.

Los resultados obtenidos mediante ELISA y el *western blot* también son independientes cuando se consideran los animales infectados asintomáticos (Pearson, $p > 0,05$), debido posiblemente a la poca capacidad del ELISA para discernir anticuerpos específicos cuando hay una baja respuesta humoral y diversidad idiotípica.

Esta última técnica de *western blot* se viene utilizando desde hace ya unos años y se considera que es muy específica cuando se tienen en cuenta unas bandas concretas y determinadas, consideradas como específicas de *Leishmania*, lo que permite distinguir entre reacciones específicas y cruzadas (Mary *et al.*, 1992, Carrera *et al.*, 1996, Aisa *et al.*, 1998, Fernández-Pérez *et al.*, 1999). No hay un acuerdo unánime sobre la interpretación de los resultados a la hora de establecer cuáles son las bandas diagnósticas más específicas tanto en humanos como en perros debido fundamentalmente al grado de subjetividad en la lectura y a los distintos protocolos técnicos llevados a cabo que utilizan diferentes antígenos, fracciones, grados de reducción, concentración de SDS, concentración de poliacrilamida, sustrato, dilución de suero y conjugado, entre otros (Abranches *et al.*, 1991a, Mary *et al.*, 1992, Rolland *et al.*, 1994, Mancianti *et al.*, 1995, Marty *et al.*, 1995, da Costa *et al.*, 1996, Couvreur *et al.*, 1997, Aisa *et al.*, 1998, Fernández-Pérez *et al.*, 2003, Almeida *et al.*, 2005).

Las fracciones polipeptídicas de 14, 16 y 18 kDa para IgG1 y las de 14 y 16 kDa para IgG2 se expresan precozmente en perros infectados por *L. infantum*.

La especificidad de las bandas reveladas en el *western blot* se estableció tras el análisis de 24 sueros de perros de zonas no endémicas, ocho de los cuales mostraron ligera inmunoreactividad frente a algunos polipéptidos del antígeno de *L. infantum* (69, 63, 60, 52, 46, 45, 43, 40, 38, 36, 33 ó 30 kDa para IgG1 y 69, 63, 60, 36 ó 33 kDa para IgG2), por lo que dichos polipéptidos se descartaron para el diagnóstico.

La sensibilidad de cada banda se calculó utilizando 45 perros con pruebas parasitológicas o de PCR positivas. Tras los cálculos, se consideró un *western blot* positivo aquel que detectaba alguna de las siguientes bandas: 24, 20, 18, 16 ó 14 kDa para IgG1 y 48, 31, 24, 18, 16 ó 14 kDa para IgG2.

Las fracciones polipeptídicas consideradas diagnósticas en nuestro estudio para IgG1 e IgG2 en perros coinciden con las anteriormente descritas cuando se utiliza proteína A o anti-IgG como conjugado. En humanos, los sueros de pacientes con leishmaniosis visceral analizados por Mary *et al.* (1992) reconocen los antígenos de 68, 46, 30, 28, 16 y 14 kDa y en el caso de los perros, las bandas consideradas más sensibles son las de 70, 65, 46, 30, 28, 14 y 12 kDa (Aisa *et al.*, 1998). Las fracciones de 14 y 12 kDa anteriormente descritas por Aisa *et al.* (1998) se consideran homólogas a las de 16 y 14 kDa descritas por Mary *et al.* (1992) y en este trabajo.

También se observa que las primeras fracciones polipeptídicas del antígeno de *Leishmania* reconocidas por IgG1 e IgG2 durante la respuesta inmunitaria temprana en perros infectados son de bajo peso molecular, coincidiendo también con los resultados previamente descritos en humanos (Mary *et al.*, 1992) y en perros (Aisa *et al.*, 1998). También se encuentra en este rango de bajo peso molecular el antígeno de 21 kDa de *L. infantum*, reconocido de forma precoz por anticuerpos totales de perros natural y experimentalmente infectados (Rhalem *et al.*, 1999). Las bandas de 50-57, 42 y 29 kDa también han sido detectadas de manera precoz en animales experimentalmente infectados (Carrera *et al.*, 1996). Posiblemente las diferencias de pesos moleculares de las fracciones polipeptídicas detectadas por diferentes autores radique en el método de obtención del antígeno, más reductor en unos casos (Mary *et al.*, 1992, Aisa *et al.*, 1998) que en otros (Carrera *et al.*, 1996).

Al realizar un seguimiento de los perros a lo largo del tiempo, se observa que un gran número de perros, considerados negativos mediante técnicas parasitológicas expresan anticuerpos frente a las fracciones polipeptídicas de bajo peso molecular. Concretamente, se detectan las fracciones de 14 y 16 kDa mediante IgG1 e IgG2 y la fracción de 18 kDa mayoritariamente mediante IgG1 (Iniesta *et al.*, 2007). Muchos de estos animales positivizaron mediante PCR, cultivo o examen directo en muestras subsiguientes lo que nos hace pensar que el animal ya se encontraba infectado en determinaciones anteriores cuando cursaba con una baja tasa de infección no detectable mediante técnicas parasitológicas y desarrollaba una respuesta inmune débil, lo que demuestra la alta sensibilidad del *western blot* en estas fases tempranas de la infección, siendo más sensible que el ELISA cuando se determinan IgG1 (Iniesta *et al.*, 2007).

3. OTRAS ESPECIES ANIMALES RESERVORIOS DE LEISHMANIA

Sin lugar a dudas, el perro es el reservorio peridoméstico de *L. infantum* con mayor trascendencia en la zona mediterránea por lo que no hay demasiados estudios dedicados a otros mamíferos posibles reservorios. Los hábitos alimenticios de los flebotomos, con falta de una marcada preferencia de hospedador a la hora de alimentarse (de Colmenares *et al.*, 1995a, Bongiorno *et al.*, 2003), sumado al hecho de que la variabilidad genética de las cepas de algunos focos es superior a la encontrada en el perro (Montoya *et al.*, 2007), hacen sospechar que otras especies puedan ser reservorios de la leishmaniosis como ya se ha demostrado en el caso del zorro (Gramiccia *et al.*, 1982, Marín Iniesta *et al.*, 1982, Abranches *et al.*, 1983, Fisa *et al.*, 1999), las ratas (Gramiccia *et al.*, 1982, Morillas-Márquez *et al.*, 1985), los caballos (Solano-Gallego *et al.*, 2003a, Fernández-Bellon *et al.*, 2006) y el gato (Ozon *et al.*, 1998, Hervás *et al.*, 1999, Pennisi *et al.*, 2004). La leishmaniosis felina ya se describió a principios del siglo XX y desde entonces se ha ido publicando de manera esporádica. La mayoría de los casos estudiados son cutáneos (Ozón *et al.*, 1998, Hervás *et al.*, 1999, Poli *et al.*, 2002), con abundantes parásitos en piel y con una tasa de anticuerpos muy baja, siendo los casos viscerales muy poco frecuentes.

La falta de evidencia experimental de que los gatos infectados fueran infecciosos para los vectores hacía dudar sobre el papel de este animal como hospedador, aunque recientemente se ha demostrado, a través de xenodiagnóstico, la capacidad de un gato con infección crónica por la cepa MON-1 de *L. infantum* para infectar *Phlebotomus perniciosus* (Maroli *et al.*, 2007).

La elevada prevalencia de la leishmaniosis felina apunta a esta especie como posible reservorio de *Leishmania* en la zona mediterránea.

En el estudio serológico llevado a cabo con un grupo de gatos del noroeste mediterráneo para determinar la extensión de esta infección en nuestro entorno, encontramos anticuerpos en el 6,29% de los animales analizados (Solano-Gallego *et al.*, 2007b) lo que apoya la hipótesis de que el gato actúa como un verdadero reservorio y no como un hospedador accidental. No obstante, la tasa de anticuerpos detectada es habitualmente baja y puede estar sesgada debido a que se cuantifica mediante un calibrador (véase

discusión de página 111) correspondiente al suero de un gato con leishmaniosis confirmada mediante examen directo y PCR (Leiva *et al.*, 2005).

Similares resultados se observan en un reciente estudio llevado a cabo en animales del sur de España donde se detectan anticuerpos específicos anti-*Leishmania* mediante técnica de IFI en el 60% de los gatos analizados, aunque tan solo un 6,1% presenta un nivel de anticuerpos elevado (dilución $\geq 1/160$) (Martín-Sánchez *et al.*, 2007). Teniendo en cuenta que la mayoría de los casos analizados son cutáneos o asintomáticos con baja respuesta inmune humoral y la baja sensibilidad de las técnicas serológicas en estos casos, podemos pensar que, al igual que ocurre con los perros, la tasa de gatos infectados en zonas endémicas sea considerablemente mayor que la detectada mediante los estudios seroepidemiológicos, como se demuestra al aplicar la PCR (Martín-Sánchez *et al.*, 2007).

Esta baja tasa de anticuerpos hallada, que como ya se ha discutido repetidamente puede incluir artefactos y reacciones cruzadas, nos indujo a confirmar su positividad mediante *western blot*. El patrón de fracciones proteicas del antígeno de *Leishmania* revelado por los gatos positivos concuerda con el encontrado en los casos humanos y caninos. Además, ningún suero perteneciente a los animales de zona no endémica reaccionó con los polipéptidos de bajo peso molecular (< 26 kDa) considerados específicos, lo cual confirma la especificidad de los anticuerpos determinados mediante el ELISA (Solano-Gallego *et al.*, 2007b).

El hecho de que la mayoría de los casos de leishmaniosis felina descritos hasta el momento sea cutáneo, que los gatos infectados no se recuperen sin un tratamiento específico (Leiva *et al.*, 2005), sumado a los bajos datos de prevalencia de la enfermedad encontrados en animales de zonas de alta endemia, plantea la hipótesis de que estos animales desarrollen una respuesta mayoritariamente celular. Respuesta efectiva que les confiera cierto grado de resistencia natural a *Leishmania* y que limite su localización a nivel cutáneo, siempre y cuando no se produzca una inmunosupresión del animal. Las condiciones inmunosupresoras causadas por la co-infección de *Leishmania* con un retrovirus inmunosupresor, como pueda ser el virus de la leucemia felina (FeLV) o el virus de inmunodeficiencia felina (VIF), podrían permitir la multiplicación y visceralización del parásito en el gato igual que ocurre en ratas (Gradoni *et al.*, 1983) y humanos co-infectados con el VIH (Alvar *et al.*, 1997).

CONCLUSIONES

1. La mayoría de los perros estudiados muestran una mezcla de respuesta inmune celular y humoral.
2. La respuesta de anticuerpos en la infección por *Leishmania* en el perro es fundamentalmente de tipo IgG2 y su expresión está directamente relacionada con la presencia de desórdenes patofisiológicos.
3. La expresión de IgG1 e IgE específicas únicamente se detecta en animales que desarrollan la enfermedad lo que señala su potencial papel como marcadoras de leishmaniosis canina activa.
4. El número de fracciones polipeptídicas del antígeno de *Leishmania* reconocidas por las IgG1 y las IgG2 es similar y disminuye de forma paralela a los valores relativos de ambas inmunoglobulinas detectadas mediante ELISA.
5. Bajos niveles de IgG1 post-tratamiento en animales con elevados niveles de IgG1 previos al tratamiento son un indicador de buen pronóstico.
6. El daño glomerular presente en perros polisintomáticos puede manifestarse mediante la eliminación de anticuerpos por la orina.
7. La presencia de anticuerpos anti-*Leishmania* en orina es debida mayoritariamente a un fallo en la filtración glomerular y, en menor medida, a una producción local.
8. Las fracciones polipeptídicas de 14, 16 y 18 kDa para las IgG1 y las de 14 y 16 kDa para IgG2 se expresan precozmente en perros infectados por *L. infantum*.
9. La determinación de IgG1 mediante *western blot* presenta una alta sensibilidad.
10. La elevada prevalencia de la leishmaniosis felina apunta a esta especie como posible reservorio de *Leishmania* en la zona mediterránea.

BIBLIOGRAFÍA

Abbas AK, Murphy KM, Sher A. Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature*. 1996, 383(6603):787-793.

Abranches P, Conceição Silva FM, Ribeiro MM, Lopes FJ, Gomes LT. Kala-azar in Portugal. IV. The wild reservoir: the isolation of a *Leishmania* from a fox. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1983, 77(3):420-421.

Abranches P, Santos-Gomes G, Rachamim N, Campino L, Schnur LF, Jaffe CL. An experimental model for canine visceral leishmaniasis. *Parasite Immunol*. 1991a, 13(5):537-550.

