



UAB

Vacunación y diagnóstico
de la leishmaniosis visceral
mediante proteínas recombinantes de
Leishmania infantum
producidas en larvas de insecto



Tesis Doctoral - 2009
Felicitat Todolí Simó



Universitat Autònoma de Barcelona
Departament de Farmacologia, Terapèutica i Toxicologia
Facultat de Veterinària

**Vacunación y diagnóstico de la leishmaniosis visceral mediante
proteínas recombinantes de *Leishmania infantum* producidas en larvas
de insecto**

Memoria presentada por Felicitat Todolí Simó
para optar al Grado de Doctora en Veterinaria

Directores:
Jordi Alberola Domingo
Alhelí Rodríguez Cortés

El doctor Jordi Alberola Domingo, Profesor Agregado, y la doctora Alhelí Rodríguez Cortés, Investigadora del Departament de Farmacologia, Terapèutica i Toxicologia de la Facultat de Veterinària de la Universitat Autònoma de Barcelona

CERTIFICAN:

Que la memoria titulada “Vacunación y diagnóstico de la leishmaniosis visceral mediante proteínas recombinantes de *Leishmania infantum* producidas en larvas de insecto”, presentada por Felicitat Todolí Simó para optar al grado de Doctora en Veterinaria, ha sido realizada bajo la dirección de ambos y autorizan su presentación para que dicha memoria sea juzgada por el tribunal correspondiente.

Dr. Jordi Alberola Domingo

Dra. Alhelí Rodríguez Cortés

Bellaterra, 10 de Septiembre de 2009

ÍNDICE

Agradecimientos	1
Abreviaturas	5
Resumen	11
Introducción	17
1. Importancia de la leishmaniosis.....	19
2. Agente etiológico y formas clínicas de las leishmaniosis humanas	20
3. El vector y el ciclo de transmisión del parásito	22
4. El perro como reservorio	24
5. El desarrollo de la infección y de la respuesta inmunitaria frente a las especies viscerotrópicas de <i>Leishmania</i>	27
5.1. El papel del vector	27
5.2. Primeros pasos de la infección: respuesta innata	28
5.3. Respuesta adquirida	29
6. La infección y la respuesta inmunitaria en el perro	31
6.1. Respuesta humoral.....	31
6.2. Respuesta celular	32
7. Patogenia de la leishmaniosis canina.....	34
8. Diagnóstico de la infección por <i>L. infantum</i> en el perro.....	36
8.1. Diagnóstico clínico.....	36
8.2. Diagnóstico parasitológico	37
8.3. Diagnóstico inmunológico.....	38
8.3.1. Detección de la respuesta humoral específica frente a <i>Leishmania</i> spp.....	38
8.3.2. Detección de la respuesta celular específica frente a <i>Leishmania</i> spp.....	42
9. Tratamiento de la leishmaniosis canina.....	43
10. Control de la leishmaniosis visceral zoonótica	45
11. Modelos experimentales para el desarrollo de vacunas contra la leishmaniosis visceral zoonótica.....	46
12. Vacunación contra la leishmaniosis visceral zoonótica	48
12.1. Vacunas de primera generación	49
12.1.1. Vacunas vivas	49

12.1.2. Vacunas vivas atenuadas	49
12.1.3. Vacunas de parásito muerto	50
12.2. Vacunas de segunda generación	51
12.2.1. Vacunas de fracciones purificadas	51
12.2.2. Vacunas de proteínas recombinantes.....	53
12.3. Vacunas de tercera generación	54
12.3.1. Mejora de las vacunas de tercera generación: la estrategia <i>prime-boost</i>	58
13. La utilización de larvas de insecto infectadas con baculovirus como sistema de producción de proteínas recombinantes.....	61
14. Características de las proteínas recombinantes empleadas en esta tesis.....	63
Bibliografía.....	65

Objetivos	91
------------------------	-----------

Estudio 1

Seroreactivity against the raw insect-derived recombinant KMPII, TRYP, and LACK <i>Leishmania infantum</i> proteins in infected dogs.....	95
1. Abstract.....	97
2. Introduction	97
3. Material and methods	99
4. Results.....	105
5. Discussion.....	108
References.....	111

Estudio 2

Humoral and <i>in vivo</i> cellular immunity against the raw insect-derived recombinant <i>Leishmania infantum</i> antigens KMPII, TRYP, LACK and papLe22 in dogs from an endemic area	115
1. Abstract.....	117
2. Introduction	117
3. Material and methods	119
4. Results.....	123
5. Discussion.....	125
References.....	131

Estudio 3

Multi-antigenic heterologous prime-boost is more effective than naked DNA and insect-derived recombinant protein vaccination against experimental visceral leishmaniasis in hamsters	137
1. Abstract.....	139
2. Introduction	139
3. Material and methods	142
4. Results	148
5. Discussion.....	155
References.....	158
Discusión	163
1. Identificación de inmunógenos de células B mediante el uso de proteínas recombinantes: utilidad diagnóstica en la infección por <i>L. infantum</i> en el perro	166
2. Identificación de inmunógenos de células T mediante el uso de proteínas recombinantes	171
2.1. Utilidad diagnóstica en la en la infección por <i>L. infantum</i> en el perro.....	171
2.1. Utilidad en la identificación de candidatos vacunales	173
3. Utilidad de las proteínas recombinantes en la vacunación frente a <i>Leishmania infantum</i> : comparación de tres estrategias vacunales multiantigénicas	176
Bibliografía.....	182
Conclusiones	191

Agradecimientos



Elaborar una tesi ha estat un procés molt llarg i que evidentment no hauria pogut fer mai sola. Darrere d'aquestes pàgines hi ha molta feina en la que molts de vosaltres heu col·laborat d'una manera o d'una altra. És per això que vull donar-vos les gràcies a tots aquells que m'heu acompanyat durant el llarg camí que m'ha acabat portant fins ací, fins al moment de posar el punt i final a aquest treball.

Als meus pares i el meu germà, per tot el suport i l'afecte que m'heu donat des que ara fa deu anys em vaig allunyar de casa per vindre a estudiar a Barcelona. De vegades, he hagut de trobar a faltar les coses per aprendre què és allò que de veritat necessite. Per això, tancar aquesta tesi significarà també tancar una etapa.

A Àlex, per creure en mi més que jo, per tindre cura de mi cada dia, per recolzar-me en els moments difícils i ajudar-me a mantenir els ànims en els bons. És gràcies a tu que he arribat fins ací i que pense en el futur amb il·lusió.

A Jordi, per apostar per la recerca en una malaltia molt greu però oblidada. Gràcies per la confiança que vas dipositar en mi, per no haver-me exigít mai res, per tots els teus consells i correccions en la redacció de la tesi i dels articles, i per fer el possible perquè tingués un sou aquest últim any.

A Alhe, perquè pràcticament tot ho he après de tu, perquè t'has esforçat molt perquè tragués una bona tesi, treballant al meu costat al laboratori i corregint-me a fons cada paràgraf. Ha estat una gran sort tenir-te com a companya de feina, com a codirectora i especialment com a amiga. Només espero haver estat a l'alçada del que esperaves de mi. No tinc paraules per agrair tot el que has fet.

A Ana Ojeda, perquè des que ens vam conèixer sempre has estat a prop per donar-me ànims en cada moment complicat. Sempre he admirat la teua fortalesa i la teua capacitat per donar importància a les coses que realment en tenen. En aquests moments tan durs, m'agradaria ser una mica com tu per poder-te donar els ànims i la força que necessites. Estem amb tu, no estàs sola.

A *sir* Carlo, per animar-me cada dia a abandonar el regne dels doctorands i passar al dels doctors. A Glòria, per la complicitat que hem creat en la república independent del nostre despatx, i per haver-me donat l'última empenta per acabar la tesi. A Carles, per tots els cops que m'ha fet riure amb les seues animalades. A Glo, per regalar-me l'estampeta màgica que m'ha ajudat a acabar i pels mails que fan començar cada dia amb un somriure.

A tota la gent del departament de Genètica, que ha estat com el meu segon departament. Gràcies especialment a les Annes, Mercadé, Tomàs i Ojeda, a Maribel i a Betlem per haver-me ensenyat i ajudat quan anava ben perduda, a Anna Castelló pels maldecaps que t'he donat els matins que perdia l'autobús, a Marcel per tots els dinars que hem compartit entre *alitas de pollo* i cafès *infumables*, a Alí, Anna *Queen*, Oriol i Elisa per les bones estones i els riures. També als que ja heu marxat i heu deixat un buit, a David, Abid, Óscar, Maribel. Gràcies Maribel per estar tant pels altres, per promoure que continuem cuidant-nos mútuament, pels petits detalls com aquelles flors que em va deixar a la taula pel meu aniversari.

A Aida Sigüero, la més ràpida recollint sobrenadants. Gràcies pels teus ànims, per vindre'm a rescatar aquella setmana infernal quan ja estava a punt de tornar-me boja, per totes les vegades que m'has hagut de fer de taxista.

A Griselda i a Bernat, per totes les hores i històries que hem compartit al tren. Sempre ha estat una alegria arribar a l'estació i trobar-vos esperant a l'andana. Gràcies pels vostres ànims en la recta final.

A la gent de l'INIA, especialment a Jose Àngel per acollir-me al vostre centre, i a Silvia, Carmen i Ismael, per tot el que em va ajudar amb el tema dels baculovirus i les larves. A Mariano, perquè encara que no et vaig poder conèixer abans que tornares a Argentina, m'has ajudat molt a través del correu electrònic.

A la gent del CRESA, a Fernando pel teu optimisme contagiós i les teues contribucions al disseny experimental, a Jordi pel teu ajut amb la preparació de les vacunes, i especialment a Eva, perquè sempre vas estar disposada a ajudar-me, per molt enfeïnada que estigueres o per molt tard que fos.

A Mária perquè després d'estar un mes amb nosaltres ja semblava que et coneixíem de tota la vida, i perquè et vam trobar molt a faltar quan vas marxar. Gràcies per tota la teua ajuda amb la histopatologia i la immunohistoquímica de l'estudi dels hámsters. Ens veiem en aquesta visita que tenim pendent a Brasil!

A Laia, per la teua ajuda en la jornada maratoniana del Centre Sanitari de Mallorca després d'un viatge en vaixell sense poder dormir, i pels teus consells i revisions dels articles.

Al Departament de Microbiologia i Parasitologia Sanitàries de la Universitat de Barcelona, per cedir-nos l'antígen de *Leishmania* i el cultiu de paràsits per a la infecció. A l'Institut de Salut Carlos III, per cedir-nos la leishmanina.

A la gent del departament de Bioquímica, per deixar-nos sempre el que no tenim.

A Susanna, per cedir-nos amablement les mostres dels gossos infectats experimentalment.

A Pere, per la teua gran ajuda en les contínues visites a l'estabulari i en les hores de feina intensiva amb els animals, i per totes les xerrades filosòfiques a la poiata.

A Aida Herrerías, a Santi i a Mariona, per compartir les estones de treball al laboratori i per les xerrades terapèutiques de quan hem hagut de treballar caps de setmana o de repetir experiments per cinquena vegada.