Abranches P, Silva-Pereira MCD, Conceição-Silva FM, Santos-Gomes GM, Janz JG. Canine leishmaniasis: pathological and ecological factors influencing transmission of infection. *J Parasitol*. 1991b, 77(4):557-561.

Acedo-Sánchez C, Martín Sánchez J, Vélez Bernal ID, Sanchís Marín MC, Louassini M, Maldonado JA, Morillas Márquez F. Leishmaniasis eco-epidemiology in the Alpujarra region (Granada province, southern Spain) *Int J Parasitol*. 1996, 25(3):303-310.

Acedo-Sánchez C, Morillas-Márquez F, Sanchís-Marín MC, Martín-Sánchez J. Changes in antibody titres against *Leishmania infantum* in naturally infected dogs in southern Spain. *Vet Parasitol*. 1998, 75(1):1-8.

Afrin F, Ali N. Adjuvanticity and protective immunity elicited by *Leishmania donovani* antigens encapsulated in positively charged liposomes. *Infect Immun*. 1997, 65(6):2371-2377.

Afrin F, Ali N. Isotype profiles of *Leishmania donovani*-infected BALB/c mice: preferential stimulation of IgG2a/b by liposome-associated promastigote antigens. *J Parasitol*. 1998, 84(4):743-748.

Aga E, Katschinski DM, van Zandbergen G, Laufs H, Hansen B, Müller K, Solbach W, Laskay T. Inhibition of the spontaneous apoptosis of neutrophil granulocytes by the intracellular parasite *Leishmania major*. *J Immunol*. 2002, 169(2):898-905.

Aisa MJ, Castillejo S, Gállego M, Fisa R, Riera MC, de Colmenares M, Torras S, Roura X, Sentís J, Portús M. Diagnostic potential of Western blot analysis of sera from dogs with leishmaniasis in endemic areas and significance of the pattern. *Am J Trop Med Hyg*. 1998, 58(2):154-159.

Akuffo H, Maasho K, Britton S. Immunity to human leishmaniasis. En Ali Özcel M, Ziya Alkan M. *Parasitology for the 21st Century*. CAB International, 1996:23-33.

Alexander J, Satoskar AR, Russell DG. *Leishmania* species: models of intracellular parasitism. *J Cell Sci*. 1999, 112(18):2993-3002.

Alexander J, Bryson K. T helper (h)1/Th2 and *Leishmania*: paradox rather than paradigm. *Immunol Lett*. 2005, 99(1):17-23.

Almeida MAO, Jesus EEV, Sousa-Atta MLB, Alves LC, Berne MEA, Atta AM. Antileishmanial antibody profile in dogs naturally infected with *Leishmania chagasi*. *Vet Immunol Immunopathol*. 2005, 106(1-2):151-158.

Alvar J, Ballesteros JA, Soler R, Benito A, van Eys GJM, Schoone GJ, Cabrer B. Mucocutaneous leishmaniasis due to *Leishmania (Leishmania) infantum*: biochemical characterization. *Am J Trop Med Hyg*. 1990, 43(6):614-618.

Alvar J, Gutiérrez-Solar B, Molina R, López-Vélez R, García-Camacho A, Martínez P, Laguna F, Cercenado E, Gálmes A. Prevalence of *Leishmania* infection among AIDS patients. *Lancet*. 1992, 339(8806):1427.

Alvar J. Leishmaniasis and AIDS co-infection: The Spanish example. *Parasitol Today*. 1994, 10(4):160-163.

Alvar J, Cañavate C, Gutiérrez-Solar B, Jiménez M, Laguna F, López-Vélez R, Molina R, Moreno J. *Leishmania* and human immunodeficiency virus coinfection: the first 10 years. *Clin Microbiol Rev*. 1997, 10(2):298-319.

Alvar JP. La Leishmaniasis: de la biología al control. 2ª edición. Laboratorios Intervet S.A. Madrid. 2001, 200.

Amela C, Méndez I, Torcal JM, Medina G, Pachón I, Cañavate C, Alvar J. Epidemiology of canine leishmaniasis in the Madrid region, Spain. *Eur J Epidemiol*. 1995, 11(2):157-161.

Amusátegui I, Sainz A, Aguirre E, Tesouro MA. Seroprevalence of *Leishmania infantum* in northwestern Spain, an area traditionally considered free of leishmaniasis. *Ann N Y Acad Sci*. 2004, 1026:154-157.

Anam K, Afrín F, Banerjee D, Pramanik N, Guha SK, Goswami RP, Gupta PN, Saha SK, Ali N. Immunoglobulin subclass distribution and diagnostic value of *Leishmania donovani* antigen-specific immunoglobulin G3 in Indian kala-azar patients. *Clin Diagn Lab Immunol*. 1999a, 6(2):231-235.

Anam K, Afrín F, Banerjee D, Pramanik N, Guha SK, Goswami RP, Saha SK, Ali N. Differential decline in *Leishmania* membrane antigen-specific immunoglobulin G (IgG), IgM, IgE, and IgG subclass antibodies in Indian kala-azar patients after chemotherapy. *Infect Immun*. 1999b, 67(12):6663-6669.

Ansari NA, Saluja S, Salotra P. Elevated levels of interferon-gamma, interleukin-10, and interleukin-6 during active disease in Indian kala azar. *Clin Immunol*. 2006, 119(3):339-345.

Anthony RL, Grogl M, Sacci JB, Ballou RW. Rapid detection of *Leishmania* amastigotes in fluid aspirates and biopsies of human tissues. *Am J Trop Med Hyg*. 1987, 37(2):271-276.

Arnedo Pena A, Bellido Blasco JB, González Morán F, Árias Sánchez A, Calvo Más C, Safont Adsuara L, Fabra Peirat E, Criado Juárez J, Pons Roig P. Leishmaniasis en

Castellón: Estudio epidemiológico de los casos humanos, vector y reservorio canino. Rev San Hig Púb. 1994, 68:481-491.

Ashford DA, Badaró R, Eulalio C, Freire M, Miranda C, Zalis MG, David JR. Studies on the control of visceral leishmaniasis: validation of the Falcon assay screening test-enzyme-linked immunosorbent assay (FAST-ELISA™) for field diagnosis of canine visceral leishmaniasis. Am J Trop Med Hyg. 1993, 48(1):1-8.

Ashford DA, Bozza M, Freire M, Miranda JC, Sherlock I, Eulalio C, Lopes U, Fernandes O, Degraeve W, Barker RH Jr, Badaró R, David JR. Comparison of the polymerase chain reaction and serology for the detection of canine visceral leishmaniasis. Am J Trop Med Hyg. 1995, 53(3):251-255.

Atta AM, D'Oliveira A Jr, Correa J, Atta MLB, Almeida RP, Carvalho EM. Anti-leishmanial IgE antibodies: a marker of active disease in visceral leishmaniasis. Am J Trop Med Hyg. 1998, 59(3):426-430.

Attar ZJ, Chance ML, el-Safi S, Carney J, Azazy A, El-Hadi M, Dourado C, Hommel M. Latex agglutination test for the detection of urinary antigens in visceral leishmaniasis. Acta Trop. 2001, 78(1):11-16.

Awasthi A, Mathur RK, Saha B. Immune response to *Leishmania* infection. Indian J Med Res. 2004, 119(6):238-258.

Axelrod O, Klaus S, Frankenburg S. Antigen presentation by epidermal Langerhans cells in experimental cutaneous leishmaniasis. Parasite Immunol. 1994, 16(11):593-598.

Badaró R, Jones TC, Carvalho EM, Sampaio D, Reed SG, Barral A, Teixeira R, Johnson WD Jr. New perspectives on a subclinical form of visceral leishmaniasis. J Infect Dis. 1986, 154(6):1003-1011.

Baneth G, Dank G, Keren-Kornblatt E, Sekeles E, Adini I, Eisenberger CL, Schnur LF, King R, Jaffe CL. Emergence of visceral leishmaniasis in central Israel. Am J Trop Med Hyg. 1998, 59(5):722-725.

Bastien P, Blaineau C, Pagès M. *Leishmania*: sex, lies and karyotype. Parasitol Today. 1992, 8(5):174-177.

Belkaid Y, Von Stebut E, Méndez S, Lira R, Caler E, Bertholet S, Udey MC, Sacks D. CD8+ T cells are required for primary immunity in C57BL/6 mice following low-dose, intradermal challenge with *Leishmania major*. J Immunol. 2002, 168(8):3992-4000.

Benderitter T, Casanova P, Nashkidachvili L, Quilici M. Glomerulonephritis in dogs with canine leishmaniasis. Ann Trop Med Parasitol. 1988, 82(4):335-341.

Benito A, Alvar J. Estudio preliminar de la leishmaniosis en la comunidad de Castilla-La Mancha. VI Congreso nacional y I Congreso Ibérico de Parasitología. Cáceres (España) 25-29 de septiembre de 1989, 194.

Berenguer J, Moreno S, Cercenado E, Bernaldo de Quirós JC, García de la Fuente A, Bouza E. Visceral leishmaniasis in patients infected with human immunodeficiency virus (HIV). *Ann Intern Med.* 1989, 111(2):129-132.

Berrahal F, Mary C, Roze M, Berenger A, Escoffier K, Lamouroux D, Dunan S. Canine leishmaniasis: identification of asymptomatic carriers by polymerase chain reaction and immunoblotting. *Am J Trop Med Hyg.* 1996, 55(3):273-277.

Bettini S, Gramiccia M, Gradoni L, Atzeni MC. Leishmaniasis in Sardinia: II. Natural infection of *Phlebotomus perniciosus* Newstead, 1911, by *Leishmania infantum* Nicolle, 1908, in the province of Cagliari. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1986, 80(3):458-459.

Bhatia A, Daifalla NS, Jen S, Badaró R, Reed SG, Skeiky YAW. Cloning, characterization and serological evaluation of K9 and K26: two related hydrophilic antigens of *Leishmania chagasi*. *Mol Biochem Parasitol.* 1999, 102(2):249-261.

Biedermann T, Zimmermann S, Himmelrich H, Gumy A, Egeter O, Sakrauski AK, Seegmüller I, Voigt H, Launois P, Levine AD, Wagner H, Heeg K, Louis JA, Röcken M. IL-4 instructs TH1 responses and resistance to *Leishmania major* in susceptible BALB/c mice. *Nat Immunol.* 2001, 2(11):1054-1060.

Blackwell JM, Hale C, Roberts MB, Ulczak OM, Liew FY, Howard JG. An H-11-linked gene has a parallel effect on *Leishmania major* and *L. donovani* infections in mice. *Immunogenetics.* 1985, 21(4):385-395.

Blanc Ch, Robert A. Cinquième observation de kala-azar congénital. *Presse Méd.* 1984, 13(28):1751.

Boceta C, Alonso C, Jiménez-Ruiz A. Leucine-rich repeats are the main epitopes in *Leishmania infantum* PSA during canine and human visceral leishmaniasis. *Parasite Immunol.* 2000, 22:55-62.

Boelaert M, Lynen L, Desjeux P, Van der Stuyft P. Cost-effectiveness of competing diagnostic-therapeutic strategies for visceral leishmaniasis. *Bull World Health Organ.* 1999, 77(8):667-674.

Bogdan C, Schröppel K, Lohoff M, Röllinghoff M, Solbach W. Immunization of susceptible hosts with a soluble antigen fraction from *Leishmania major* leads to aggravation of murine leishmaniasis mediated by CD4+ T cells. *Eur J Immunol.* 1990, 20(12):2533-2540.

Bogdan C, Röllinghoff M. The immune response to *Leishmania*: mechanisms of parasite control and evasion. *Int J Parasitol.* 1998, 28(1):121-134.

Bogdan C, Schönian G, Bañuls AL, Hide M, Pratlong F, Lorenz E, Röllinghoff M, Mertens R. Visceral leishmaniasis in a German child who had never entered a known endemic area: case report and review of the literature. *Clin Infect Dis.* 2001, 32(2):302-306.

Bonfante-Garrido R, Urdaneta I, Urdaneta R, Alvarado J. Natural infection of cats with *Leishmania* in Barquisimeto, Venezuela. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1991, 85(1):53.

Bongiorno G, Habluetzel A, Khoury C, Maroli M. Host preferences of phlebotomine sand flies at a hypoendemic focus of canine leishmaniasis in central Italy. *Acta Trop.* 2003, 88(2):109-116.

Botet J, Serra T, Portús M, Mora R, Gállego M. Incidencia de la leishmaniosis en el área de Barcelona. *Rev Ibér Parasitol.* 1987, Vol Extraordinario:51-54.

Botet J, Portús M. La leishmaniosis en la España peninsular. Revisión histórico-bibliográfica (1912-1985). *Rev San Hig Púb.* 1993, 67(4):255-266.

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):21-30

Brandonisio O, Carelli G, Ceci L, Consenti B, Fasanella A, Puccini V. Canine leishmaniasis in the Gargano promontory (Apulia, South Italy). *Eur J Epidemiol.* 1992, 8(2):273-276.

Brazal García T, Ruiz Atienza L, Fernández García MJ. Estudio de la incidencia de la leishmaniosis visceral canina en la comarca de Alicante por medio de la inmunofluorescencia indirecta. Resúmenes I Congr Zoon Valencia, 1990:166-169.

Bretscher PA, Wei G, Menon JN, Bielefeldt-Ohmann H. Establishment of stable, cell-mediated immunity that makes "susceptible" mice resistant to *Leishmania major*. *Science.* 1992, 257(5069):539-542.

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):3102-3111.

Bulle B, Millon L, Bart JM, Gállego M, Gambarelli F, Portús M, Schnur L, Jaffe CL, Fernández-Barredo S, Alunda JM, Piarroux R. Practical approach for typing strains of *Leishmania infantum* by microsatellite analysis. *J Clin Microbiol.* 2002, 40(9):3391-3397.

Button LL, McMaster WR. Molecular cloning of the major surface antigen of leishmania. *J Exp Med.* 1988, 167(2):724-729.

Cabral M, O'Grady J, Alexander J. Demonstration of *Leishmania* specific cell mediated and humoral immunity in asymptomatic dogs. *Parasite Immunol.* 1992, 14(5):531-539.

Cabral M, O'Grady JE, Gomes S, Sousa JC, Thompson H, Alexander J. The immunology of canine leishmaniosis: strong evidence for a developing disease spectrum from asymptomatic dogs. *Vet Parasitol.* 1998, 76(3):173-180.

Cardoso L, Neto F, Sousa JC, Rodrigues M, Cabral M. Use of a leishmanin skin test in the detection of canine *Leishmania*-specific cellular immunity. *Vet Parasitol.* 1998, 79(3):213-220.

Carrera L, Fermín ML, Tesouro M, García P, Rollán E, González JL, Méndez S, Cuquerella M, Alunda JM. Antibody response in dogs experimentally infected with *Leishmania infantum*: infection course antigen markers. *Exp Parasitol.* 1996, 82(2):139-146.

Carvalho EM, Badaró R, Reed SG, Jones TC, Johnson Jr, WD. Absence of gamma interferon and interleukin 2 production during active visceral leishmaniasis. *J Clin Invest.* 1985, 76:2066-2069.

Carvalho EM, Bacellar O, Barral A, Badaró R, Johnson WD Jr. Antigen-specific immunosuppression in visceral leishmaniasis is cell mediated. *J Clin Invest.* 1989, 83(3):860-864.

Castillo Hernández JA, Sánchez Acedo C, Gutiérrez Galindo JF, Lucientes Curdi J, Estrada Peña A, Gálmes Femenias M. Estudio epidemiológico de la leishmaniosis en la provincia de Zaragoza. Resúmenes IV Congr Nal Parasitol. Tenerife. 1985, 31.

Cavaliere T, Arnold P, Mathis A, Glaus T, Hofmann-Lehmann R, Deplazes P. Clinical, serologic, and parasitologic follow-up after long-term allopurinol therapy of dogs naturally infected with *Leishmania infantum*. *J Vet Intern Med.* 1999, 13(4):330-334.

Chang KP, Chaudhuri G, Fong D. Molecular determinants of *Leishmania* virulence. *Annu Rev Microbiol.* 1990, 44:499-529.

Chatterjee M, Jaffe CL, Sundar S, Basu D, Sen S, Mandal C. Diagnostic and prognostic potential of a competitive enzyme-linked immunosorbent assay for leishmaniasis in India. *Clin Diagn Lab Immunol.* 1999, 6(4):550-554.

Cochrane CG, Koffler D. Immune complex disease in experimental animals and man. *Adv Immunol.* 1973, 16:185-264.

Coffman RL, Shrader B, Carty J, Mosmann TR, Bond MW. A mouse T cell product that preferentially enhances IgA production. I. Biologic characterization. *J Immunol.* 1987, 139(11):3685-3690.

Collin S, Davidson R, Ritmeijer K, Keus K, Melaku Y, Kipnetich S, Davies C. Conflict and kala-azar: determinants of adverse outcomes of kala-azar among patients in southern Sudan. *Clin Infect Dis.* 2004, 38(5):612-619.

Couvreur B, Jacquet D, Bollen A, Le Ray D. Molecular characterization of antigen 24, a specific immunodominant antigen family from *Leishmania infantum*. *Parasitology.* 1997, 115:611-619.

Cruz I, Morales MA, Noguer I, Rodríguez A, Alvar J. *Leishmania* in discarded syringes from intravenous drug users. *Lancet.* 2002, 359(9312):1124-1125.

- Cruz I, Nieto J, Moreno J, Cañavate C, Desjeux P, Alvar J. *Leishmania*/HIV co-infections in the second decade. *Indian J Med Res.* 2006, 123(3):357-388.
- Cunningham AC. Parasitic adaptive mechanisms in infection by *Leishmania*. *Exp Mol Pathol.* 2002, 72(2):132-141.
- Da Costa JMC, Neogy AB, Vouldoukis I, Silva MLS, Gentilini M, Monjour L. Antigenic components of partially purified antigens of *Leishmania donovani infantum* recognized by sera from dogs with asymptomatic or active visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg.* 1996, 55(5):511-515.
- Da-Cruz AM, Conceição-Silva F, Bertho AL, Coutinho SG. *Leishmania*-reactive CD4+ and CD8+ T cells associated with cure of human cutaneous leishmaniasis. *Infect Immun.* 1994, 62(6):2614-2618.
- De Almeida MC, Vilhena V, Barral A, Barral-Netto M: Leishmanial infection: analysis of its first steps. A review. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2003, 98(7):861-870.
- De Colmenares M, Portús M, Botet J, Dobaño C, Gállego M, Wolff M, Seguí G. Identification of blood meals of *Phlebotomus perniciosus* (Diptera: *Psychodidae*) in Spain by a competitive enzyme-linked immunosorbent assay biotin/avidin method. *J Med Entomol.* 1995a, 32(3):229-233.
- De Colmenares M, Portús M, Riera C, Gállego M, Aisa MJ, Torras S, Muñoz C. Short report: detection of 72-75-kD and 123-kD fractions of *Leishmania* antigen in urine of patients with visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg.* 1995b, 52(5):427-428.
- Dedet JP, Pratlong F. Leishmaniasis. En Cook GC, Zumla AI. *Manson's tropical Diseases.* 21 ed. Saunders. Philadelphia, 2003. 1339-1364.
- Del Giudice P, Marty P, Lacour JP, Perrin C, Pratlong F, Haas H, Dellamonica P, Le Fichoux Y. Cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania infantum*. Case reports and literature review. *Arch Dermatol.* 1998, 134(2):193-198.
- De Luna R, Vuotto ML, Ielpo MTL, Ambrosio R, Piantedosi D, Moscatiello V, Ciaramella P, Scalone A, Gradoni L, Mancino D. Early suppression of lymphoproliferative response in dogs with natural infection by *Leishmania infantum*. *Vet Immunol Immunopathol.* 1999, 70(1-2):95-103.
- 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, 17:451-458.
- Dereure J, Rageh HA, Daoud W, Rioux JA. Eco-épidémiologie de la leishmaniose viscérale et cutanée dans la République arabe du Yémen. II : un aperçu en utilisant la réaction intradermique au leishmanina dans une zone d'infestation mélangée avec *Leishmania tropica*, *L. donovani* et *L. infantum* *Bull Soc Pathol Exot Filiales.* 1989, 82(5):665-668.

Dernouchamps JP, Vaerman JP, Michiels J, Masson PL. Immune complexes in the aqueous humor and serum. *Am J Ophthalmol*. 1977, 84(1):24-31.

Desjardins M, Descoteaux A. Inhibition of phagolysosomal biogenesis by the *Leishmania* lipophosphoglycan. *J Exp Med*. 1997, 185(12):2061-2068.

Desjeux P. Leishmaniasis. Public health aspects and control. *Clin Dermatol*. 1996, 14(5):417-423.

Desjeux P, Meert JP, Piot B, Alvar J, Medrano FJ, Portús M, Muñoz C, Laguna F, López-Vélez R, Salas A, Sirera G, Cisterna R, Montalbán C, Quero H, Gradoni L, Gramiccia M, Russo R, Dedet JP, Pratlong F, Dereure J, Deniau M, Izri A, Matheron S, Farault F, Marty P, Rosenthal E, Antunes F, Abranches P, Pradinaud R. *Leishmania*/HIV co-infection in south-western Europe 1990-1998: Retrospective analysis of 965 cases. WHO/LEISH/2000.42, World Health Organization. Geneva, 2000.

Desjeux P, Alvar J. *Leishmania*/HIV co-infections: epidemiology in Europe. *Ann Trop Med Parasitol*. 2003, 97(Suppl 1):3-15.

Desjeux P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. 2004, 27(5):305-318.

Dye C, Vidor E, Dereure J. Serological diagnosis of leishmaniasis: on detecting infection as well as disease. *Epidemiol Infect*. 1993, 103:647-656.

Eilam Y, El-On J, Spira DT. *Leishmania major*: excreted factor, calcium ions, and the survival of amastigotes. *Exp Parasitol*. 1985, 59(2):161-168.

Elassad AMS, Younis SA, Siddig M, Grayson J, Petersen E, Ghalib HW. The significance of blood levels of IgM, IgA, IgG and IgG subclasses in Sudanese visceral leishmaniasis patients. *Clin Exp Immunol*. 1994, 95:294-299.

El Harith A, Kolk AHJ, Leeuwenburg J, Muigai R, Huigen E, Jelsma T, Kager PA. Improvement of a direct agglutination test for field studies of visceral leishmaniasis. *J Clin Microbiol*. 1988, 26(7):1321-1325.

El Harith A, Slappendel RJ, Reiter I, van Knapen F, de Korte P, Huigen E, Kolk AHJ. Application of a direct agglutination test for detection of specific anti-*Leishmania* antibodies in the canine reservoir. *J Clin Microbiol*. 1989, 27(10):2252-2257.

El Tai NO, El Fari M, Mauricio I, Miles MA, Oskam L, El Safi SH, Presber WH, Schönian G. *Leishmania donovani*: intraspecific polymorphisms of Sudanese isolates revealed by PCR-based analyses and DNA sequencing. *Exp Parasitol*. 2001, 97(1):35-44.

Encinas Grandes A, Gómez-Bautista M, Martín Novo M, Simón Martín F. Leishmaniasis in the province of Salamanca, Spain. Prevalence in dogs and seasonal dynamics of vectors. *Ann Parasitol Hum Comp*. 1988, 63(6):387-397.

Enserink M. Has Leishmaniasis become endemic in the U.S.? *Science*. 2000, 290(5498):1881-1883.

Fernández-Bellon H, Solano-Gallego L, Rodríguez A, Rutten VPMG, Hoek A, Ramis A, Alberola J, Ferrer L. Comparison of three assays for the evaluation of specific cellular immunity to *Leishmania infantum* in dogs. *Vet Immunol Immunopathol*. 2005, 107(1-2):163-169.

Fernández-Bellon H, Solano-Gallego L, Bardagí M, Alberola J, Ramis A, Ferrer L. Immune response to *Leishmania infantum* in healthy horses in Spain. *Vet Parasitol*. 2006, 135(2):181-185.

Fernández-Martínez F. Nuevas formas de leishmaniosis patógenas humanas y caninas en el Mediodía de España. *Boletín de la Real Sociedad Española de Historia Natural*. 1914, 14:496-502.

Fernández-Pérez FJ, Méndez S, de la Fuente C, Cuquerella M, Gómez MT, Alunda JM. Value of Western blotting in the clinical follow-up of canine leishmaniasis. *J Vet Diagn Invest*. 1999, 11(2):170-173.

Fernández-Pérez FJ. Tesis doctoral: Valor diagnóstico y pronóstico de la respuesta celular (linfoproliferación, IFN- γ) y humoral (IFI, inmunodetección) en la leishmaniosis canina natural. Director: Alunda JM. Departamento de Patología Animal I (Sanidad Animal). Facultad de Veterinaria. Universidad Complutense de Madrid, 2000.