Als secretaris de Fàrmaco, a Sergi *Tudela Tudela* i a José Luís. Gràcies José Luís per solucionar els meus problemes de memòria, encara que haguéssim de baixar el divendres a última hora a investigar entre els arxius.

Als meus amics i amigues de la facultat, a Anna Gomar, Amparo, Eva, Anna Soler, Anna Zaragoza, Kandi, Marta, Cristina, Joan Ramón, Jordi i Raül. A Maija i a Salva. Als meus amics i amigues de València, a Aida, Ariana, Ferran, Alba, Julia, Andreu, Carlos, Goyo i Germán. Perquè sempre m'heu recolzat i m'heu animat a seguir endavant. Perdó per totes les coses que m'he perdut per culpa de la tesi.

A Raquel, Álvaro, Juan, Esther i Irene, per donar-me forces i fer-me riure quan més ho necessitava.

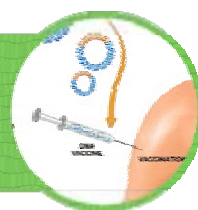
A Pedro i a Isabel, per tot el que m'heu mimat durant tot aquest temps. A Loli, per les hores que t'has espremut el cervell davant de l'ordinador per fer-me una portada amb l'únic ajut d'un títol. Moltíssimes gràcies per l'esforç, m'encanta com ha quedat!

Gràcies a tota la gent que heu tractat amb cura i respecte als animals que apareixen en aquesta tesi. Als propietaris dels gossos malalts i als veterinaris de l'hospital clínic. A Rafa i a tots els treballadors del Centre Sanitari de Protecció Animal de Mallorca, per l'afecte amb què tracteu als animals abandonats i perquè el vostre centre va canviar la visió que tenia de les gosses. A la gent de l'estabulari de l'Autònoma, especialment a Carles, per com de bé va tractar als nostres hámsters, i a Alhe i a Pere per les idees de l'enriquiment ambiental. A Ismael, per l'admiració amb què em va explicar tot el cicle de les larves i la cura amb què treballa amb *reactius* què també són éssers vius.

A tots aquells i aquelles als que segur que oblide donar les gràcies.

Voldria dedicar aquesta tesi a totes les persones que pateixen i moren cada any a causa de la leishmaniosi, i també a tots aquells que han perdut el seu gos per culpa d'aquesta malaltia.

Abreviaturas



A2	Fosfolipasa A2
Ac	Anticuerpos
AcMNPV	Virus de la nucleopolihedrosis de <i>Autographa californica</i>
ALM	<i>Leishmania major</i> autoclavada
ALP	Fosfatasa alcalina
ALT	Alanina-aminotransferasa
Alum	Hidróxido de aluminio
Amg	Amastigotes
APC	Célula presentadora de antígeno
ARP	Proteína relacionadas con la actina
BCG	Bacillus de Calmette y Guérin
BmNPV	Virus de la nucleopolihedrosis de <i>Bombix mori</i>
CanL	Leishmaniosis canina
CD	Clúster de diferenciación
CL	Leishmaniosis cutánea
CMI	Inmunidad mediada por células T
CP	Cisteína peptidasa
CpG	Secuencias de citosina y guanina
Ct	Ciclo umbral de la qPCR
CPV	Canarypox virus
CTLA	Antígeno crudo total de <i>Leishmania</i>
DAT	Test de aglutinación directa
DDT	1,1,1-Tricloro-2,2-bis(4-clorofenil)-etano
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DTH	Hipersensibilidad de tipo IV o retardada
EDTA	Sal sódica del ácido etilen diamino tetraacético
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
EU	Unidades ELISA
FCA	Adyuvante completo de Freund
FCS	Suero bovino fetal
FML	Ligando de fucosa-manosa
GM-CSF	Factor de crecimiento de colonias de granulocitos-macrófagos
GP	Glicoproteína
GRP	Proteína regulada por glucosa
H	Histona
HIV	Virus de la inmunodeficiencia humana
Hsp	Proteína de choque térmico

ABREVIATURAS

IC	Intracardiaco
ICA	Adyuvante incompleto de Freund
ID	Intradérmico
IFI	Inmunofluorescencia indirecta
IFN	Interferón
Ig	Inmunoglobulina
IHQ	Inmunohistoquímica
IL	Interleucina
IM	Intramuscular
IN	Intranasal
iNOS	Isoforma inducible de la sintasa de óxido nítrico
IV	Intravenoso
K9	Proteína de 9 kDa homóloga a la proteína hidrofílica de superficie correspondiente al gen A de <i>L. major</i>
K26	Proteína de 26 kDa homóloga a la proteína hidrofílica de superficie correspondiente al gen B de <i>L. major</i>
K39	Secuencia repetida de 39 aminoácidos de la cinesina LCKin
KMP11	Proteína de 11 kDa de la membrana de los kinetoplastea
LACK	Homólogo de <i>Leishmania</i> de los receptores de la kinasa C activada
LCR1	<i>Leishmania chagasi recombinant antigen 1</i>
Ldcccys1	Cisteína peptidasa de 30 kDa de <i>Leishmania infantum</i>
Lelf	Factor de elongación e iniciación de <i>Leishmania</i>
Leish-111f	Proteína fusión de TRYP + LeIF + LmST11, también llamada MML
LESAP	Antígenos secretados excretados purificados de promastigotes de <i>L. infantum</i>
LiF2	Fracción de 94–67 kDa de antígenos de <i>Leishmania</i> parcialmente purificados
LiP2b	Proteína ácida ribosomal 2b de <i>Leishmania infantum</i>
LJM19	Proteína de 11 kDa de la saliva de <i>Lutzomyia longipalpis</i>
LmST11	Proteína de <i>L. major</i> homóloga a la fosfoproteína 1 inducible por stress de los eucariotas
LPA	Ensayo de linfoproliferación específica
LPG	Lipofosfoglicano
LST	Test intradérmico de leishmanina
MCL	Leishmaniosis mucocutánea
MDP	Muramil dipéptido
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad

MML	Proteína fusión de TRYP + LeIF + LmSTI1, también llamada Leish-111f
MON	Sistema de clasificación de Montpellier
MPL-SE	Monofosforil lípido en emulsión estable
MVA	Virus Ankara Modificado
ND	No determinado
NH	Glicosilasa de ADN
NK	Células asesinas naturales
NO	Óxido nítrico
OD	Densidad óptica
ORFF	Marco abierto de lectura F en el locus LD1
P	Proteína acídica ribosomal
papLe22	Proteína de 22 kDa potencialmente agravante de <i>Leishmania</i>
PBMCs	Células mononucleares de sangre periférica
PBS	Tampón fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PFU	Unidades Formadoras de Colonia
Pmg	Promastigotes
PSA	Antígeno de superficie del promastigote
qPCR	PCR cuantitativa en tiempo real
r	Recombinante
RNA	Ácido ribonucleico
SC	Subcutáneo
SGE	Extracto de glándula salival
SGH	Homogenizado de glándula salival
SIDA	Síndrome de inmunodeficiencia adquirida
TGF	Factor de crecimiento transformante
T_h	Linfocito T <i>helper</i>
TLR	<i>Toll like receptor</i>
TNF	Factor de necrosis tumoral
T_{reg}	Linfocitos T reguladores
TRYP	Tryparedoxin peroxidasa
TSA	Proteína antioxidante específica de tiol
VL	Leishmaniosis visceral
VV	Virus Vaccinia
WB	Western Blot
WHO	Organización Mundial de la Salud
ZVL	Leishmaniosis visceral zoonótica

Resumen



La leishmaniosis es una enfermedad parasitaria causada por protozoos del género *Leishmania* y transmitida por la picadura de insectos dípteros. Es endémica en 88 países, 72 de los cuales se encuentran en vías de desarrollo. Se calcula que más de 12 millones de personas la sufren y que cada año se producen 2 millones de nuevos casos, de los cuales 500 000 son debidos a leishmaniosis visceral (VL), la forma más grave y a menudo mortal de la enfermedad. En la forma zoonótica de la leishmaniosis visceral (ZVL) causada por *L. infantum*, el principal reservorio peridoméstico del parásito es el perro. El control de la ZVL se basa actualmente en el diagnóstico y el tratamiento o sacrificio de los perros infectados, así como en la prevención de la infección mediante el uso de insecticidas. Para mejorar el diagnóstico de estos animales, sería de interés el hallazgo de proteínas inmunógenas del parásito que pudieran sustituir al antígeno crudo total de *Leishmania* (CTLA) y la leishmanina empleados actualmente, lo cual permitiría la estandarización, reproducibilidad y comercialización de nuevas pruebas de diagnóstico inmunológico más exactas. Sin embargo, la mejor estrategia de control de esta enfermedad según indican los modelos matemáticos, sería el desarrollo de una vacuna eficaz. Por el momento, dos vacunas contra la leishmaniosis canina (CanL) han sido registradas y comercializadas en Brasil, pero ninguna en Europa. Diversas estrategias de vacunación han sido ensayadas contra *Leishmania* sp. y, de todas ellas, la *prime-boost* es la que parece más prometedora. De este modo, la vacunación conjunta con DNA y proteínas recombinantes podría constituir una herramienta eficaz para el control de la ZVL.

El objetivo general de esta tesis ha sido evaluar la utilidad de cuatro antígenos recombinantes de *L. infantum* —rKMPII, rTRYP, rLACK y rpapLe22— en el control de la ZVL mediante su utilización en técnicas de diagnóstico inmunológico humoral (estudio 1) y celular (estudio 2) en perros, y en diferentes estrategias de vacunación en hámsters (estudio 3). Para ello, empleamos extractos crudos de larvas de *Trichoplusia ni* infectadas con baculovirus conteniendo las proteínas recombinantes rKMPII, rTRYP, rLACK y rpapLe22 sin purificar. Las larvas de insectos lepidópteros infectadas con baculovirus son uno de los sistemas más potentes y versátiles para la producción de proteínas recombinantes, ya que permiten la obtención de grandes cantidades de proteína con la mayoría de modificaciones postraduccionales de los eucariotas y a bajo coste.

La respuesta humoral y celular contra estas proteínas fue evaluada mediante ELISA y mediante prueba de hipersensibilidad retardada (DTH) en perros con leishmaniosis patente y en perros infectados sanos. La sensibilidad y especificidad de las técnicas basadas en los antígenos recombinantes se compararon con el ELISA basado en CTLA y con la prueba de DTH empleando leishmanina (LST), respectivamente. La utilidad de estos antígenos en la vacunación fue evaluada en tres estrategias diferentes en el modelo de leishmaniosis de VL de hámster: proteína, DNA y *prime-boost* heterólogo con DNA-proteína. La inmunogenicidad de las vacunas fue valorada

mediante la medición de los niveles de anticuerpos vacunales, la producción de óxido nítrico (NO) y la capacidad parasiticida de los macrófagos infectados *in vitro*. La eficacia de las vacunas se evaluó mediante la determinación de la carga parasitaria en sangre y bazo, los niveles de anticuerpos contra el parásito y la histopatología a las 20 semanas tras la infección con *L. infantum*.