Fernández-Pérez FJ, Gómez-Muñoz MT, Méndez S, Alunda JM. *Leishmania*-specific lymphoproliferative responses and IgG1/IgG2 immunodetection patterns by Western blot in asymptomatic, symptomatic and treated dogs. *Acta Trop*. 2003, 86(1):83-91.

Ferrer L, Rabanal R, Domingo M, Ramos JA, Fondevila D. Identification of *Leishmania donovani* amastigotes in canine tissues by immunoperoxidase staining. *Res Vet Sci*. 1988a, 44(2):194-196.

Ferrer L, Rabanal R, Fondevila D, Ramos JA, Domingo M. Skin lesions in canine leishmaniosis. *J Small Anim Pract*. 1988b. 29:381-388.

Ferrer L. Leishmaniosis canina en España: datos para el clínico (editorial). *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 1989; 7(6):293-295.

Ferrer L. Clinical aspects of canine leishmaniosis. En: *Proceedings of International Canine Leishmaniasis Forum, Canine Leishmaniasis: an update*. Barcelona (Sitges), 28-31 enero de 1999. Killick-Kendrick R. Sumène, France, 1999, 6-10.

Ferrer L. The pathology of canine leishmaniosis. En: *Proceedings of the Second International Canine Leishmaniasis Forum, Canine Leishmaniasis: moving towards a solution*. Sevilla, febrero de 2002. Killick-Kendrick R. Sumène, France, 2002. 21-24.

Fisa R, Gállego M, Portús M, Gállego J. Evolución de la leishmaniosis canina en zona endémica a través de su seguimiento serológico. *Cien Vet*. 1991, 4:69-76.

Fisa R, Gállego M, Riera C, Aisa MJ, Valls D, Serra T, de Colmenares M, Castillejo S, Portús M. Serologic diagnosis of canine leishmaniasis by dot-ELISA. *J Vet Diagn Invest.* 1997, 9(1):50-55.

Fisa R, Gállego M, Castillejo S, Aisa MJ, Serra T, Riera C, Carrió J, Gállego J, Portús M. Epidemiology of canine leishmaniasis in Catalonia (Spain) the example of the Priorat focus. *Vet Parasitol.* 1999, 83(2):87-97.

Fisa R, Riera C, Gállego M, Manubens J, Portús M. Nested PCR for diagnosis of canine leishmaniasis in peripheral blood, lymph node and bone marrow aspirates. *Vet Parasitol.* 2001, 99(2):105-111.

Fisa R, Riera C, Ribera E, Gállego M, Portús M. A nested polymerase chain reaction for diagnosis and follow-up of human visceral leishmaniasis patients using blood samples. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2002, 96(Suppl 1):191-194.

Foster AP, Knowles TG, Moore AH, Cousins PDG, Day MJ, Hall EJ. Serum IgE and IgG responses to food antigens in normal and atopic dogs, and dogs with gastrointestinal disease. *Vet Immunol Immunopathol.* 2003, 92:113-124.

Gállego J, Botet J, Gállego M, Portús M. Los flebotomos de la España peninsular e Islas Baleares. Identificación y corología. Comentarios sobre los métodos de captura. En: Hernández S. *Libro Homenaje al Prof Dr. F. Martínez Gómez*. Publicaciones de la Universidad de Córdoba. Córdoba. 1992, 581-600.

Gállego M. Los flebotomos vectores de la leishmaniasis canina. Consideraciones generales. *Canis et Felis* 1997, 29:21-31.

Gangneux JP, Menotti J, Lorenzo F, Sarfati C, Blanche H, Bui H, Pratlong F, Garin YJF, Derouin F. Prospective value of PCR amplification and sequencing for diagnosis and typing of Old World *Leishmania* infections in an area of nonendemicity. *J Clin Microbiol.* 2003, 41(4):1419-1422.

García-Almagro D. Leishmaniasis cutánea. *Actas Dermosifiliogr.* 2005, 96(1):1-24.

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):617-623.

Gasser RB, Jenkins DJ, Paolillo E, Parada L, Cabrera P, Craig PS. Serum antibodies in canine echinococcosis. *Int J Parasitol.* 1993, 23:579-586.

Gil Collado J. Los insectos hematófagos y transmisores de enfermedades. Ministerio de la Gobernación, Sanidad nacional, Instituciones sanitarias. 1927, 48.

Gil Collado J, Morillas-Márquez F, Sanchís Marín MC. Los flebotomos en España. *Rev Sanid Hig Púb.* 1989, 63(5-6):15-34.

González Barrio N. Nuevas orientaciones para el descubrimiento del agente transmisor del kala-azar infantil. *Arch Esp Pediat.* 1931, 15(5):266-270.

González JL, Fermín ML, García P, Rollán E, Castaño M. Erosive colitis in experimental canine Leishmaniasis. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health*. 1990, 37(5):377-382.

Gradoni L, Pozio E, Gramiccia M, Maroli M, Bettini S. Leishmaniasis in Tuscany (Italy): VII. Studies on the role of the black rat, *Rattus rattus*, in the epidemiology of visceral leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1983, 77(4):427-431.

Gradoni L, Maroli M, Gramiccia M, Mancianti F. *Leishmania infantum* infection rates in *Phlebotomus perniciosus* fed on naturally infected dogs under antimonial treatment. *Med Vet Entomol*. 1987, 1(4):339-342.

Gradoni L, Gramiccia M, Mancianti F, Pieri S. Studies on canine leishmaniasis control. 2. Effectiveness of control measures against canine leishmaniasis in the Isle of Elba, Italy. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1988, 82(4):568-571.

Gradoni L, Gramiccia M. Leishmaniasis. En OIE (ed), *Manual of standards for diagnostic tests and vaccines*. 4th edition, Office International des Epizooties (OIE), Paris, France. 2000: 803-812.

Gramiccia M, Maazoun R, Lanotte G, Rioux JA, le Blancq S, Evans DA, Peters W, Bettini S, Gradoni L, Pozio E. Typage enzymatique de onze souches de *Leishmania* isolées, en Italie continentale, a partir de formes viscérales murines, canines et vulpines. Mise en évidence d'un variant enzymatique chez le renard (*Vulpes vulpes*) et le chien. *Ann Parasitol Hum Comp*. 1982, 57(6):527-531.

Gramiccia M, Gradoni L. The current status of zoonotic leishmaniases and approaches to disease control. *Int J Parasitol*. 2005, 35(11-12):1169-1180.

Green SJ, Crawford RM, Hockmeyer JT, Meltzer MS, Nacy CA. *Leishmania major* amastigotes initiate the L-arginine-dependent killing mechanism in IFN-gamma-stimulated macrophages by induction of tumor necrosis factor-alpha. *J Immunol*. 1990, 145(12):4290-4297.

Grimaldi G Jr, Tesh RB. Leishmaniases of the New World: current concepts and implications for future research. *Clin Microbiol Rev*. 1993, 6(3):230-250.

Guarga JL, Lucientes J, Peribáñez MA, Molina R, Gracia MJ, Castillo JA. Experimental infection of *Phlebotomus perniciosus* and determination of the natural infection rates of *Leishmania infantum* in dogs. *Acta Trop*. 2000, 77(2):203-207.

Guilvard E, Gállego M, Moreno G, Fisa R, Rispaïl P, Pratlong F, Martínez-Ortega E, Gállego J, Rioux JA. Infestation naturelle de *Phlebotomus ariasi* et *Phlebotomus perniciosus* (Diptera-Psychodidae) par *Leishmania infantum* (Kinetoplastida-Trypanosomatidae) en Catalogne (Espagne). *Parasite* 1996, 3:191-192.

Halliwell REW, DeBoer DJ. The ACVD task force on canine atopic dermatitis (III): the role of antibodies in canine atopic dermatitis. *Vet Immunol Immunopathol* 2001, 81:159-167.

Hanafi R, Barhoumi M, Ali SB, Guizani I. Molecular analyses of Old World *Leishmania* RAPD markers and development of a PCR assay selective for parasites of the *L. donovani* species complex. *Exp Parasitol* 2001, 98:90-99.

Harris E, Kropp G, Belli A, Rodríguez B, Agabian N. Single-step multiplex PCR assay for characterization of New World *Leishmania* complexes. *J Clin Microbiol.* 1998, 36(7):1989-1995.

Heinzel FP, Sadick MD, Holaday BJ, Coffman RL, Locksley RM. Reciprocal expression of interferon γ or interleukin 4 during the resolution or progression of murine leishmaniasis. Evidence for expansion of distinct helper T cell subsets. *J Exp Med.* 1989, 169(1):59-72.

Herman R. Cytophilic and opsonic antibodies in visceral leishmaniasis in mice. *Infection Immunity.* 1980, 28(2):585-593.

Hermoso T, Fishelson Z, Becker SI, Hirschberg K, Jaffe CL. Leishmanial protein kinases phosphorylate components of the complement system. *EMBO J.* 1991, 10(13):4061-4067.

Hernández-Rodríguez S, Gómez-Nieto C, Martínez-Gómez F, Gutiérrez-Palomino P. Aspectos clínicos de la leishmaniosis canina. *Rev Ibér Parasitol* 1987, Vol. Extra:61-66.

Hervás J, Méndez A, Carrasco L, Gómez-Villamandos JC. Pathological study of visceral leishmaniasis in a jackal (*Canis aureus*). *Vet Rec.* 1996, 139(12):293-295.

Hervás J, Chacón-M De Lara F, Sánchez-Isarria MA, Pellicer S, Carrasco L, Castillo JA, Gómez-Villamandos JC. Two cases of feline visceral and cutaneous leishmaniosis in Spain. *J Feline Med Surg.* 1999, 1(2):101-105.

Himmelrich H, Parra-López C, Tacchini-Cottier F, Louis JA, Launois P. The IL-4 rapidly produced in BALB/c mice after infection with *Leishmania major* down-regulates IL-12 receptor β 2-chain expression on CD4⁺ T cells resulting in a state of unresponsiveness to IL-12. *J Immunol.* 1998, 161(11):6156-6163.

Hondowicz BD, Schariton-Kersten TM, Jones DE, Scott P. *Leishmania major*-infected C3H mice treated with anti-IL-12 mAb develop but do not maintain a Th2 response. *J Immunol.* 1997, 159(10):5024-5031.

Honoré S, Garin YJF, Sulahian A, Gangneux JP, Derouin F. Influence of the host and parasite strain in a mouse model of visceral *Leishmania infantum* infection. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 1998, 21:231-239.

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):557-568.

- Hsieh CS, Heimberger AB, Gold JS, O'Garra A, Murphy KM. Differential regulation of T helper phenotype development by interleukins 4 and 10 in an $\alpha\beta$ T-cell-receptor transgenic system. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1992, 89(13):6065-6069.
- Iniesta L, Fernández-Barredo S, Bulle B, Gómez MT, Piarroux R, Gállego M, Alunda JM, Portús M. Diagnostic techniques to detect cryptic leishmaniasis in dogs. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2002, 9(5):1137-1141.
- Iniesta L, Gállego M, Portús M. Immunoglobulin G and E responses in various stages of canine leishmaniasis. *Vet Immunol Immunopathol*. 2005, 103(1-2):77-81.
- 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):189-197.
- Iqbal J, Hira PR, Saroj G, Philip R, Al-Ali F, Madda PJ, Sher A. Imported visceral leishmaniasis: diagnostic dilemmas and comparative analysis of three assays. *J Clin Microbiol*. 2002, 40(2):475-479.
- Izri MA, Marty P, Rahal A, Lelièvre A, Ozon C, Baldelli G, Presiozo J, Haas P, Le Fichoux Y. *Phlebotomus perniciosus* Newstead, 1911 naturellement infesté par des promastigotes dans la région de Nice (France). *Bull Soc Pathol Exot*. 1992, 85:385-387.
- Jambou D, Marty P, Jambou R, Le Fichoux Y, Haas P, Jourdain N, Bayada M. Preliminary serological study on canine leishmaniasis in the Alpes-Martimes Département, France. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1986, 80(4):666-667.
- Jensen ATR, Gasim S, Moller T, Ismail A, Gaafar A, Kemp M, El Hassan AM, Kharazmi A, Alce TM, Smith DF, Theander TG. Serodiagnosis of *Leishmania donovani* infections: assessment of enzyme-linked immunosorbent assays using recombinant *L. donovani* gene B protein (GBP) and a peptide sequence of *L. donovani* GBP. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1999, 93(2):157-160.
- Jiménez MI, Gutiérrez-Solar B, Benito A, Aguilar A, García E, Cercenado E, Alvar J. Cutaneous *Leishmania (L) infantum* zymodemes isolated from bone marrow in AIDS patients. *Res Rev Parasitol*. 1991, 51(1-4):95-99.
- Kamhawi S. The biological and immunomodulatory properties of sand fly saliva and its role in the establishment of *Leishmania* infections. *Microbes Infect*. 2000, 2:1765-1773.
- Karp CL, El-Safi SH, Wynn TA, Satti MMH, Kordofani AM, Hashim FA, Hag-Ali M, Neva FA, Nutman TB, Sacks DL. In vivo cytokine profiles in patients with kala-azar. Marked elevation of both interleukin-10 and interferon-gamma. *J Clin Invest*. 1993, 91(4):1644-1648.
- Katakura K, Kawazu SI, Naya T, Nagakura K, Ito M, Aikawa M, Qu JQ, Guan LR, Zuo XP, Chai JJ, Chang KP, Matsumoto Y. Diagnosis of kala-azar by nested PCR based on amplification of the *Leishmania* mini-exon gene. *J Clin Microbiol*. 1998, 36(8):2173-2177.

Kato T, Yamane H, Nariuchi H. Differential effects of LPS and CD40 ligand stimulations on the induction of IL-12 production by dendritic cells and macrophages. *Cell Immunol.* 1997, 181(1):59-67.

Kaye PM, Curry AJ, Blackwell JM. Differential production of Th1- and Th2-derived cytokines does not determine the genetically controlled or vaccine-induced rate of cure in murine visceral leishmaniasis. *J Immunol.* 1991, 146:2763-2770.

Keenan CM, Hendricks LD, Lightner L, Johnson AJ. Visceral leishmaniasis in the German shepherd dog. II. Pathology. *Vet Pathol.* 1984, 21(1):80-86.

Kemp M, Hansen MB, Theander TG. Recognition of *Leishmania* antigens by T lymphocytes from nonexposed individuals. *Infect Immun.* 1992, 60(6):2246-2251.

Kharazmi A, Rezai HR, Fani M, Behforouz NC. Evidence for the presence of circulating immune complexes in serum and C3b and C3d on red cells of kala-azar patients. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1982, 76(6):793-796.

Killick-Kendrick R, Rioux JA, Bailly M, Guy MW, Wilkes TJ, Guy FM, Davidson I, Knechtli R, Ward RD, Guilvard E, Perieres J, Dubois H. Ecology of leishmaniasis in the south of France. 20. Dispersal of *Phlebotomus ariasi* Tonnoir, 1921 as a factor in the spread of visceral leishmaniasis in the Cévennes. *Ann Parasitol Hum Comp.* 1984, 59(6):555-572.

Killick-Kendrick R. Phlebotomine vectors of the leishmaniasis: a review. *Med Vet Entomol.* 1990a, 4:1-24.

Killick-Kendrick R. The life-cycle of *Leishmania* in the sandfly with special reference to the form infective to the vertebrate host. *Ann Parasitol Hum Comp.* 1990b, 65(Suppl 1):37-42.

Killick-Kendrick R. The biology and control of phlebotomine sand flies. *Clin Dermatol.* 1999, 17(3):279-289.

Koehler K, Stechele M, Hetzel U, Domingo M, Schönián G, Zahner H, Burkhardt E. Cutaneous leishmaniasis in a horse in southern Germany caused by *Leishmania infantum*. *Vet Parasitol.* 2002, 109(1-2):9-17.

Kohanteb J, Ardehali SM, Rezai HR. Detection of *Leishmania donovani* soluble antigen and antibody in the urine of visceral leishmaniasis patients. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1987, 81:578-580.

Lachaud L, Chabbert E, Dubessay P, Reynes J, Lamothe J, Bastien P. Comparison of various sample preparation methods for PCR diagnosis of visceral leishmaniasis using peripheral blood. *J Clin Microbiol.* 2001, 39(2):613-617.

Lachaud L, Marchergui-Hammami S, Chabbert E, Dereure J, Dedet JP, Bastien P. Comparison of six PCR methods using peripheral blood for detection of canine visceral leishmaniasis. *J Clin Microbiol.* 2002, 40(1):210-215.

Laguna F, García-Samaniego J, Soriano V, Valencia E, Redondo C, Alonso MJ, González-Lahoz JM. Gastrointestinal leishmaniasis in human immunodeficiency virus-infected patients: report of five cases and review. *Clin Infect Dis*. 1994, 19(1):48-53.

Lainson R, Shaw JJ. Evolution, classification and geographical distribution. En Peters W, Killick-Kendrick R. *The leishmaniasis un biology and medicine*. vol 1. Academic Press, Londres. 1987:1-120.

Lainson R. Ecological interactions in the transmission of the leishmaniasis. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 1988, 321(1207):389-404

Lanotte G, Rioux JA, Perières J, Vollhardt Y. Ecologie des leishmanioses dans le sud de la France. 10. Les formes évolutives de la leishmaniose viscérale canine. Elaboration d'une typologie bio-clinique à finalité épidémiologique. *Ann Parasitol Hum Comp*. 1979, 54(3):277-295.

Lanotte G, Rioux JA. Fusion cellulaire chez les *Leishmania* (Kinetoplastida, Trypanosomatidae). *Comptes Rendus Séances Acad Sci Paris Sér III*. 1990, 310(7):285-288.

Laruelle-Magalon C, Toga I. Un cas de leishmaniose féline. *Prat Méd Chir Anim Comp*. 1996, 31:255-261.

Laskay T, Röllinghoff M, Solbach W. Natural killer cells participate in the early defense against *Leishmania major* infection in mice. *Eur J Immunol*. 1993, 23(9):2237-2241.

Laufs H, Müller K, Fleischer J, Reiling N, Jahnke N, Jensenius JC, Solbach W, Laskay T. Intracellular survival of *Leishmania major* in neutrophil granulocytes after uptake in the absence of heat-labile serum factors. *Infect Immun*. 2002, 70(2):826-835.

Leandro C, Santos-Gomes GM, Campino L, Romão P, Cortes S, Rolão N, Gomes-Pereira S, Riça Capela MJ, Abranches P. Cell mediated immunity and specific IgG1 and IgG2 antibody response in natural and experimental canine leishmaniosis. *Vet Immunol Immunopathol*. 2001, 79:273-284.

Leiva M, Lloret A, Peña T, Roura X. Therapy of ocular and visceral leishmaniasis in a cat. *Vet Ophthalmol*. 2005, 8(1):71-75.

Le Ray D, Afchain D, Capron A. Contribution de la connaissance des antigènes de *Leishmania* à l'immunologie des *Trypanosomatidae*. *Colloques Internationaux du CNRS n° 239. Ecologie des Leishmaniosis*. 1975, 63-73.

Lerner EA, Ribeiro JMC, Nelson RJ, Lerner MR. Isolation of maxadilan, a potent vasodilatory peptide from the salivary glands of the sand fly *Lutzomyia longipalpis*. *J Biol Chem*. 1991, 266(17):11234-11236.

Liew FY, Millott S, Li Y, Lelchuk R, Chan WL, Ziltener H. Macrophage activation by interferon-gamma from host-protective T cells is inhibited by interleukin (IL)3 and IL4 produced by disease-promoting T cells in leishmaniasis. *Eur J Immunol*. 1989, 19(7):1227-1232.

Liew FY, Parkinson C, Millott S, Severn A, Carrier M. Tumour necrosis factor (TNF α) in leishmaniasis. I. TNF α mediates host protection against cutaneous leishmaniasis. *Immunology*. 1990, 69(4):570-573.

Liew FY, O'Donnell CA. Immunology of leishmaniasis. *Adv Parasitol*. 1993, 32:161-259.

Lluch Borrás C, Soriano Mestres J. Relación entre la aparición de signos clínicos y el diagnóstico de la leishmaniosis. *Resúmenes I Congr Zoon Valencia*, 1990:171-178.

Locksley RM, Louis JA. Immunology of leishmaniasis. *Curr Opin Immunol*. 1992, 4(4):413-418.

Lonardoní MVC, Russo M, Jancar S. Essential role of platelet-activating factor in control of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* infection. *Infect Immun*. 2000, 68(11):6355-6361.

López-Vélez R, Pérez-Molina JA, Guerrero A, Baquero F, Villarrubia J, Escribano L, Bellas C, Pérez-Corral F, Alvar J. Clinicoepidemiologic characteristics, prognostic factors, and survival analysis of patients coinfecting with human immunodeficiency virus and *Leishmania* in an area of Madrid, Spain. *Am J Trop Med Hyg*. 1998, 58(4):436-443.

Low GC, Cooke WE. A congenital case of kala-azar. *Lancet*, 1926, 2:1209:1211.

Lucientes Curdi J, Sánchez Acedo C, Castillo Hernández JA, Estrada Peña A. Nota parasitológica. Sobre la infección natural por *Leishmania* en *Phlebotomus perniciosus* Newstead, 1911 y *P. ariasi* Tonnoir, 1921, en el foco de leishmaniosis de Zaragoza. *Rev Ibér Parasitol*. 1988, 48:7-8.

Maazoun R, Lanotte G, Rioux JA, Pasteur N, Killick-Kendrick R, Pratlong F. Signification du polymorphisme enzymatique chez les leishmanies. A propos de trois souches hétérozygotes de *Leishmania infantum* Nicolle, 1908, *Leishmania* cf. *tarentolae* Wenyon, 1921 et *Leishmania aethiopica* Bray, Ashford et Bray, 1973. *Ann Parasitol Hum Comp*. 1981, 56(5):467-475.

Mahoney AB, Sacks DL, Saraiva E, Modi G, Turco SJ. Intra-species and stage-specific polymorphisms in lipophosphoglycan structure control *Leishmania donovani*-sand fly interactions. *Biochemistry*. 1999, 38(31):9813-9823.

Mancianti F, Meciani N. Specific serodiagnosis of canine leishmaniasis by indirect immunofluorescence, indirect hemagglutination, and counterimmunoelectrophoresis. *Am J Vet Res*. 1988, 49(8):1409-1411.

Mancianti F, Poli A, Bionda A. Analysis of renal immune-deposits in canine leishmaniasis. Preliminary results. *Parassitologia*. 1989, 31(2-3):213-230.

Mancianti F, Falcone ML, Giannelli C, Poli A. Comparison between an enzyme-linked immunosorbent assay using a detergent-soluble *Leishmania infantum* antigen and

indirect immunofluorescence for the diagnosis of canine leishmaniosis. *Vet Parasitol.* 1995, 59(1):13-21.

Mancianti F, Sozzi S. Isolation of *Leishmania* from a newborn puppy. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1995, 89(4):402.

Mancianti F, Pedonese F, Poli A. Evaluation of dot enzyme-linked immunosorbent assay (dot-ELISA) for the serodiagnosis of canine leishmaniosis as compared with indirect immunofluorescence assay. *Vet Parasitol.* 1996, 65(1-2):1-9.

Marín Iniesta F, Marín Iniesta E, Martín Luengo F. Papel de perros y zorros como reservorio de leishmaniosis en la región murciana. Resultados preliminares. *Rev Ibér Parasitol.* 1982, 42(3):307-313.

Maroli M, Gramiccia M, Gradoni L. Natural infection of *Phlebotomus perfiliewi* with *Leishmania infantum* in a cutaneous leishmaniasis focus of the Abruzzi region, Italy. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1987, 81(4):596-598.

Maroli M, Pennisi MG, Di Muccio T, Khoury C, Gradoni L, Gramiccia M. Infection of sandflies by a cat naturally infected with *Leishmania infantum*. *Vet Parasitol.* 2007, 145(3-4):357-360.

Martínez-Cruz MS, Martínez-Moreno A, Martínez-Moreno FJ, Martínez-Gómez F, Hernández-Rodríguez S. Epidemiología de la leishmaniosis canina en Cordoba. *Rev. Ibér. Parasitol.* 1990, 50(1-2):1-7.

Martínez-Moreno A, Moreno T, Martínez-Moreno FJ, Acosta I, Hernández S. Humoral and cell-mediated immunity in natural and experimental canine leishmaniasis. *Vet Immunol Immunopathol.* 1995, 48(3-4):209-220.

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):267-273.

Marty P, Lelièvre A, Quaranta JF, Suffia I, Eulalio M, Gari-Toussaint M, Le Fichoux Y, Kubar J. Detection by Western blot of four antigens characterizing acute clinical leishmaniasis due to *Leishmania infantum*. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1995, 89(6):690-691.