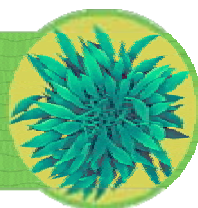
El análisis de la respuesta humoral específica en el estudio 1 mostró que el 75 % de los perros enfermos con serología positiva frente al antígeno crudo presentaba anticuerpos contra rKMPII, el 50 % contra rTRYP y el 42 % contra rLACK. Estos resultados demuestran que los tres antígenos, pero especialmente KMPII, son inmunógenos de las células B durante la CanL. En 2 de los 5 perros con CanL del estudio 2 se detectaron anticuerpos contra rpapLe22, demostrando que este antígeno es también un inmunógeno de linfocitos B. No obstante, la estimación de la seroprevalencia contra este último antígeno requeriría estudios con un mayor número de animales. La combinación de los ELISA de rKMPII, rTRYP y rLACK en paralelo para el diagnóstico de la CanL tuvo una sensibilidad del 93 % y una especificidad del 97 % no diferentes de las obtenidas con CTLA-ELISA, demostrando así que los tres antígenos producidos en larvas de *T. ni* pueden ser utilizados para obtener una técnica sensible, específica, reproducible y de bajo coste para el diagnóstico de los perros con CanL. Sin embargo, los perros infectados sin signos clínicos incluidos en el estudio 2 no presentaron anticuerpos frente a CTLA y por tanto, tampoco frente a las proteínas recombinantes.

La evaluación de la respuesta celular *in vivo* mediante DTH en una población de perros residentes en zona endémica (estudio 2) mostró que el 27 % de los perros infectados presentaba una reacción DTH positiva contra el antígeno rKMPII, el 50 % contra rTRYP, el 18 % contra rLACK y el 18 % contra rpapLe22. Estos resultados demuestran que los cuatro antígenos, pero especialmente TRYP, son capaces de estimular la respuesta de las células T durante la infección por *L. infantum*. La combinación de los resultados de las pruebas de DTH empleando rTRYP y rKMPII en paralelo consiguió un 78 % tanto de sensibilidad como de especificidad, no diferente de la obtenida con LST, sugiriendo que ambos antígenos pueden ser componentes de una técnica de DTH para el diagnóstico de los perros infectados. La evaluación de la respuesta celular mediante LST o la combinación de los resultados de DTH de KMPII y rTRYP en paralelo constituyeron las técnicas más sensibles para el diagnóstico de los perros infectados sin signos clínicos, superiores a la PCR cuantitativa en sangre. El papel que TRYP parece desarrollar sobre la respuesta inmunitaria de los perros con infección subclínica, sugiere que este antígeno puede ser un prometedor candidato vacunal contra la CanL. El escaso papel de rKMPII, rLACK o rpapLe22 en la respuesta celular en los perros con infección subclínica, en contraste con su elevado a

moderado papel en la respuesta humoral durante la CanL sugiere que estos antígenos deben ser empleados en estrategias de vacunación capaces de inducir una respuesta T_h1.

De las tres estrategias de vacunación ensayadas en el modelo de leishmaniosis de hámster con estos cuatro antígenos, la *prime-boost* heteróloga con DNA-proteína fue la que obtuvo un mayor grado de protección frente a la infección experimental con *L. infantum*. Esta estrategia indujo un aumento significativo en la producción de NO en los macrófagos infectados *in vitro*, así como una disminución significativa de la carga parasitaria en bazo (86 %) y sangre (99 %), y una disminución de los niveles de anticuerpos contra el parásito post-infección. Asimismo, la vacunación DNA-proteína redujo significativamente la aparición de ciertas alteraciones histopatológicas en bazo e hígado relacionadas con la enfermedad en relación con el grupo control. Por su parte, la vacunación con DNA desnudo no estimuló la producción de NO, pero consiguió una disminución significativa del 90 % de la carga parasitaria en bazo, aunque no en sangre. Tras la vacunación con proteínas no se detectó inmunogenicidad ni protección. Los resultados demuestran que la estrategia *prime-boost* es capaz de estimular una potente respuesta celular, superior a la obtenida con proteínas recombinantes o con DNA desnudo utilizando los mismos antígenos, la cual es además capaz de inducir un elevado grado de protección contra *L. infantum*.

Introducción



1. IMPORTANCIA DE LA LEISHMANIOSIS

La leishmaniosis es una enfermedad causada por diferentes especies de protozoos del género *Leishmania*. Actualmente constituye la tercera enfermedad humana más importante de entre las transmitidas por vectores —después de la malaria y la filariasis— y la novena enfermedad infecciosa más grave a nivel mundial (Alvar *et al.*, 2006a). La enfermedad es endémica en 88 países, 72 de los cuales se encuentran en vías de desarrollo. Se calcula que más de 12 millones de personas sufren ya la enfermedad y que la décima parte de la población mundial está en riesgo de contraerla. Se estima que cada año se producen 2 millones de nuevos casos, de los cuales 1,5 millones son casos de leishmaniosis cutánea (CL) y 500 000 son casos de leishmaniosis visceral (VL), que es la forma más grave y frecuentemente mortal si no se trata (<http://www.who.int/leishmaniasis/en/>). La VL causa más de 59 000 muertes anuales —una cifra únicamente superada por la malaria entre las enfermedades parasitarias— y provoca discapacidades que suponen una gran carga social, con unas pérdidas equivalentes 2 357 000 años de vida ajustados por discapacidad. El 90 % de los casos de CL se concentran en Afganistán, Brasil, Irán, Perú, Arabia Saudí y Siria, mientras que el 90 % de los casos de VL ocurren en Bangladesh, Brasil, India, Nepal y Sudán. No obstante, la verdadera extensión de la enfermedad podría ser todavía mayor, ya que la declaración oficial de la leishmaniosis sólo es obligatoria en un tercio de los países afectados y una parte sustancial de los casos nunca queda registrada (Hotez *et al.*, 2008).

Figura 1. Mapa de la distribución geográfica de la leishmaniosis y de la coinfección *Leishmania*/HIV (1990 – 1998)



Fuente: http://www.who.int/csr/resources/publications/CSR_ISR_2000_1leish/en/index.html

La leishmaniosis es una enfermedad claramente asociada a la pobreza (Desjeux, 2004). Factores como la desnutrición, la mala condición de las viviendas, la falta de sanidad ambiental, la

presencia de otras enfermedades infecciosas y el difícil acceso a la atención sanitaria incrementan el riesgo de sufrir la enfermedad. Cuando aparece, la leishmaniosis potencia aún más el empobrecimiento, debido al elevado coste del tratamiento, y a la indisposición que genera la propia enfermedad (Alvar *et al.*, 2006a). En India, el 88 % de los pacientes con VL tienen unos ingresos económicos diarios que no superan los 2 \$ USA (Thakur, 2000), mientras que el coste del tratamiento se eleva hasta los 30 o incluso hasta los 1600 \$ USA en caso de los fármacos más novedosos, cuyo altísimo coste impide el acceso a estos pacientes (Desjeux, 2004).

En Europa, la extensión del parásito no ha sido objeto de control por parte de las autoridades sanitarias (Dujardin *et al.*, 2008). Aunque la enfermedad ha estado restringida tradicionalmente a los países del Mediterráneo y su incidencia es relativamente baja (unos 700 casos anuales), la verdadera tasa de infección podría ser 100 veces superior al número de pacientes sintomáticos (Pampiglione *et al.*, 1975). En los últimos años, han comenzado a aparecer casos en zonas que se consideraban no endémicas (Bogdan *et al.*, 2001; Maroli *et al.*, 2008) y se han detectado focos de nuevas especies del parásito que hasta ahora no existían en Europa (Antoniou *et al.*, 2008). Especial atención merecen los pacientes con coinfección *Leishmania*/HIV, ya que en estos enfermos ambos patógenos se potencian mutuamente: mientras el HIV favorece la ineficacia del tratamiento contra el parásito, *Leishmania* acelera la aparición del sida (Alvar *et al.*, 2008). Se ha estimado que el 70 % de los casos de VL en adultos se encuentra asociado a la infección con HIV y que más del 9 % de todos los pacientes con sida sufren leishmaniosis (Reithinger y Davies, 2002). Aunque en el sur de Europa la terapia con retrovirales ha disminuido la incidencia de la coinfección en las últimas décadas, este no es el caso en otras regiones. En África y Asia, donde el acceso a los tratamientos antivirales es limitado, los casos de sida no han dejado de aumentar y la incidencia de coinfección podría ser mucho mayor a la registrada.

Actualmente, el número de pacientes con leishmaniosis aumenta de manera alarmante e incontrolada, debido a diversos factores como la inexistencia de una vacuna, la ineficacia del tratamiento, la aparición de resistencias a fármacos, o la expansión del parásito a causa del cambio climático, las migraciones y la globalización (Shaw, 2007; Dereure *et al.*, 2009; Kedzierski *et al.*, 2009).

2. AGENTE ETIOLÓGICO Y FORMAS CLÍNICAS DE LAS LEISHMANIOSIS HUMANAS

El género *Leishmania* está compuesto por protozoos flagelados pertenecientes a la familia *Trypanosomatidae*, del orden *Trypanosomatida* en la clase *Kinetoplastea*. Existen más de 20

especies de *Leishmania* patógenas para los humanos (Grevelink y Lerner, 1996), las cuales pueden dar lugar a la aparición de enfermedad de carácter cutáneo, mucocutáneo o visceral.

Las manifestaciones clínicas de la infección por *Leishmania* son muy diversas y dependen de la interacción entre el parásito y el huésped, de manera que tanto los factores de virulencia de *Leishmania* como las características propias del individuo infectado afectan al resultado final (Brandonisio *et al.*, 2000). En cuanto al parásito, existe una gran variabilidad entre cepas de una misma especie. Así, por ejemplo, *L. infantum* incluye 31 zimodemas, de los cuales 30 se han detectado en humanos (Kuhls *et al.*, 2008). No obstante, la mayoría de los casos son producidos por parásitos del zimodema MON-1, según el sistema de Montpellier de clasificación (MON) (Gallego *et al.*, 2001). En cuanto al individuo, existen ciertos factores de riesgo para el desarrollo de la enfermedad, como son el estado nutricional (Maciel *et al.*, 2008), el sexo (Roberts *et al.*, 2001), la edad (Bhattacharya *et al.*, 2006) y las alteraciones del estado inmunológico por la presencia de otras infecciones concomitantes (Alvar, 1994). Además, se ha demostrado la existencia de componentes genéticos que predisponen a la VL (Blackwell *et al.*, 2004), como es el caso del gen *SLC11A1* (solute carrier family 11 member 1) —anteriormente conocido como *LSH*, *NRAMP*, o *NRAMP1*—, cuyas mutaciones y variaciones de expresión aumentan la susceptibilidad a diversos patógenos intracelulares de especies como *Mycobacterium*, *Salmonella* y *Leishmania* (Mohamed *et al.*, 2004; Fortier *et al.*, 2005; Bayele *et al.*, 2007).

Tabla 1. Formas clínicas de leishmaniosis y especies asociadas

Forma clínica	Especies asociadas
Cutánea (CL)	Localizada <i>L. aethiopica</i> , <i>L. amazonensis</i> , <i>L. archibaldi</i> , <i>L. braziliensis</i> , <i>L. guayanensis</i> , <i>L. infantum</i> , <i>L. lansoni</i> , <i>L. major</i> , <i>L. mexicana</i> , <i>L. naiff</i> , <i>L. panamensis</i> , <i>L. peruviana</i> , <i>L. shawi</i> , <i>L. tropica</i> , <i>L. venezuelensis</i>
	Difusa <i>L. amazonensis</i> , <i>L. aethiopica</i> , <i>L. Major</i>
	Diseminada <i>L. braziliensis</i> , <i>L. mexicana</i>
	Recidivans <i>L. braziliensis</i> (*), <i>L. tropica</i> .
	Post kala-azar <i>L. donovani</i>
Mucocutánea (MCL)	<i>L. braziliensis</i> , <i>L. mexicana</i> (*), <i>L. panamensis</i>
Visceral (VL)	<i>L. amazonensis</i> (*), <i>L. archibaldi</i> , <i>L. donovani</i> , <i>L. infantum</i>

(*) Raramente. Información extraída de: Grevelink y Lerner, 1996; McMahon-Pratt y Alexander, 2004; Gramiccia y Gradoni, 2005; Gonzalez y Velez, 2006; Hashiguchi, 2007.

Aunque existen variaciones en la clasificación, las leishmaniosis pueden dividirse en CL, VL y leishmaniosis mucocutánea (MCL) atendiendo a los cuadros clínicos relacionados con el tropismo principal que presentan las especies implicadas en la enfermedad (Tabla 1). La CL localizada

produce lesiones principalmente en la cara, brazos y piernas y aunque cura de manera espontánea, puede dejar marcas permanentes en la piel y originar una grave discapacidad. La CL difusa produce lesiones lepromatosas y se asocia a estados inmunes anérgicos frente a *Leishmania*; no cura de manera espontánea y el tratamiento es poco efectivo, produciendo un curso clínico crónico. En cambio, la CL diseminada produce un gran número de lesiones acneiformes sobre todo el cuerpo, pero en general responde bien al tratamiento. La CL recidivante es una forma cutánea crónica donde las lesiones crecen y tienden a curar en el centro, pero persisten durante varios años. La MCL se inicia con una lesión cutánea que meses o años después acaba produciendo lesiones deformantes en la cara al destruir las membranas mucosas de la nariz, faringe o laringe. Finalmente, la VL o kala-azar se caracteriza por episodios de fiebre, pérdida de peso, hepatoesplenomegalia y anemia. Es la forma más grave de leishmaniosis, llegando a ser mortal si no se trata. En algunos pacientes, tras el tratamiento y la recuperación de VL, aparece una forma cutánea crónica denominada leishmaniosis post-kala-azar.

3. EL VECTOR Y EL CICLO DE TRANSMISIÓN DEL PARÁSITO

Leishmania se transmite mediante la picadura de insectos dípteros hematófagos de la familia *Psychodidae*. Las especies que actúan como vectores de *Leishmania* están restringidas a dos géneros: *Phlebotomus* en las ecozonas Paleártica, Afrotropical e Indomalaya y *Lutzomyia* en la ecozona Neotropical. En total, unas 70 especies de estos géneros son vectores probados o sospechosos de transmitir el parásito (Bates, 2008). En la cuenca mediterránea *P. perniciosus* y *P. ariasis* son los responsables de la transmisión de *L. infantum* (Rioux, 1986; Martin-Sanchez *et al.*, 1994). Además de los vectores clásicos, se ha descrito la existencia de especies capaces de transmitir la enfermedad en ecozonas donde aquellos no existían, aumentando el riesgo del establecimiento de *Leishmania* en zonas no endémicas. Este fenómeno fue acuñado con el nombre de permisividad de los vectores (Volf *et al.*, 2008). El caso más grave podría ser el de *Lutzomyia (Lu.) longipalpis*, el vector que habría permitido el asentamiento de *L. infantum* (= *L. chagasi*) en la ecozona Neotropical hace 500 años (Lukes *et al.*, 2007). *Lu. longipalpis* es un vector con gran permisividad, puesto que puede ser infectado con especies como *L. mexicana*, *L. major*, *L. braziliensis* y recientemente se ha sugerido que podría estar transmitiendo *L. amanzonensis* (Tolezano *et al.*, 2007). La existencia de dichos vectores sugiere que la transmisión del parásito no está asociada necesariamente con las especies de insectos descritas hasta el momento.

El ciclo vital de *Leishmania* (Figura 2) se inicia cuando una hembra de flebotomo parasitada ingiere sangre de un hospedador vertebrado e inyecta simultáneamente promastigotes (1). Éstos son fagocitados por los macrófagos del hospedador (2) y se transforman en amastigotes, la fase

intracelular del parásito (Antoine *et al.*, 1998) (3), que se reproduce en el interior de esta célula diana (4). Los macrófagos infectados pueden romperse y liberar los amastigotes, o bien ser fagocitados (Chang *et al.*, 2003), infectando así nuevos macrófagos. Cuando una nueva hembra de insecto ingiere sangre de este hospedador (5), los macrófagos parasitados se destruyen en el aparato digestivo del insecto y los amastigotes son liberados en el intestino medio del flebotomo (6). Allí desarrollan un flagelo y se transforman de nuevo en promastigotes (7). Después de diferentes fases, migran hacia la parte anterior del intestino medio, desde donde aproximadamente 1000 promastigotes son regurgitados (Rogers *et al.*, 2004) (8) e inyectados en la piel de un nuevo huésped, iniciándose así un nuevo ciclo (Tanner, 1996). Aunque tradicionalmente la reproducción de los parásitos se consideraba que ocurría por fisión binaria, hay indicios muy recientes de una reproducción sexual del parásito en el vector (Akopyants *et al.*, 2009).

El momento de la transmisión es crucial para el parásito, que ha de ser inoculado al hospedador justo en la fase de promastigote metacíclico, cuando ha alcanzado la madurez infectiva. Para asegurar la transmisión, el parásito ha desarrollado mecanismos capaces de alterar el comportamiento del vector (Rogers y Bates, 2007). Así, el vector infectado con promastigotes metacíclicos se alimenta un mayor número de veces y durante más tiempo, incrementando la eficiencia de transmisión.

En ocasiones el vector no interviene en la transmisión de *Leishmania*. El riesgo de transmisión sanguínea existe y se han descrito casos ocurridos de forma accidental en humanos (Shaw, 2007) y en perros (Owens *et al.*, 2001). Por el momento no se analiza de forma rutinaria la presencia de *Leishmania* en los bancos de sangre, pero algunos estudios han detectado el parásito en donantes de sangre sanos (le Fichoux *et al.*, 1999; Riera *et al.*, 2004) y en un banco de sangre canino (Tabar *et al.*, 2008). La transmisión vertical es posible en humanos (Meinecke *et al.*, 1999) y se ha observado en perros infectados de forma experimental (Rosypal *et al.*, 2005) y natural (Gibson-Corley *et al.*, 2008). Recientemente se ha demostrado también la posibilidad de la transmisión venérea de la enfermedad (Silva *et al.*, 2009). Finalmente, la transmisión del parásito podría estar ocurriendo mediante otros vectores, como *Rhipicephalus sanguineus* (Coutinho *et al.*, 2005) o *Ctenocephalides felis* (Ferreira *et al.*, 2009) y también mediante fómites como en el caso del uso compartido de jeringuillas entre la población toxicómana usuaria de drogas intravenosas (Cruz *et al.*, 2002).

Figura 2. Ciclo de transmisión de *Leishmania*

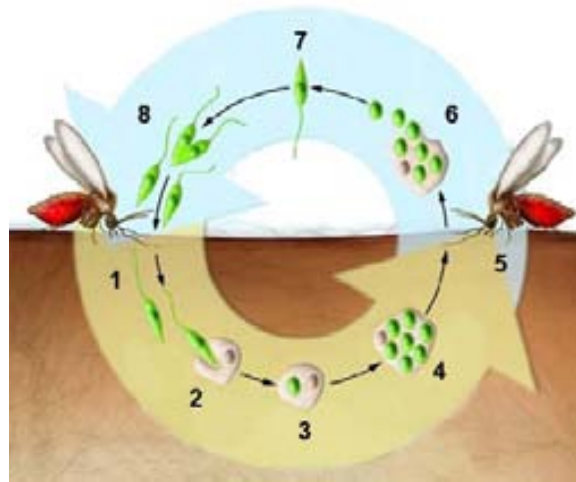


Figura extraída y modificada de Stuart *et al.*, 2008

4. EL PERRO COMO RESERVORIO

El perro es el principal reservorio peridoméstico de la VL zoonótica (ZVL) causada por *L. infantum*. Otros cánidos salvajes como el lobo, el zorro y el chacal también pueden ser infectados por el parásito (Alvar *et al.*, 2004). El papel de estas especies en la epidemiología del parásito es objeto de debate, pero estudios recientes sugieren que es posible el mantenimiento de un ciclo selvático independiente del perro (Gomes *et al.*, 2007b; Sobrino *et al.*, 2008). La infección por *L. infantum* se ha descrito también en otras especies como la rata (Bettini *et al.*, 1978), el gato (Mancianti, 2004) o el caballo (Solano-Gallego *et al.*, 2003a).

La ZVL causada por *L. infantum* ocurre en América Central y América del Sur (especialmente en Brasil), en Asia y en países costeros del Mediterráneo. Recientemente se han descrito casos en áreas no endémicas, como ha sucedido en el norte de Europa (Baldelli *et al.*, 2001; Capelli *et al.*, 2004; Dereure *et al.*, 2009) y en América del Norte (Enserink, 2000). En algunos casos, los perros podrían haberse infectado en viajes a zonas endémicas (Mettler *et al.*, 2005b; Shaw *et al.*, 2009) pero en otros la infección fue debida a la aparición de un foco endémico autóctono (Anderson *et al.*, 1980; Schantz *et al.*, 2005).