Mary C, Lamouroux S, Dunan S, Quilici M. Western blot analysis of antibodies to *Leishmania infantum* antigens: potential of the 14-kD and 16-kD antigens for diagnosis and epidemiologic purposes. *Am J Trop Med Hyg.* 1992, 47(6):764-771.

Mary C, Auriault V, Faugère B, Dessein AJ. Control of *Leishmania infantum* infection is associated with CD8(+) and gamma interferon- and interleukin-5-producing CD4(+) antigen-specific T cells. *Infect Immun.* 1999, 67(11):5559-5566.

Matas Mir B y Rovira Estudio epidemiológico de la leishmaniosis canina en la isla de Mallorca. Conselleria Sanitat i Seguretat Social, Publicacions Govern Balear. 1989.

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):1145-1149.

Mbow ML, Bleyenbergh JA, Hall LR, Titus RG. *Phlebotomus papatasi* sand fly salivary gland lysate down-regulates a Th1, but up-regulates a Th2, response in mice infected with *Leishmania major*. J Immunol. 1998, 161(10):5571-5577.

Mebrahtu YB, Hendricks LD, Oster CN, Lawyer PG, Perkins PV, Pamba H, Koech D, Roberts CR. *Leishmania donovani* parasites in the nasal secretions, tonsillopharyngeal mucosa, and urine centrifugates of visceral leishmaniasis patients in Kenya. Am J Trop Med Hyg. 1993, 48(4):530-535.

Miles SA, Conrad SM, Alves RG, Jeronimo SMB, Mosser DM. A role for IgG immune complexes during infection with the intracellular pathogen *Leishmania*. J Exp Med. 2005, 201(5):747-754.

Miralles GD, Stoeckle MY, McDermott DF, Finkelman FD, Murray HW. Th1 and Th2 cell-associated cytokines in experimental visceral leishmaniasis. Infect Immun. 1994, 62(3):1058-1063.

Mohebali M, Hajjarian H, Hamzavi Y, Mobedi I, Arshi S, Zarei Z, Akhondi B, Naeini KM, Avizeh R, Fakhar M. Epidemiological aspects of canine visceral leishmaniosis in the Islamic Republic of Iran. Vet Parasitol. 2005, 129(3-4):243-251.

Molina R, Amela C, Nieto J, San-Andrés M, González F, Castillo JA, Lucientes J, Alvar J. Infectivity of dogs naturally infected with *Leishmania infantum* to colonized *Phlebotomus perniciosus*. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1994, 88(4):491-493.

Molina R, Lohse JM, Pulido F, Laguna F, López-Vélez R, Alvar J. Infection of sand flies by humans coinfecting with *Leishmania infantum* and human immunodeficiency virus. Am J Trop Med Hyg. 1999, 60(1):51-53.

Molina R, Gradoni L, Alvar J. HIV and the transmission of *Leishmania*. Ann Trop Med Parasitol. 2003, 97(Suppl 1):29-45.

Molyneux DH, Killick-Kendrick R. Morphology, ultrastructure and life cycle. En Peters W, y Killick-Kendrick R. *The leishmaniases in biology and medicine*. Academic Press, Londres. 1987, 121-176.

Moll H, Binöder K, Bogdan C, Solbach W, Rölinghoff M. Production of tumour necrosis factor during murine cutaneous leishmaniasis. Parasite Immunol. 1990, 12(5):483-494.

Moll H, Fuchs H, Blank C, Rollinghoff M. Langerhans cells transport *Leishmania major* from the infected skin to the draining lymph node for presentation to antigen-specific T cells. Eur J Immunol. 1993, 23(7):1595-1601.

Montalbán C, Martínez-Fernández R, Calleja JL, García-Díaz JD, Rubio R, Dronda F, Moreno S, Yebra M, Barros C, Cobo J, Martínez MC, Ruiz F, Costa JR. Visceral

leishmaniasis (kala-azar) as an opportunistic infection in patients infected with the human immunodeficiency virus in Spain. *Rev Infect Dis.* 1989, 11(4):655-660.

Montenegro J. Cutaneous reaction in leishmaniasis. *Arch Derm Syphilol.* 1926, 13:187-194.

Montoya L, Gállego M, Gavignet B, Piarroux R, Rioux JA, Portús M, Fisa R. Application of microsatellite genotyping to the study of a restricted *Leishmania infantum* focus: different genotype compositions in isolates from dogs and sand flies. *Am J Trop Med Hyg.* 2007, 76(5):888-895.

Moreno J, Cañavate C, Chamizo C, Laguna F, Alvar J. HIV-*Leishmania infantum* co-infection: humoral and cellular immune responses to the parasite after chemotherapy. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2000, 94(3):328-332.

Moriearty PL, Grimaldi G Jr, Galvão-Castro B, de Oliveira Neto MP, Marzochi MCA. Intralesional plasma cells and serological responses in human cutaneous leishmaniasis. *Clin Exp Immunol.* 1982, 47(1):59-64.

Morillas Márquez F, Benavides Delgado I, González Castro J, Reyes Magana A, Valero López A. Découverte de *Leishmania* sp dans des *Rattus rattus* de la province de Granade (Espagne). *Ann. Parasitol Hum Comp.* 1985, 60:768-770.

Morillas Márquez F, Sanchís Marín MC, Acedo Sánchez C, Morillas Márquez A, Martín Sánchez J. Encuesta sero-epidemiológica sobre la leishmaniosis canina e infección del flebotomo vector por *Leishmania* en la provincia de Almería (sur de España). En Hernández S. *Libro Homenaje al Prof Dr. F. Martínez Gómez.* Publicaciones de la Universidad de Córdoba. Córdoba. 1992, 135-147.

Morillas Márquez F, Sánchez Rabasco F, Ocaña J, Martín-Sánchez J, Ocaña-Wihelmi J, Acedo C, Sanchís-Marín MC. Leishmaniasis in the focus of the Axarquía region, Málaga province, southern Spain: a survey of the human, dog, and vector. *Parasitol Res.* 1996, 82(6):569-570.

Müller I, Kropf P, Etges RJ, Louis JA. Gamma interferon response in secondary *Leishmania major* infection: role of CD8+ T cells. *Infect Immun.* 1993, 61(9):3730-3738.

Munder M, Mallo M, Eichmann K, Modolell M. Murine macrophages secrete interferon γ upon combined stimulation with interleukin (IL)-12 and IL-18: A novel pathway of autocrine macrophage activation. *J Exp Med.* 1998, 187(12):2103-2108.

Murphy ML, Wille U, Villegas EN, Hunter CA, Farrell JP. IL-10 mediates susceptibility to *Leishmania donovani* infection. *Eur J Immunol.* 2001, 31(10):2848-2856.

Murray HW, Berman JD, Davies CR, Saravia NG. Advances in leishmaniasis. *Lancet.* 2005, 366(9496):1561-1577.

Nabors GS, Nolan T, Croop W, Li J, Farrell JP. The influence of the site of parasite inoculation on the development of Th1 and Th2 type immune responses in (BALB/c x C57BL/6) F1 mice infected with *Leishmania major*. Parasite Immunol. 1995, 17(11):569-579.

Nájera Angulo L. Las leishmaniosis visceral y cutánea y su importancia en España. Rev Médica Barcelona 1935, 24: 509-528.

Nájera Angulo L. Nuevos datos sobre la distribución geográfica de los *Phlebotomus* en España. Revista de Entomólogos Españoles. 1943, 4:3-12.

Nasseri M, Modabber FZ. Generalized infection and lack of delayed hypersensitivity in BALB/c mice infected with *Leishmania tropica major*. Infect Immun. 1979, 26(2):611-614.

Neogy AB, Vouldoukis I, Silva OA, Tselentis Y, Lascombe JC, Segalen T, Rzepka D, Monjour L. Serodiagnosis and screening of canine visceral leishmaniasis in an endemic area of Corsica: applicability of a direct agglutination test and immunoblot analysis. Am J Trop Med Hyg. 1992, 47(6):772-777.

Nicolas L, Sidjanski S, Colle JH, Milon G. *Leishmania major* reaches distant cutaneous sites where it persists transiently while persisting durably in the primary dermal site and its draining lymph node: a study with laboratory mice. Infect Immun. 2000, 68(12):6561-6566.

Nicolle C. Culture du parasite du bouton d'Orient. Comptes rendus hebdomadaires des séances de l'Académie des sciences. 1908, 146:842-843.

Nieto C, Habela M, Serrano F, Reina D, Navarrete I. Encuesta epidemiológica de la leishmaniosis canina en la comarca de Cáceres. Resúmenes I Congreso Ibérico de Parasitología y VI Congreso Nacional de Parasitología Cáceres 1989, 196.

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.

Nieto CG, García-Alonso M, Requena JM, Mirón C, Soto M, Alonso C, Navarrete I. 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):117-130.

Noben-Trauth N, Lira R, Nagase H, Paul WE, Sacks DL. The relative contribution of IL-4 receptor signaling and IL-10 to susceptibility to *Leishmania major*. J Immunol. 2003, 170(10):5152-5158.

Olivier M, Tanner CE. Susceptibilities of macrophage populations to infection in vitro by *Leishmania donovani*. Infect Immun. 1987, 55(2):467-471.

Orts Ruiz P. Leishmaniosis infantil (comentarios a nuestra casuística en una comarca de la provincia de Alicante). Bol Soc Val Pediat. 1964, 6(2):235-242.

- Oskam L, Nieuwenhuijs JL, Hailu A. Evaluation of the direct agglutination test (DAT) using freeze-dried antigen for the detection of anti-*Leishmania* antibodies in stored sera from various patient groups in Ethiopia. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1999, 93(3):275-277.
- Osman OF, Kager PA, Oskam L. Leishmaniasis in the Sudan: a literature review with emphasis on clinical aspects. *Trop Med Int Health.* 2000, 5(8):553-562.
- Owens SD, Oakley DA, Marryott K, Hatchett W, Walton R, Nolan TJ, Newton A, Steurer F, Schantz P, Giger U. Transmission of visceral leishmaniasis through blood transfusions from infected English foxhounds to anemic dogs. *J Am Vet Med Assoc.* 2001, 219(8):1076-1083.
- Ozbel Y, Oskam L, Ozensoy S, Turgay N, Alkan MZ, Jaffe CL, Ozcel MA. A survey on canine leishmaniasis in western Turkey by parasite, DNA and antibody detection assays. *Acta Trop.* 2000, 74(1):1-6.
- Ozon C, Marty P, Pratlong F, Breton C, Blein M, Lelièvre A, Haas P. Disseminated feline leishmaniosis due to *Leishmania infantum* in Southern France. *Vet Parasitol.* 1998, 75(2-3):273-277.
- Pampiglione S, Manson-Bahr PEC, La Placa M, Borgatti MA, Musumeci S. Studies in mediterranean leishmaniasis 3. The leishmanin skin test in kala-azar. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1975, 69(1):60-68.
- Papadopoulou C, Kostoula A, Dimitriou D, Panagiou A, Bobojianni C, Antoniadis G. Human and canine leishmaniasis in asymptomatic and symptomatic population in Northwestern Greece. *J Infect.* 2005, 50(1):53-60.
- Pearson RD, Wheeler DA, Harrison LH, Kay HD. The immunobiology of leishmaniasis. *Rev Infect Dis.* 1983; 5(5):907-927.
- Pennisi MG, Venza M, Reale S, Vitale F, Lo Giudice S. Case report of leishmaniasis in four cats. *Vet Res Commun.* 2004, 28(Suppl 1):363-366.
- Perepérez Palau F. El problema de las leishmaniosis visceral y cutánea en la provincia de Tarragona. *Rev Sanid Hig Púb.* 1947, 21:894-911.
- Pimenta PFP, Turco SJ, McConville MJ, Lawyer PG, Perkins PV, Sacks DL. Stage-specific adhesion of *Leishmania* promastigotes to the sandfly midgut. *Science.* 1992, 256(5065):1812-1815.
- Pinelli E, Killick-Kendrick R, Wagenaar J, Bernadina W, del Real G, Ruitenber J. Cellular and humoral immune responses in dogs experimentally and naturally infected with *Leishmania infantum*. *Infect Immun.* 1994, 62(1):229-235.
- Pittaluga G. Hallazgo de *Leishmania infantum* (protozoo parásito del Kala-azar infantil) en la costa de Levante de España. *Bol Inst Nac Hig Alfonso XIII.* 1912, 8(31):137-139.

Pittaluga G. Leishmaniosis espontánea del perro en la comarca de Tortosa. Bol Soc Esp Biol. 1913, 2:132-133.