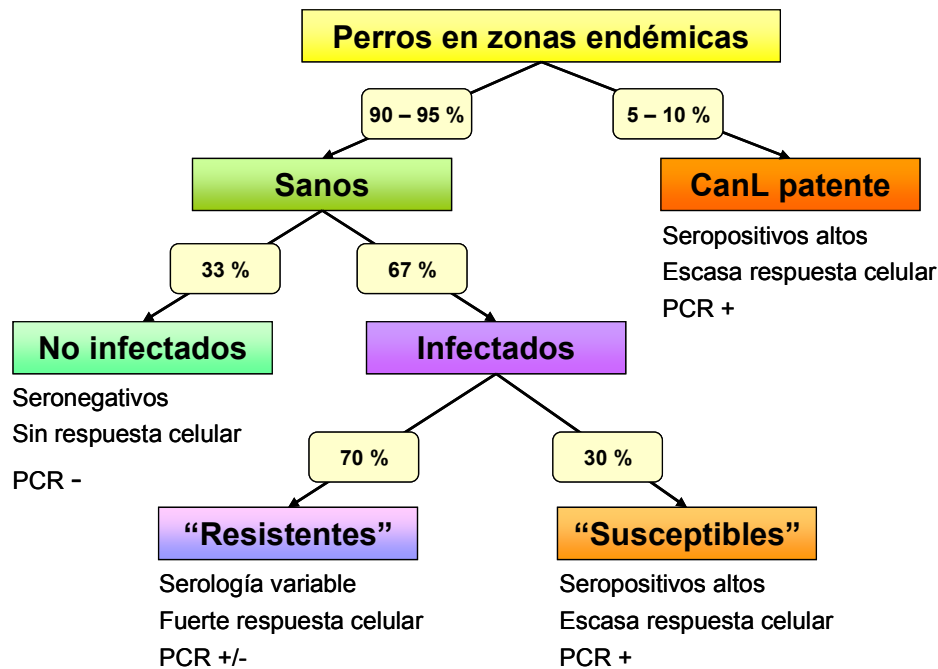
Alrededor de la cuenca mediterránea, el parásito aparece distribuido en focos endémicos. La prevalencia de la infección estimada únicamente en base a la serología, obtiene tasas de entre un 2% y un 30% en los perros (Fisa *et al.*, 1999; Sideris *et al.*, 1999; Solano-Gallego *et al.*, 2001b; Cardoso *et al.*, 2004; Papadopoulou *et al.*, 2005). No obstante, el estudio de la respuesta celular

específica *in vivo* o *in vitro* y de la presencia del parásito mediante PCR incrementa de manera considerable la estimación de la tasa de infección, que llega a ser del 67 % al 80 % en algunas ecorregiones alrededor del Mediterráneo (Berrahal *et al.*, 1996; Cardoso *et al.*, 1998; Solano-Gallego *et al.*, 2000; Solano-Gallego *et al.*, 2001b). En cuanto a la incidencia, se calcula que aproximadamente un 3 %–10 % de los perros se infectan en cada periodo de transmisión en las áreas rurales o semirurales (Amela *et al.*, 1995; Paradies *et al.*, 2006).

Los perros infectados por *L. infantum* no necesariamente desarrollan la enfermedad. La mayoría de individuos infectados permanecen clínicamente sanos durante años (Acedo-Sanchez *et al.*, 1998; Fisa *et al.*, 1999). Sin embargo, en un 5 %–10 % de los perros la infección progresa y aparecen los signos clínicos de la enfermedad conocida como leishmaniosis canina (CanL) (Fisa *et al.*, 1999; Natami *et al.*, 2000; Solano-Gallego *et al.*, 2001b; Cardoso *et al.*, 2004), los cuales pueden agravarse con el tiempo y en ausencia de tratamiento acabar provocando la muerte (Alvar *et al.*, 2004). De esta manera, la enfermedad supone sólo una pequeña proporción de la verdadera infección por *Leishmania*. La Figura 3 muestra la distribución de la infección, enfermedad y respuestas inmunitarias en un foco endémico.

Como ocurre en los humanos, existen diversos factores propios del perro que pueden aumentar el riesgo de que éste desarrolle la enfermedad. La edad parece ser un factor importante ya que se detecta una distribución bimodal de prevalencia de la enfermedad: en edades tempranas hasta los 3–4 años y a partir de los 7–8 años (Amela *et al.*, 1995; Miranda *et al.*, 2008). Algunos estudios apuntan a que el sexo no es un factor influyente (Abranches *et al.*, 1991b; Solano-Gallego *et al.*, 2006), pero otros indican que podría haber una prevalencia mayor en los machos (Zaffaroni *et al.*, 1999; Dantas-Torres *et al.*, 2006). La base genética de los animales puede afectar de manera importante al desarrollo de la enfermedad, y aunque todas las razas pueden llegar a sufrir la CanL en algunas se ha descrito una prevalencia de la enfermedad anormalmente elevada, como en el boxer, el cocker, el rottweiler, el doberman y el pastor alemán (Abranches *et al.*, 1991b; Franca-Silva *et al.*, 2003; Miranda *et al.*, 2008), mientras que otras razas parecen ser resistentes a la CanL, como el podenco ibicenco (Solano-Gallego *et al.*, 2000). Dado que un factor de riesgo importante es la vida al aire libre (Solano-Gallego *et al.*, 2006) que aumenta en un 70 % las probabilidades de infección (Amela *et al.*, 1995), no se puede descartar que exista un sesgo en la estimación de la susceptibilidad de la raza y del género en la CanL. Por otra parte, los perros de raza pura parecen ser más susceptibles a desarrollar la enfermedad que los mestizos, y los de pelo corto tienen mayor incidencia que los de pelo largo (Franca-Silva *et al.*, 2003). Algunos polimorfismos de los genes *SCL11A1* y *MHC* (Complejo Mayor de Histocompatibilidad) parecen estar involucrados en la susceptibilidad a sufrir la enfermedad (Quinnell *et al.*, 2003b; Sanchez-Robert *et al.*, 2008b).

Figura 3. Distribución de la enfermedad, respuestas inmunológicas e infección por *Leishmania* en un foco endémico



Información extraída de: Solano-Gallego *et al.*, 2009. En los perros "resistentes" se considera improbable el desarrollo de la CanL, contrariamente a los "susceptibles" donde se considera probable.

Los estudios demuestran que tanto los perros enfermos como los clínicamente sanos infectados por *L. infantum* en Europa son infectivos para el vector *P. perniciosus* (Alvar *et al.*, 1994; Molina *et al.*, 1994; Guarga *et al.*, 2000) y por tanto, suponen un riesgo de infección para los humanos y otros perros. Sin embargo, la mejora clínica post-tratamiento da lugar a una disminución de la infectividad sugiriendo una correlación con el estado clínico del animal (Gradoni *et al.*, 1987; Alvar *et al.*, 1994; Guarga *et al.*, 2002). Los estudios realizados en Sudamérica demuestran una clara diferencia en el grado de infectividad para el vector *Lu. longipalpis* entre los perros infectados sin signos clínicos y los enfermos (Travi *et al.*, 2001; Michalsky *et al.*, 2007; Vercosa *et al.*, 2008). Tres hipótesis podrían justificar estas diferencias entre la infectividad a *P. perniciosus* y a *Lu. longipalpis*: 1) que el umbral infectivo de *P. perniciosus* sea más bajo que el de *Lu. longipalpis* y por lo tanto, incluso los individuos con menor carga parasitaria son capaces de infectarlo; o 2) que en Europa el mejor estado de nutrición de los perros permita la existencia de individuos sin signos clínicos con cargas parasitarias muy elevadas (Travi *et al.*, 2001); y 3) que el grado de seropositividad de los animales infectados clínicamente sanos incluidos en los estudios del área mediterránea afectase a su infectividad. De hecho, los niveles de anticuerpos específicos contra *Leishmania* se han correlacionado con el grado de infectividad a los flebotomos (Courtenay *et al.*, 2002; da Costa-Val *et al.*, 2007).

5. EL DESARROLLO DE LA INFECCIÓN Y DE LA RESPUESTA INMUNITARIA FRENTE A LAS ESPECIES VISCEROTRÓPICAS DE *LEISHMANIA*

5.1. El papel del vector

Cuando el vector hematófago pica a un hospedador vertebrado para alimentarse, introduce su aparato bucal en la piel del hospedador, lacerando el tejido y los capilares sanguíneos para crear un cúmulo de sangre del cual poder alimentarse (Ribeiro, 1995). En ese momento el vector inocula saliva, que contiene diversas sustancias que permitirán combatir las reacciones del hospedador y obtener sangre con mayor facilidad. El descubrimiento de que estas sustancias favorecen el establecimiento de la infección, otorgan al vector un papel fundamental en la leishmaniosis, el cual ha dejado de verse como una simple herramienta para la transmisión del parásito (Gillespie *et al.*, 2000; Andrade *et al.*, 2007). Diferentes efectos inmunomoduladores e inmunosupresores relacionados con la saliva del vector se recogen en la Tabla 2.

Tabla 2. Efectos relacionados con componentes salivares de *Phlebotomus* spp. y *Lutzomyia* spp.

Efecto	Referencias
Exacerbación de la enfermedad (ratón)	Titus y Ribeiro, 1988; Donnelly <i>et al.</i> , 1998; Mbow <i>et al.</i> , 1998; Morris <i>et al.</i> , 2001; Norsworthy <i>et al.</i> , 2004; Oliveira <i>et al.</i> , 2008; Volfova <i>et al.</i> , 2008
Reclutamiento de células inflamatorias en el sitio de inoculación	Anjili <i>et al.</i> , 1995; Zer <i>et al.</i> , 2001; Teixeira <i>et al.</i> , 2005; Peters <i>et al.</i> , 2008
Inhibición del sistema de complemento	Cavalcante <i>et al.</i> , 2003
Inhibición de la reacción de hipersensibilidad retardada (DTH)	Qureshi <i>et al.</i> , 1996
Inhibición de la activación de células T	Theodos y Titus, 1993; Qureshi <i>et al.</i> , 1996
Inhibición de la producción de citocinas producidas por los linfocitos T colaboradores (T _h) de tipo 1 (interferón (IFN) γ , interleucina (IL)12, factor de necrosis tumoral (TNF) α	Bozza <i>et al.</i> , 1998; Mbow <i>et al.</i> , 1998; Soares <i>et al.</i> , 1998
Inducción de la producción de citocinas T _h 2 (IL-4, IL-6, IL-10)	Mbow <i>et al.</i> , 1998, Norsworthy <i>et al.</i> , 2004; Menezes <i>et al.</i> , 2008
Inhibición de la producción de NO por los macrófagos	Hall y Titus, 1995; Mbow <i>et al.</i> , 1998; Katz <i>et al.</i> , 2000; Norsworthy <i>et al.</i> , 2004
Modulación de moléculas coestimuladoras en los monocitos	Menezes <i>et al.</i> , 2008

Se ha descrito que los individuos residentes en zonas no endémicas de *Leishmania* tienen más probabilidades de infectarse al viajar a zonas endémicas que los individuos autóctonos (Andrade

et al., 2007). Los individuos de zonas endémicas desarrollan con frecuencia anticuerpos contra *Lu. longipalpis* (Barral *et al.*, 2000), y los niveles de estos anticuerpos se han correlacionado significativamente con la respuesta celular contra *L. infantum* (Barral *et al.*, 2000; Gomes *et al.*, 2002). Estos resultados sugieren que el desarrollo de una respuesta inmune contra las proteínas salivares del vector se acompaña de una respuesta celular protectora contra el parásito, hecho que ha sido demostrado en roedores (Kamhawi *et al.*, 2000; Valenzuela *et al.*, 2001; Gomes *et al.*, 2008). Recientemente también se ha descrito la presencia de estos anticuerpos en perros (Bahia *et al.*, 2007) y su correlación con la intensidad de exposición al vector (Hostomska *et al.*, 2008).

5.2. Primeros pasos de la infección: respuesta innata

Las células de la piel —células dendríticas, macrófagos y linfocitos T $\gamma\delta$ — provistas de receptores fagocíticos y de receptores de tipo Toll (TLR) inician la respuesta inmunitaria innata tras reconocer patrones moleculares conservados (PAMP) en *Leishmania*. En general, las moléculas reconocidas son componentes de la membrana o componentes internos como DNA, RNA, enzimas o proteínas específicos de los patógenos y ausentes en el huésped (Janeway y Medzhitov, 2002; Tuon *et al.*, 2008). Debido a que los parásitos son también organismos eucariotas, los TLR que reconocen PAMP parasitarios presentan un umbral de activación superior a los que reconocen a otros patógenos como bacterias y virus, de manera que el huésped infectado en vez de presentar episodios agudos puede llegar a soportar altas cargas parasitarias hasta que se activa su respuesta innata (Gazzinelli y Denkers, 2006). Estas células activadas producen entonces una cascada de quimiocinas que inducen el reclutamiento de neutrófilos, macrófagos y células “natural killer” (NK) (Teixeira *et al.*, 2006), las cuales iniciarán la cascada de la respuesta inmunitaria innata para combatir los parásitos en el lugar de infección. La resistencia a la enfermedad podría depender de las quimiocinas y células reclutadas durante las primeras fases de la infección.

La invasión del macrófago es fundamental para la supervivencia de los parásitos ya que aquellos que no consiguen invadir las células diana son rápidamente destruidos por el sistema del complemento (de Almeida *et al.*, 2003), neutrófilos y células NK (Pimenta *et al.*, 1987). Los neutrófilos infectados pueden destruir los parásitos o bien ser fagocitados por los macrófagos, sirviendo de puerta de entrada a esta célula diana (de Almeida *et al.*, 2003; van Zandbergen *et al.*, 2004). Una vez alcanzado el macrófago, los parásitos son englobados en un fagosoma, que tras la maduración y la fusión con lisosomas y endosomas formará una vacuola parasitófora (Antoine *et al.*, 1998). En su interior, *Leishmania* es capaz de sobrevivir y multiplicarse gracias al desarrollo de mecanismos de evasión de la respuesta inmune (Sacks y Sher, 2002). A pesar de que los promastigotes pueden infectar otras células, como los fibroblastos y las células dendríticas, no hay evidencias de replicación en células diferentes al macrófago (Peters y Sacks, 2006).

Las células dendríticas activadas a través de los receptores TLR producen interleucina (IL) 12, una citocina proinflamatoria necesaria para activar las células NK (Liese *et al.*, 2007; Schleicher *et al.*, 2007). Las células NK juegan un papel muy importante en las primeras fases de la infección, debido a su actividad citotóxica y a su producción de interferón (IFN) γ necesario para activar la respuesta de los linfocitos T colaboradores (T_h) de tipo 1 en el ganglio linfático (Muller *et al.*, 2001; Martin-Fontecha *et al.*, 2004). Mientras, las células dendríticas infectadas migrarán al ganglio linfático regional donde ejercerán de células presentadoras de antígeno para los linfocitos T inmaduros e iniciarán la respuesta inmunitaria adaptativa. Las células T activadas migrarán después a la lesión, donde los macrófagos y células dendríticas parasitadas regularán su función.

Las quimiocinas parecen participar también en la amplificación de la respuesta inflamatoria iniciada por las células T. Durante la VL murina, el patrón de quimiocinas observado en el bazo podría estar favoreciendo la persistencia de la infección, al atraer prioritariamente macrófagos en lugar de linfocitos T (Liese *et al.*, 2008). Recientemente, la intervención de las quimiocinas durante la CanL se ha comenzado a estudiar en el bazo de perros infectados con *L. infantum* donde se ha descrito la presencia de quimiocinas capaces de reclutar tanto macrófagos como linfocitos T (Strauss-Ayali *et al.*, 2007).

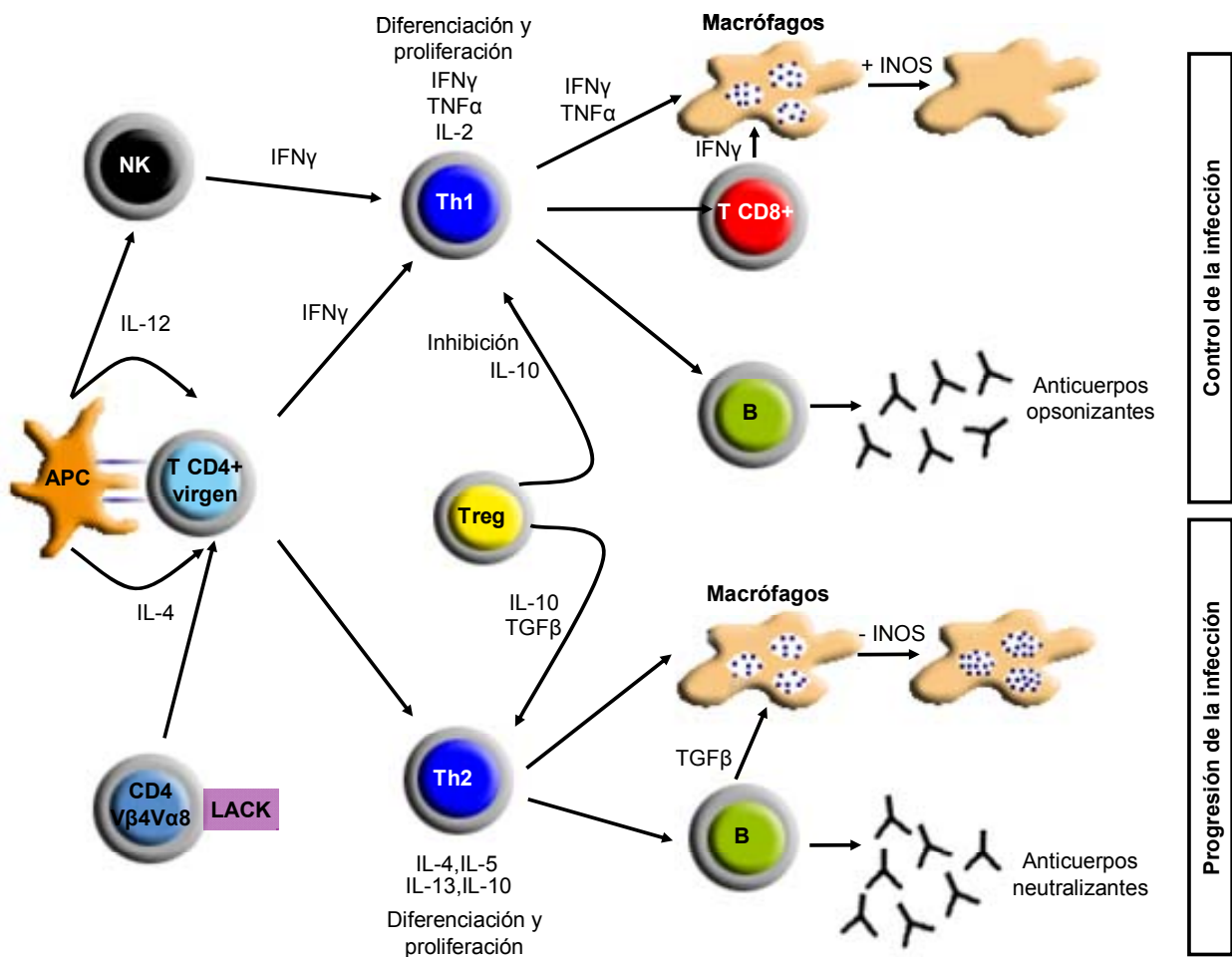
5.3. Respuesta adquirida

El modelo más estudiado de leishmaniosis es el de CL causada por *L. major* en ratón (Figura 4). En este modelo se ha aceptado durante muchos años la existencia de una dicotomía en las respuestas tipo T_h1 o T_h2 asociadas a la resistencia o susceptibilidad a la enfermedad, respectivamente. La producción de IL-4 responsable del desarrollo de la respuesta T_h2 en los ratones susceptibles se debe específicamente a la estimulación de linfocitos T CD4+ que reconocen el antígeno LACK a través del receptor $V\beta4V\alpha8$ TCR (Launois *et al.*, 1997). No obstante, este hecho sólo justifica la susceptibilidad para una especie de ratón (BALB/c) y un modelo concreto de la enfermedad (CL murina causada por *L. major*) (Julia y Glaichenhaus, 1999; Stetson *et al.*, 2002).

Sin embargo, lo que se consideraba una clara dicotomía T_h1/T_h2 parece ser en realidad una simplificación de una entramada red de interacciones inmunológicas (Alexander y Bryson, 2005). El control del parásito, tanto en la forma cutánea como en la visceral, se asocia a una respuesta de tipo T_h1 (Alexander *et al.*, 1999), pero el papel perjudicial de la respuesta T_h2 está siendo discutido. El papel protector de citocinas como la IL-4 (Carter *et al.*, 1989; Biedermann *et al.*, 2001; Stager *et al.*, 2003), o la IL-13 (Mohrs *et al.*, 1999) sugiere la existencia de mecanismos inmunológicos hasta ahora desconocidos en el control de la infección por *Leishmania*.

En realidad, el fallo en el control de la infección podría deberse a la intervención de un mecanismo inmunosupresor mediado por los linfocitos T reguladores (T_{reg}), más que a una dominancia T_h2 o a una falta de respuesta T_h1 . Estas subpoblaciones de linfocitos T $CD4^+$ expresan el factor de crecimiento transformante (TGF) β y/o IL-10, limitando la magnitud de la respuesta inmunológica efectora de las células T $CD4^+$ y promoviendo por otro lado la supervivencia de las células B y su diferenciación en células plasmáticas (Nylen y Sacks, 2007). Cabe destacar que en el modelo de CL en el ratón, estas células también median la protección contra la reinfección por *Leishmania*, impidiendo que las células T $CD4^+$ efectoras eliminen completamente el parásito en ciertos tejidos como la piel y manteniendo así la inmunidad (Belkaid *et al.*, 2002).

Figura 4. Respuestas inmunológicas de control o progresión de la enfermedad en la infección por *L. major* en ratón



6. LA INFECCIÓN Y LA RESPUESTA INMUNITARIA EN EL PERRO

Los perros infectados por *L. infantum* pueden desarrollar un amplio espectro de respuestas inmunitarias, desde una fuerte respuesta humoral con elevados niveles de anticuerpos específicos y una escasa o nula respuesta celular, que se relaciona con la susceptibilidad; hasta una potente respuesta celular, que se asocia con la protección (Pinelli *et al.*, 1994b; Barbieri, 2006; Baneth *et al.*, 2008; Solano-Gallego *et al.*, 2009) (Figura 3).

6.1. Respuesta humoral

La CanL se caracteriza por una hipergamaglobulinemia y un aumento en las concentraciones de anticuerpos específicos contra el parásito (Martinez-Moreno *et al.*, 1995; Alvar *et al.*, 2004). Las concentraciones de anticuerpos específicos son superiores en los perros infectados enfermos que en los clínicamente sanos (Bourdoiseau *et al.*, 1997a; Leandro *et al.*, 2001; Solano-Gallego *et al.*, 2001c) y se correlacionan con la parasitemia, con la densidad de parásitos en los tejidos, y con el estado clínico del animal (Reis *et al.*, 2006a; Rodriguez-Cortes *et al.*, 2007b).