Poli A, Abramo F, Mancianti F, Nigro M, Pieri S, Bionda A. Renal involvement in canine leishmaniasis. A light-microscopic, immunohistochemical and electron-microscopic study. Nephron. 1991, 57(4):444-452.

Poli A, Abramo F, Barsotti P, Leva S, Gramiccia M, Ludovisi A, Mancianti F. Feline leishmaniosis due to *Leishmania infantum* in Italy. Vet Parasitol. 2002, 106(3):181-191.

Portús M, Lanotte G, Pratlong F. Observaciones a propósito de un caso de botón de oriente adquirido en las cercanías de Barcelona. 3ª Reunión nacional de la Asociación de Parasitólogos Españoles. Madrid. 1982.

Portús M, Rioux JA, Gállego J, Lanotte G, Pratlong F, Moreno G. Les leishmanioses en Catalogne (Espagne). A propos de l'identification enzymatique de neuf souches d'origine humaine et canine. En *Leishmania. Taxonomie et phylogénèse. Applications éco-épidémiologique* (Colloques Internationales du CNRS/INSERM, 1984). Montpellier: Institut Méditerranéen d'Etudes Epidémiologiques et Ecologiques. Francia. 1986:433-438.

Portús M. Diagnóstico de laboratorio de las leishmaniasis autóctonas. Lab2000. 1987, 12:21-28.

Portús M, Fisa R, Serra T, Gállego M, Mora M. Estudios seroepidemiológicos sobre la leishmaniasis canina en Cataluña. Med Vet. 1987, 4:569-575.

Portús M, Gállego J, Gállego M, Riera C, Fisa R, Colmenares M, Aisa MJ, Torras S, Castillejo S, Esteve C, Muñoz C, Serra F, Botet J. Estudi sobre la leishmaniosis a Catalunya, En Viñas M. *La recerca a la Facultat de Farmàcia de Barcelona*. Edicions de la Universitat de Barcelona, Barcelona, 1996. 409-423.

Portús M, Gállego M, Riera C, Aisa MJ, 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 Ibér Parasitol 2002, 62(3-4):72-76.

Portús M, Gállego M, Riera C, Fisa R, Aisa MJ, Botet J, Carrió J, Castillejo S, Iniesta L, López P, Montoya L, Muñoz C, Serra T, Gállego J. A review of human and canine leishmaniosis in Catalonia, and associated vector distribution. Rev Ibér Parasitol. 2007. En prensa.

Pozio E, Gradoni L, Bettini S, Gramiccia M. Leishmaniasis in Tuscany (Italy): VI. Canine leishmaniasis in the focus of Monte Argentario (Grosseto). Acta Trop. 1981, 38(4):383-393.

Pratlong F, Rioux JA, Marty P, Faraut-Gambarelli F, Dereure J, Lanotte G, Dedet JP. Isoenzymatic analysis of 712 strains of *Leishmania infantum* in the south of France and relationship of enzymatic polymorphism to clinical and epidemiological features. J Clin Microbiol. 2004, 42(9):4077-4082.

Proudfoot L, Nikolaev AV, Feng GJ, Wei Q, Ferguson MAJ, Brimacombe JS, Liew FY. Regulation of the expression of nitric oxide synthase and leishmanicidal activity by glycoconjugates of *Leishmania* lipophosphoglycan in murine macrophages. Proc Natl Acad Sci USA. 1996, 93(20):10984-10989.

Puentes SM, Dwyer DM, Bates PA, Joiner KA. Binding and release of C3 from *Leishmania donovani* promastigotes during incubation in normal human serum. J Immunol. 1989, 143(11):3743-3749.

Pumarola M, Brevik L, Badiola J, Vargas A, Domingo M, Ferrer L. Canine leishmaniasis associated with systemic vasculitis in two dogs. J Comp Pathol. 1991, 105(3):279-286.

Quinnell RJ, Courtenay O, Garcez LM, Kaye PM, Shaw MA, Dye C, Day MJ. IgG subclass responses in a longitudinal study of canine visceral leishmaniasis. Vet Immunol Immunopathol. 2003. 91:161-168.

Rachamim N, Jaffe CL, Abranches P, Silva-Pereira MC, Schnur LF, Jacobson RL. Serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis in Portugal: comparison of three methods. Ann Trop Med Parasitol. 1991, 85(5):503-508.

Raj VS, Ghosh A, Dole VS, Madhubala R, Myler PJ, Stuart KD. Serodiagnosis of leishmaniasis with recombinant ORFF antigen. Am J Trop Med Hyg. 1999, 61(3):482-487.

Rami M, Atarhouch T, Sabri M, Cadi Soussi M, Benazzou T, Dakkak A. Leishmaniose canine dans le Rif (côte méditerranéenne marocaine): enquête séro-épidémiologique. Parasite. 2003, 10(1):79-85.

Ravindran R, Anam K, Bairagi BC, Saha B, Pramanik N, Guha SK, Goswami RP, Banerjee D, Ali N. Characterization of immunoglobulin G and its subclass response to Indian kala-azar infection before and after chemotherapy. Infect Immun. 2004 72(2):863-870.

Real Decreto 2210/1995, de 28 de diciembre, por el que se crea la Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica. España, BOE 24 de enero de 1996, núm. 21:2153.

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):2931-2935.

Reed S, Scott P. T-cell cytokine responses in leishmaniasis. Curr Opin Immunol. 1993, 5:524-531.

Reiner NE, Ng W, McMaster WR. Parasite-accessory cell interactions in murine leishmaniasis. II. *Leishmania donovani* suppresses macrophage expression of class I and class II major histocompatibility complex gene products. J Immunol. 1987, 138(6):1926-1932.

Reiner SL, Locksley RM. The Regulation of immunity to *Leishmania major*. *Ann Rev Immunol*. 1995, 13:151-177.

Reis AB, Teixeira-Carvalho A, Vale AM, Marques MJ, Giunchetti RC, Mayrink W, Guerra LL, Andrade RA, Corrêa-Oliveira R, Martins-Filho OA. Isotype patterns of immunoglobulins: Hallmarks for clinical status and tissue parasite density in Brazilian dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi*. *Vet Immunol Immunopathol*. 2006, 112(3-4):102-116.

Reyes Magaña A, Morillas Márquez F, Valero López A, González Castro J, Benavides Delgado I, Sánchez Marín MC. Encuesta sobre la leishmaniosis canina en las comarcas naturales de la provincia de Granada (Sur de España). *Rev Ibér Parasitol*. 1988, 48(3):233-240.

Rhalem A, Sahibi H, Guessous-Idrissi N, Lasri S, Natami A, Riyad M, Berrag B. Immune response against *Leishmania* antigens in dogs naturally and experimentally infected with *Leishmania infantum*. *Vet Parasitol*. 1999, 81:173-184.

Ribeiro JMC, Katz O, Pannell LK, Waitumbi J, Warburg A. Salivary glands of the sand fly *Phlebotomus papatasi* contain pharmacologically active amounts of adenosine and 5'-AMP. *J Exp Biol*. 1999, 202:1551-1559.

Ridley DS, Ridley MJ. The evolution of the lesion in cutaneous leishmaniasis. *J Pathol*. 1983, 141(1):83-96.

Riera C, Valladares JE. Viable *Leishmania infantum* in urine and semen in experimentally infected dogs. *Parasitol Today*. 1996, 12(10):412.

Riera C, Fisa R, López P, Ribera E, Carrió J, Falcó V, Molina I, Gállego M, Portús M. Evaluation of a latex agglutination test (KAtex) for detection of *Leishmania* antigen in urine of patients with HIV-*Leishmania* coinfection: value in diagnosis and post-treatment follow-up. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2004a, 23(12):899-904.

Riera C, Fisa R, Udina M, Gállego M, Portús M. Detection of *Leishmania infantum* cryptic infection in asymptomatic blood donors living in an endemic area (Eivissa, Balearic Islands, Spain) by different diagnostic methods. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2004b, 98(2):102-110.

Rioux JA, Golvan YJ, Croset H, Houin R, Juminer B, Bain O, Tour S. Ecologie des Leishmanioses dans le sud de la France. 1- Les Phébotomes. *Echantillonnage-Ethologie*. *Ann Parasitol Hum Comp*. 1967. 42(6):561-603.

Rioux JA, Albaret JL, Houin R, Dedet JP, Lanotte G, Écologie des leishmanioses dans le sud de la France. 2. Les réservoirs selvatiques. Infestation spontanée du renard (*Vulpes vulpes* L.). *Ann Parasitol Hum Comp*. 1968, 43(4):421-428.

Rioux JA, Lanotte G, Croset H, Dedet JP. Ecologie des leishmanioses dans le sud de la France. 5. Pouvoir infestant comparé des diverses formes de leishmaniose canine vis-à-vis de *Phlebotomus ariasi* Tonnoir, 1921. *Ann Parasitol Hum Comp*. 1972, 47(3):413-419.

Rioux JA, Gállego J, Jarry DM, Guilvard E, Maazoun R, Périères J, Becqueriaux L, Belmonte A. Un Phlébotome nouveau pour l'Espagne: *Phlebotomus (Adlerius) mascittii*, Grassi, 1908. Ann Parasitol Hum Comp. 1984, 59(4):421-425.

Rioux JA, Guilvard E, Gállego J, Moreno G, Pratlong F, Portús M, Rispaill P, Gállego M, Bastien P. *Phlebotomus ariasi* Tonnoir, 1921 et *Phlebotomus perniciosus* Newstead, 1911 vecteurs du complexe *Leishmania intantum* dans un même foyer. Infestations par deux zymodèmes syntopiques. A propos d'une enquête en Catalogne (Espagne). En Rioux, JA. *Leishmania. Taxonomie et phylogénèse. Applications éco-épidémiologique* (Colloques Internationales du CNRS/INSERM, 1984). Montpellier: Institut Méditerranéen d'Etudes Epidémiologiques et Ecologiques. Francia. 1986a, 439-444.

Rioux JA, Lanotte G, Petter F, Dereure J, Akalay O, Pratlong F, Vélez ID, Fikri NB, Maazoun R, Denial M, Jarry DM, Zahaf A, Ashford RW, Cadi-Soussi M, Killick-Kendrick R, Benmansour N, Moreno G, Périères J, Guilvard E, Zribi M, Kennou MF, Rispaill P, Knechtli R, Serres E. Les leishmanioses cutanées du bassin Méditerranéen occidental. De l'identification enzymatique à l'analyse éco-épidémiologique. L'exemple de trois "foyer" tunisien, marocain et français. En: Rioux, JA. *Leishmania. Taxonomie et phylogénèse. Applications éco-épidémiologique* (Colloques Internationales du CNRS/INSERM, 1984). Montpellier: Institut Méditerranéen d'Etudes Epidémiologiques et Ecologiques. Francia. 1986b, 365-395.

Rioux JA, Lanotte G, Serres E, Pratlong F, Bastien P, Périères J. Taxonomy of *Leishmania*. Use of isoenzymes. Suggestions for a new classification. Ann Parasitol Hum Comp. 1990, 65(3):111-125.

Rioux JA, Lanotte G. Apport de la cladistique à l'analyse du genre *Leishmania* Ross, 1903 (*Kinetoplastida-Trypanosomatidae*). Corollaires épidémiologiques. Biosystema. 1993, 8:79-90.

Roberts M, Alexander J, Blackwell JM. Influence of Lsh, H-2, and an H-11-linked gene on visceralization and metastasis associated with *Leishmania mexicana* infection in mice. Infect Immun. 1989, 57(3):875-881.

Rodríguez N, Guzmán B, Rodas A, Takiff H, Bloom BR, Convit J. Diagnosis of cutaneous leishmaniasis and species discrimination of parasites by PCR and hybridization. J Clin Microbiol. 1994, 32(9):2246-2252.

Rogers KA, Titus RG. Immunomodulatory effects of Maxadilan and *Phlebotomus papatasi* sand fly salivary gland lysates on human primary in vitro immune responses. Parasite Immunol. 2003, 25(3):127-134.

Roitt IM, Delver PJ. Roitt's essential immunology. 10^aed, Blackwell science, Londres. 2001.

Rolland L, Zilberfarb V, Furtado A, Gentilini M. Identification of a 94-kilodalton antigen on *Leishmania* promastigote forms and its specific recognition in human and canine visceral leishmaniasis. Parasite Immunology. 1994, 16(11):599-608.