La principal inmunoglobulina producida durante la CanL es la IgG específica, que aparece entre 1 y 4 meses post-infección (Abranches *et al.*, 1991a; Martinez-Moreno *et al.*, 1995; Quinnell *et al.*, 1997; Riera *et al.*, 1999). La mejora clínica asociada al tratamiento se correlaciona con una disminución de las concentraciones de IgG anti-*Leishmania*, aunque raramente se produce una serorreversión completa ya que la presencia de IgG se mantiene durante largos períodos de tiempo (Riera *et al.*, 1999; Koutinas *et al.*, 2001). Diversos estudios han intentado correlacionar las concentraciones de IgG1 e IgG2 con la resistencia o susceptibilidad a la enfermedad, asociándolos a un tipo de respuesta T_{h2} o T_{h1} respectivamente, pero los resultados obtenidos han sido contradictorios (Deplazes *et al.*, 1995; Bourdoiseau *et al.*, 1997a; Solano-Gallego *et al.*, 2001c). La causa es probablemente una falta de especificidad de los anticuerpos comerciales empleados (Day, 2007). Así, el uso de anticuerpos monoclonales ha puesto de manifiesto que tanto la IgG1 como la IgG2 son producidas en los animales infectados sin mostrar asociación con la resistencia o la susceptibilidad a la enfermedad (Quinnell *et al.*, 2003a).

La presencia de otros isotipos de anticuerpos específicos contra *Leishmania* ha sido estudiada más recientemente. Se han detectado elevadas concentraciones de IgA e IgM anti-*Leishmania* específicas en perros enfermos; mientras el 64 % de los perros enfermos producen los tres isotipos IgG, IgA e IgM, sólo el 8 % de los perros clínicamente sanos los producen (Rodriguez-Cortes *et al.*, 2007a). Los isotipos IgG e IgA se han propuesto como las mejores herramientas para el diagnóstico de los perros enfermos debido a su correlación con el cuadro clínico del animal

y con la carga parasitaria (Reis *et al.*, 2006c; Rodríguez-Cortes *et al.*, 2007b). También las concentraciones de IgE específica anti-*Leishmania* se han correlacionado con la enfermedad (Almeida *et al.*, 2005; Iniesta *et al.*, 2005).

6.2. Respuesta celular

La resistencia a la infección por *L. infantum* se ha asociado al desarrollo de una respuesta celular protectora, que se manifiesta *in vivo* por un test intradérmico de leishmanina (LST) positivo e *in vitro* por proliferación específica de los linfocitos T (Cabral *et al.*, 1992; Pinelli *et al.*, 1994b; Moreno *et al.*, 1999). La mayoría de los perros infectados parecen desarrollar esta respuesta celular en fases tempranas de la infección (Rodríguez-Cortes *et al.*, 2007b; Baneth *et al.*, 2008). Sin embargo a medida que la enfermedad avanza se produce una inmunosupresión que provoca la pérdida de la respuesta mediada por células T (Pinelli *et al.*, 1994b; Martínez-Moreno *et al.*, 1995; Dos-Santos *et al.*, 2008). Las causas de esta inmunosupresión se desconocen, pero factores como la reducción de los niveles de linfocitos T CD4⁺ (Bourdoiseau *et al.*, 1997b; Moreno *et al.*, 1999; Reis *et al.*, 2009), la disminución de la expresión de moléculas coestimuladoras (Pinelli *et al.*, 1999) o la participación de linfocitos T_{reg} (Rodrigues *et al.*, 2009) podrían estar involucrados. La población de linfocitos T CD4⁺ está claramente implicada en la protección frente a la enfermedad (Barbieri, 2006; Baneth *et al.*, 2008) y el tratamiento de la CanL induce una mejora del estado clínico del animal asociada a la recuperación de los niveles de linfocitos T CD4⁺ (Moreno *et al.*, 1999; Guarga *et al.*, 2002). Por otro lado, la población de linfocitos T CD8⁺ también parece participar frente a la infección por *Leishmania* mediante la lisis de macrófagos infectados (Pinelli *et al.*, 1994a). Los perros infectados sin signos clínicos muestran un aumento significativo de los niveles de linfocitos T CD8⁺ respecto a los perros enfermos y los no infectados, y los niveles de esta población se encuentran inversamente correlacionados con el estado clínico y la carga parasitaria del animal (Reis *et al.*, 2006b).

La infección por *Leishmania* en el perro no manifiesta una clara dicotomía en el perfil de citocinas producido como ocurre en el modelo murino de *L. major*, sino que se detecta un patrón mixto T_h1 y T_h2 (Quinnell *et al.*, 2001b; Strauss-Ayali *et al.*, 2007), siendo el equilibrio entre estas dos respuestas el que posiblemente determina el resultado final de la infección (Baneth *et al.*, 2008; Carrillo y Moreno, 2009). En los perros infectados sin signos clínicos o en aquellos en los que la vacunación ha inducido protección, los PBMC estimulados *in vitro* presentan cierta tendencia hacia un patrón de citocinas T_h1, con producción de IFN- γ , IL-2 y TNF- α (Pinelli *et al.*, 1994b; Santos-Gomes *et al.*, 2002; Chamizo *et al.*, 2005; Lemesre *et al.*, 2005; Strauss-Ayali *et al.*, 2005; Carrillo *et al.*, 2007; Carrillo *et al.*, 2008). Estas citocinas, de las cuales el IFN- γ parece ser la citocina clave (Carrillo y Moreno, 2009), estimulan la actividad leishmanicida de los macrófagos

infectados mediante la producción de NO (Pinelli *et al.*, 2000; Holzmuller *et al.*, 2006). Algunos estudios también sugieren la participación de IL-18 en el control de la infección (Chamizo *et al.*, 2005; Manna *et al.*, 2006).

En los perros enfermos se observa un patrón mixto de citocinas T_H1 y T_H2 sin la existencia de un perfil definido. Los PBMC de los perros oligosintomáticos producen IFN- γ , aunque en niveles menores a los de los perros sin signos clínicos. Sin embargo, los polisintomáticos con enfermedad avanzada no son capaces de producir esta citocina (Strauss-Ayali *et al.*, 2005; Carrillo *et al.*, 2008). También los niveles de TNF- α producidos por los linfocitos de perros enfermos son menores que los producidos por perros infectados clínicamente sanos (Pinelli *et al.*, 1994b; Carrillo *et al.*, 2008). En los pacientes humanos con VL se han detectado niveles elevados de la citocina inmunosupresora IL-10 tanto en el suero como en los tejidos, la cual ha sido relacionada claramente con el desarrollo de la enfermedad (Nylen y Sacks, 2007). Sin embargo, los PBMC de perros enfermos no parecen producir niveles relevantes de IL-10 (Santos-Gomes *et al.*, 2002; Manna *et al.*, 2006), aunque otras citocinas consideradas inmunosupresoras como IL-4 e IL-13 podrían estar involucradas en la enfermedad (Sanchez-Robert *et al.*, 2008a).

La incapacidad de controlar el parásito en los tejidos parece no ser debida a la falta de una respuesta T_H1 (Quinnell *et al.*, 2001b; Correa *et al.*, 2007; Lage *et al.*, 2007; Strauss-Ayali *et al.*, 2007), sino más bien a la inhibición de esta respuesta (Correa *et al.*, 2007). Estudios recientes sugieren que la respuesta inmunológica frente a la infección por *L. infantum* en el perro puede ser compartimental y variar en función del órgano (Sanchez *et al.*, 2004), como se ha descrito en la VL en ratón (Engwerda y Kaye, 2000). Las citocinas IL-10 y TGF- β podrían ser las causantes de la persistencia del parásito en el bazo (Correa *et al.*, 2007; Lage *et al.*, 2007) y en el ganglio linfático (Alves *et al.*, 2009). La IL-10 también podría tener un papel agravante de la infección en el hígado (Correa *et al.*, 2007). En cambio, la IL-4 podría estar favoreciendo la infección en la médula ósea (Quinnell *et al.*, 2001b) y en la piel (Brachelente *et al.*, 2005).

El objetivo final de la respuesta inmunológica es activar al macrófago para eliminar el parásito. El NO, sintetizado a partir de la L-arginina, es la principal molécula involucrada en la actividad leishmanicida del macrófago, induciendo la apoptosis de los amastigotes intracelulares (Holzmuller *et al.*, 2006). Ciertas citocinas, como el IFN- γ y el TNF- α , activan la isoforma inducible de la sintasa de NO (iNOS) del macrófago (Pinelli *et al.*, 2000; Sisto *et al.*, 2001; Rodrigues *et al.*, 2007). El nivel de expresión de iNOS (Zafra *et al.*, 2008) y la concentración de NO producida por los macrófagos (Pinelli *et al.*, 2000; Panaro *et al.*, 2001; Rodrigues *et al.*, 2007) se ha correlacionado con la capacidad leishmanicida de estas células. La participación del NO parece ser necesaria para la resistencia a largo plazo en los perros infectados de forma natural (Panaro *et*

et al., 2008). Es más, la mejora clínica inducida por el tratamiento se correlaciona con el incremento de la actividad leishmanicida mediada por NO (Vouldoukis *et al.*, 1996; Bianciardi *et al.*, 2004). No obstante, al igual que ocurre con la respuesta celular (Baneth *et al.*, 2008), la producción de NO se detecta en las primeras fases de infección de los perros enfermos sin que este hecho indique resistencia al parásito (Panaro *et al.*, 2008). Debido a la importancia de esta molécula en la protección frente a *L. infantum*, la determinación de la producción de NO por parte de los macrófagos procedentes de animales vacunados constituye una herramienta muy útil para evaluar la inmunogenicidad de vacunas frente a la leishmaniosis (Panaro *et al.*, 2001; Holzmüller *et al.*, 2005; Giunchetti *et al.*, 2007; Lemesre *et al.*, 2007; Araujo *et al.*, 2009).

7. PATOGENIA DE LA LEISHMANIOSIS CANINA

La leishmaniosis es una enfermedad sistémica que afecta a diferentes órganos del animal infectado. El parásito es inoculado en la piel del hospedador, donde invade los macrófagos. Desde allí es transportado por sangre o linfa a los ganglios linfáticos y al bazo, y posteriormente se extiende a órganos como el hígado y los riñones. Finalmente, el parásito llega a otras localizaciones como la piel, la médula ósea, los ojos, las articulaciones, el aparato digestivo, respiratorio y los órganos sexuales (Alvar *et al.*, 2004; Miro *et al.*, 2008). Las lesiones que se producen a causa de la infección son el resultado de los numerosos mecanismos patogénicos que participan en esta enfermedad y de las diferentes respuestas inmunitarias de los individuos (Ferrer, 1992).

Los ganglios linfáticos de los perros infectados sufren hiperplasia, debida por una parte al aumento en el tamaño y el número de los folículos linfoides y por otra a la hiperplasia de los macrófagos medulares (Keenan *et al.*, 1984; Lima *et al.*, 2004). La cápsula disminuye su grosor, y se observan macrófagos infectados y una reacción inflamatoria subcapsular. En las áreas medulares se observan además de los macrófagos, abundantes células plasmáticas y linfocitos. Las alteraciones histológicas de los ganglios linfáticos son más frecuentes y el parasitismo más intenso en los animales enfermos que en los clínicamente sanos (Lima *et al.*, 2004, Mylonakis *et al.*, 2005, Manna *et al.*, 2006; Manna *et al.*, 2009; Alves *et al.*, 2009), pero no se ha detectado correlación entre estos dos parámetros.