Rose K, Curtis J, Baldwin T, Mathis A, Kumar B, Sakthianandeswaren A, Spurck T, Low Choy J, Handman E. Cutaneous leishmaniasis in red kangaroos: isolation and characterisation of the causative organisms. *Int J Parasitol.* 2004, 34(6):655-664.

Rosenthal PJ, Chaisson RE, Hadley WK, Leech JH. Rectal leishmaniasis in a patient with acquired immunodeficiency syndrome. *Am J Med.* 1988, 84(2):307-309.

Rosenthal E, Marty P, Poizot-Martin I, Reynes J, Pratlong F, Lafeuillade A, Jaubert D, Boulat O, Dereure J, Gambarelli F, Gastaut JA, Dujardin P, Dellamonica P, Cassuto JP. Visceral leishmaniasis and HIV-1 co-infection in southern France. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1995, 89(2):159-162.

Roura X, Fondevila D, Sánchez A, Ferrer L. Detection of *Leishmania* infection in paraffin-embedded skin biopsies of dogs using polymerase chain reaction. *J Vet Diagn Invest.* 1999a, 11(4):385-387.

Roura X, Sánchez A, Ferrer L. Diagnosis of canine leishmaniasis by a polymerase chain reaction technique. *Vet Rec.* 1999b, 144(10):262-264.

Sacks DL, Lal SL, Shirivastava SN, Blackwell J, Neva FA. An analysis of T cell responsiveness in Indian kala-azar. *J Immunol.* 1987, 138(3):908-913.

Sacks D, Noben-Trauth N. The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. *Nat Rev Immunol.* 2002, 2(11):845-858.

Saha S, Mondal S, Banerjee A, Ghose J, Bhowmick S, Ali N. Immune responses in kala-azar. *Indian J Med Res.* 2006, 123(3):245-266.

Sala Ginabreda JM. El kala-azar infantil en Cataluña. *Rev Esp Pediatr.* 1947, 3:304-337.

Sánchez Botija C. Leishmaniosis canina. Algunas observaciones sobre los caracteres generales del foco endémico de Madrid. *Trabajos del Instituto de Biología Animal.* 1936, 2:70-87.

Sartori A, De Oliveira AV, Roque-Barreira MC, Rossi MA, Campos-Neto A. Immune complex glomerulonephritis in experimental kala-azar. *Parasite Immunol.* 1987, 9(1):93-103.

Scalone A, De Luna R, Oliva G, Baldi L, Satta G, Vesco G, Mignone W, Turilli C, Mondesire RR, Simpson D, Donoghue AR, Frank GR, Gradoni L. 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.* 2002, 104(4):275-285.

Scharton-Kersten T, Afonso LC, Wysocka M, Trinchieri G, Scott P. IL-12 is required for natural killer cell activation and subsequent T helper 1 cell development in experimental leishmaniasis. *J Immunol.* 1995, 154(10):5320-5330.

Scott JM, Shreffler WG, Ghalib HW, el Asad A, Siddig M, Badaró R, Reed SG. A rapid and simple diagnostic test for active visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg.* 1991, 44(3):272-277

Segovia M, Martín-Luengo F. Leishmaniasis in the south-east of Spain: preliminary results of a serological and parasitological study in dogs. *Ann Trop Med Parasitol.* 1985, 79(3):337-338.

Semião-Santos SJ, el Harith A, Ferreira E, Pires CA, Sousa C, Gusmão R. Evora district as a new focus for canine leishmaniasis in Portugal. *Parasitol Res.* 1995, 81(3):235-239.

Sideris V, Papadopoulou G, Dotsika E, Karagouni E. Asymptomatic canine leishmaniasis in Greater Athens area, Greece. *Eur J Epidemiol.* 1999, 15(3):271-276.

Snapper CM, Paul WE. Interferon-gamma and B cell stimulatory factor-1 reciprocally regulate Ig isotype production. *Science.* 1987, 236(4804):944-947.

Snowden K, Hammerberg B. Dynamics of immune responses related to clinical status in *Brugia pahangi*-infected dogs. *Am J Trop Med Hyg.* 1987, 37(1):143-151.

Solano-Gallego L, Llull J, Ramos G, Riera C, Arboix M, Alberola J, Ferrer L. The Ibiza hound presents a predominantly cellular immune response against natural *Leishmania* infection. *Vet Parasitol.* 2000, 90(1-2):37-45.

Solano-Gallego L, Morell P, Arboix M, Alberola J, Ferrer L. Prevalence of *Leishmania infantum* infection in dogs living in an area of canine leishmaniasis endemicity using PCR on several tissues and serology. *J Clin Microbiol.* 2001a, 39(2):560-563.

Solano-Gallego L, Riera C, Roura X, Iniesta L, Gállego M, Valladares JE, Fisa R, Castillejo S, Alberola J, Ferrer L, Arboix M, Portús M. *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.* 2001b, 96(4):265-276.

Solano-Gallego L, Fernández-Bellón H, Serra P, Gállego M, Ramis A, Fondevila D, Ferrer L. Cutaneous leishmaniasis in three horses in Spain. *Equine Vet J.* 2003a, 35(3):320-323.

Solano-Gallego L, Rodríguez A, Iniesta L, Arboix M, Portús M, Alberola J. Detection of anti-*Leishmania* immunoglobulin G antibodies in urine specimens of dogs with leishmaniasis. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2003b, 10(5):849-855.

Solano-Gallego L, Llull J, Ramis A, Fernández-Bellón H, Rodríguez A, Ferrer L, Alberola J. Longitudinal study of dogs living in an area of Spain highly endemic for leishmaniasis by serologic analysis and the leishmanin skin test. *Am J Trop Med Hyg.* 2005, 72(6):815-818.

Solano-Gallego L, Rodríguez-Cortés A, Iniesta L, Quintana J, Pastor J, Espada Y, Portús M, Alberola J. Cross-sectional serosurvey of feline leishmaniasis in ecoregions around the Northwestern Mediterranean. *Am J Trop Med Hyg.* 2007a, 76(4):676-680.

- Solano-Gallego L, Rodríguez-Cortés A, Trotta M, Zampieron C, Razia L, Furlanello T, Caldin M, Roura X, Alberola J. Detection of *Leishmania infantum* DNA by fret-based real-time PCR in urine from dogs with natural clinical leishmaniosis. *Vet Parasitol.* 2007b, 147(3-4):315-319.
- Souza WJS, Sabroza PC, Santos CS, de Sousa E, Henrique MF, Coutinho SG. Montenegro skin tests for American cutaneous leishmaniasis carried out on school children in Rio de Janeiro, Brazil: an indicator of transmission risk. *Acta Trop.* 1992, 52(2-3):111-119.
- Spreng D. Leishmanial polyarthritis in two dogs. *J Small Anim Pract.* 1993, 34:559-563.
- Squier MKT, Sehnert AJ, Cohen JJ. Apoptosis in leukocytes. *J Leukoc Biol.* 1995, 57(1):2-10.
- Stevens TL, Bossie A, Sanders VM, Fernández-Bostrán R, Coffman RL, Mosmann TR, Vitetta ES. Regulation of antibody isotype secretion by subsets of antigen-specific helper T cells. *Nature.* 1988, 334(6179):255-258.
- Strauss-Ayali D, Jaffe CL, Burshtain O, Gonen L, Baneth G. Polymerase chain reaction using noninvasively obtained samples, for the detection of *Leishmania infantum* DNA in dogs. *J Infect Dis.* 2004, 189(9):1729-1733.
- Sundar S, Reed SG, Sharma S, Mehrotra A, Murray HW. Circulating T helper 1 (Th1) cell- and Th2 cell-associated cytokines in Indian patients with visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg.* 1997, 56(5):522-525.
- Sundar S, Rai M. Laboratory diagnosis of visceral leishmaniasis. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2002, 9(5):951-958.
- Symmers WSC. Leishmaniasis acquired by contagion: A case of marital infection in Britain. *Lancet.* 1960, 1:127-132.
- Tafuri WL, Michalick MSM, Dias M, Genaro O, Leite VHR, Barbosa AJA, Bambilra EA, da Costa CA, Melo MN, Mayrink MW. Estudo, ao microscópico óptico e eletrônico, do rim de cães natural e experimentalmente infectados com *Leishmania (Leishmania) chagasi*. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 1989, 31(3):139-145.
- Titus RG, Sherry B, Cerami A. Tumor necrosis factor plays a protective role in experimental murine cutaneous leishmaniasis. *J Exp Med.* 1989, 170(6):2097-2104.
- Toledo A, Martín-Sánchez J, Pesson B, Sanchiz-Marín C, Morillas-Márquez F. Genetic variability within the species *Leishmania infantum* by RAPD. A lack of correlation with zymodeme structure. *Mol Biochem Parasitol.* 2002, 119(2):257-264.
- Tonnoir A. Une nouvelle espèce européenne du genre *Phlebotomus* (*Phlebotomus ariasi*). *Ann Soc Ent Belge.* 1921, 61:53-56.

Travi BL, Tabares CJ, Cadena H, Ferro C, Osorio Y. Canine visceral leishmaniasis in Colombia: relationship between clinical and parasitologic status and infectivity for sand flies. *Am J Trop Med Hyg.* 2001, 64(3-4):119-124.

Ulrich M, Rodríguez V, Centeno M, Convit J. Differing antibody IgG isotypes in the polar forms of leprosy and cutaneous leishmaniasis characterized by antigen-specific T cell anergy. *Clin Exp Immunol.* 1995, 100:54-58.

Valenzuela JG, Belkaid Y, Rowton E, Ribeiro JMC. The salivary apyrase of the blood-sucking sand fly *Phlebotomus papatasi* belongs to the novel Cimex family of apyrases. *J Exp Biol.* 2001, 204:229-237.

Valladares JE. Tesis doctoral. Estudi farmacocinètic i clínic de l'antimoni de N-metilglucamina en el tractament de la leishmaniososi canina. Dir: Arboix M y Alberola J. *Departament de farmacologia i de terapèutica, Facultat de Veterinària, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, 1998, 134.*

Van der Poll T, Zijlstra EE, Mevissen M. Interleukin 6 during active visceral leishmaniasis and after treatment. *Clin Immunol Immunopathol.* 1995, 77(1):111-114.

Vercammen F, Berkvens D, Brandt J, Vansteenkiste W. A sensitive and specific 30-min Dot-ELISA for the detection of anti-*Leishmania* antibodies in the dog. *Vet Parasitol.* 1998, 79(3):221-228.

Vercammen F, Fernández-Pérez FJ, del Amo C, Alunda JM. Follow-up of *Leishmania infantum* naturally infected dogs treated with allopurinol: immunofluorescence antibody test, ELISA and Western blot. *Acta Trop.* 2002, 84:175-181.

Walters LL, Modi GB, Chaplin GL, Tesh RB. Ultrastructural development of *Leishmania chagasi* in its vector, *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). *Am J Trop Med Hyg.* 1989, 41(3):295-317.

World Health Organization. Control of the leishmaniasis. Report of WHO Expert Committee. Geneva: WHO. Technical Report Series. 1990, 793:1-158.

World Health Organization [sede Web]. Ginebra, Suïça: World Health Organization, [actualizado 27 de febrero de 2006, acceso enero 2007]. Leishmaniasis: background information. The disease and its epidemiology. Disponible en: <http://www.who.int/leishmaniasis/en/>

World Health Organization [sede Web]. Ginebra, Suïça: World Health Organization, [actualizado 11 de mayo de 2007, acceso mayo 2007]. TDR diseases. Disponible en: <http://www.who.int/tdr/diseases/default.htm>

Yanagihara Y, Ikizawa K, Kajiwara K, Koshio T, Basaki Y, Akiyama KJ. Functional significance of IL-4 receptor on B cells in IL-4-induced human IgE production. *Allergy Clin Immunol.* 1995, 96:1145-1151.

Zaffaroni E, Rubaudo L, Lanfranchi P, Mignone W. Epidemiological patterns of canine leishmaniasis in Western Liguria (Italy). *Vet Parasitol.* 1999, 81(1):11-19.

Zijlstra EE, Daifalla NS, Kager PA, Khalil EAG, El-Hassan AM, Reed SG, Ghalib HW. rK39 enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of *Leishmania donovani* infection. Clin Diagn Lab Immunol. 1998, 5(5):717-720.

Živičnjak T, Martinković F, Marinculić A, Mrljak V, Kučer N, Matijatko V, Mihaljević Z, Barić-Rafaj R. A seroepidemiologic survey of canine visceral leishmaniasis among apparently healthy dogs in Croatia. Vet Parasitol. 2005, 131(1-2):35-43.