El bazo juega un papel muy importante en la VL ya que es un punto clave de interacción entre el sistema inmunológico y el parásito. Durante la CanL se produce una esplenomegalia acompañada por un incremento del número de células plasmáticas y de macrófagos parasitados en este órgano (Natami *et al.*, 2000; Santana *et al.*, 2008). En animales infectados de forma natural y susceptibles

al parásito, se observan diferentes alteraciones esplénicas, tales como periesplenitis, hiperplasia de las células plasmáticas de los folículos o disminución del número y atrofia de los folículos linfoides con una reducción de su centro germinal, escasez de linfocitos en la vaina periarterial, desorganización de la microestructura de la pulpa blanca y reducción de la zona marginal donde se observa un intenso parasitismo. Estas alteraciones son significativamente más frecuentes en los perros enfermos (Tafuri *et al.*, 2001; Santana *et al.*, 2008) pero se detectan también en los clínicamente sanos (Sanchez *et al.*, 2004). La desorganización estructural podría ser la causa de la esplenomegalia y la congestión del bazo, ya que los cambios que se producen a nivel vascular producirían una ralentización de la circulación esplénica cuya función sería la de retener células del sistema inmunológico durante el tiempo suficiente para destruir el parásito (Alexandre-Pires *et al.*, 2006). También se ha descrito la proliferación de las fibras reticulares y de las células endoteliales en animales infectados (Alvar *et al.*, 2004; Alexandre-Pires *et al.*, 2006). El hecho de observar numerosos macrófagos formando estructuras granulomatosas en la pulpa roja de los animales susceptibles o enfermos (Tafuri *et al.*, 2001; Santana *et al.*, 2008), indicaría que dichos granulomas no son efectivos y no consiguen eliminar el parásito (Murray, 2001). La mayor proporción de linfocitos T CD4+ y CD44+ en el bazo de los perros sanos respecto al de los enfermos sugiere que en los perros capaces de controlar el parásito se produce una activación de células T de memoria en el bazo que luego son capaces de migrar a otros órganos (Sanchez *et al.*, 2004).

El perro infectado puede presentar hepatomegalia causada por congestión y hepatitis crónica (Giunchetti *et al.*, 2008b). Microscópicamente, el hígado de los perros infectados por *Leishmania* que no manifiestan signos clínicos presenta diferencias respecto al de los perros enfermos. En los perros clínicamente sanos se observa una organización granulomatosa intralobular, compuesta por células de Kupffer, linfocitos T activados y células dendríticas (Oliveira *et al.*, 1993; Sanchez *et al.*, 2004; Giunchetti *et al.*, 2008b), en la cual parece desarrollarse una respuesta celular efectora y de memoria capaz de controlar la multiplicación del parásito, aunque no de eliminarlo completamente (Sanchez *et al.*, 2004). En cambio, en los perros enfermos se observa inflamación de la cápsula y del espacio porta, con presencia de histiocitos, linfocitos y células plasmáticas (Giunchetti *et al.*, 2008b) y un infiltrado inflamatorio desorganizado, con células de Kupffer hiperplásicas infectadas y dispersas, células plasmáticas y una elevada proporción de células T no activadas (Sanchez *et al.*, 2004). A medida que progresa la infección se produce una fibrosis hepática con mayores depósitos de colágeno en los perros enfermos que en los clínicamente sanos (Melo *et al.*, 2008) y se observa una degradación de los hepatocitos que comporta una pérdida de la función hepática (Gonzalez *et al.*, 1988).

Las lesiones renales se atribuyen al depósito de inmunocomplejos (Benderitter *et al.*, 1988; Poli *et al.*, 1991), aunque también se ha sugerido que los linfocitos T CD4+ pueden tener un papel en la patogenia renal (Costa *et al.*, 2000). La afectación renal es habitual incluso en perros sin signos clínicos (Costa *et al.*, 2003), siendo las alteraciones glomerulares las más frecuentes, seguidas de las alteraciones tubulares e intersticiales (Costa *et al.*, 2003; Poli *et al.*, 1991; Zatelli *et al.*, 2003). La lesión renal más descrita en la CanL es la glomerulonefritis, aunque también se han descrito otras como la glomeruloesclerosis, la nefritis intersticial y la amiloidosis (Benderitter *et al.*, 1988; Nieto *et al.*, 1992; Koutinas *et al.*, 1999; Poli *et al.*, 1991; Costa *et al.*, 2003). La insuficiencia renal que aparece tras el deterioro del riñón es la causa más frecuente de muerte en los perros con CanL (Benderitter *et al.*, 1988; Poli *et al.*, 1991; Ferrer, 1992), pudiendo ser incluso el único signo que se detecta y causando la muerte del animal por fallo renal grave (Ciaramella *et al.*, 1997).

Las lesiones cutáneas son el signo clínico más frecuente en la CanL. Se han descrito diversos tipos de lesiones en la piel, tales como las exfoliativas, nodulares, ulcerativas, o postulares (Baneth *et al.*, 2008), asociándose las exfoliativas a un cierto control del parasitismo y las nodulares a un descontrol de la infección (Fondevila *et al.*, 1997). Los perros infectados enfermos presentan un gran número de parásitos en la piel (Giunchetti *et al.*, 2006; Vercosa *et al.*, 2008), hecho que se observa incluso en aquellas zonas de piel sin lesiones macroscópicas (Solano-Gallego *et al.*, 2004), al contrario que en los perros infectados clínicamente sanos en los que en ocasiones no se observa la presencia del parásito (Solano-Gallego *et al.*, 2004). La observación del parásito en la piel se asocia siempre a la presencia de un infiltrado inflamatorio (dos-Santos *et al.*, 2004; Solano-Gallego *et al.*, 2004; Vercosa *et al.*, 2008) el cual se intensifica en los casos en los que el cuadro clínico es más grave (Giunchetti *et al.*, 2006). Este infiltrado está compuesto de macrófagos, células plasmáticas, linfocitos y también neutrófilos en los casos de elevado parasitismo (Solano-Gallego *et al.*, 2004; Giunchetti *et al.*, 2006; Vercosa *et al.*, 2008). A medida que se cronifica la inflamación hay una disminución del colágeno tipo I y un aumento del colágeno tipo III, que refleja cambios estructurales en la matriz extracelular causados por la progresiva destrucción del tejido sano (Giunchetti *et al.*, 2006).

8. DIAGNÓSTICO DE LA INFECCIÓN POR *L. INFANTUM* EN EL PERRO

8.1. Diagnóstico clínico

Los signos clínicos y su momento de aparición son muy variables. La manifestación de la enfermedad puede producirse desde unos pocos meses hasta más de 7 años posinfección (Slappendel, 1988; Sideris *et al.*, 1999), y los perros infectados pueden presentar desde una leve dermatitis papular hasta una grave glomerulonefritis. Sin embargo, hay que tener en cuenta que la

mayoría de los perros infectados por *L. infantum* no muestran signos clínicos de la enfermedad (Baneth *et al.*, 2008).

Generalmente el primer signo de enfermedad que aparece es una leve pero constante pérdida de peso acompañada de apatía. Más tarde suelen aparecer la linfadenopatía, las lesiones cutáneas y oculares, la atrofia muscular, los problemas locomotores y la palidez de mucosas (Alvar *et al.*, 2004; Baneth *et al.*, 2008). En estadios muy avanzados de la enfermedad el animal presenta caquexia y puede morir a causa del fallo renal o hepático. La Tabla 3 muestra la frecuencia de diferentes alteraciones físicas y bioquímicas en perros con leishmaniosis clínica.

Tabla 3. Porcentaje de aparición de diferentes signos clínicos en perros con leishmaniosis

Alteraciones físicas	Frecuencia	Alteraciones bioquímicas	Frecuencia
Lesiones cutáneas	57 %-89 %	Hiperproteinemia	49 %-73 %
Linfadenopatía	49 %-90 %	Hipoalbuminemia	32 %-60 %
Lesiones oculares	10 %-81 %	Hiperglobulinemia	58 %-78 %
Palidez de mucosas	10 %-58 %	Anemia	68 %-73 %
Esplenomegalia	10 %-53 %	Linfopenia	43 %
Caquexia	10 %-48 %	Trombocitopenia	48 %
Apatía	8 %-33 %	Incremento de ALT	16 %
Fiebre	4 %-36 %	Incremento de ALP	31 %
Epistaxis	6 %-10 %	Azotemia	24 %-38 %
Onicogriposis	8 %-45 %	Proteinuria	46 %-72 %
Cuadro gastrointestinal	4 %-13 %	Relación Albúmina/Globulinas < 0.59	63 %
Cojeras	3 %-16 %		

Información extraída de: Ciaramella *et al.*, 1997; Koutinas *et al.*, 1999; Koutinas *et al.*, 2001; Solano-Gallego *et al.*, 2001c; Baneth *et al.*, 2008.

8.2. Diagnóstico parasitológico

La infección por *Leishmania* puede diagnosticarse mediante la detección del parásito en muestras de sangre o de tejido. La citología y la histopatología constituyen un método de diagnóstico relativamente rápido, aunque de sensibilidad generalmente baja (30 %-70 %) (Bourdoiseau *et al.*, 1997c; Alvar *et al.*, 2004; Xavier *et al.*, 2006; Moreira *et al.*, 2007). El análisis inmunohistoquímico, que emplea anticuerpos específicos para el marcaje de los parásitos, mejora la sensibilidad de la histopatología (40 %-92 %) (Moreira *et al.*, 2007). Sin embargo, la sensibilidad de estas técnicas depende tanto del tejido como del estado clínico del animal (Alvar *et al.*, 2004) debido a las importantes diferencias existentes en la carga parasitaria entre los animales infectados enfermos y los infectados sanos (Sanchez *et al.*, 2004; Giunchetti *et al.*, 2006; Reis *et al.*, 2006a).

La detección de DNA del parásito mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) constituye un método sensible para el diagnóstico de la infección y puede realizarse en una gran variedad de muestras (Ashford *et al.*, 1995; Mathis y Deplazes, 1995; Fisa *et al.*, 2001; Solano-Gallego *et al.*, 2001b; Strauss-Ayali *et al.*, 2004; Maia *et al.*, 2009). Aunque existen diferentes genes diana, generalmente se amplifican fragmentos del DNA del cinetoplasto que aparecen repetidos en múltiples copias en el parásito, aumentando así la sensibilidad del procedimiento (Ashford *et al.*, 1995; Lachaud *et al.*, 2002), que alcanza valores del 95 %–100 % (Moreira *et al.*, 2007). La sensibilidad de la técnica varía según el tejido empleado (Maia y Campino, 2008). El ganglio linfático, la médula ósea y la piel son tejidos con los que se obtiene una elevada sensibilidad (Solano-Gallego *et al.*, 2001b; Manna *et al.*, 2004; Maia *et al.*, 2009). En cambio, la detección del parásito mediante PCR en sangre es un método adecuado para los perros con signos clínicos pero no para los perros clínicamente sanos, en los que el parásito se detecta con menor frecuencia (Manna *et al.*, 2004; Rodríguez-Cortés *et al.*, 2007b). La PCR empleando hisopos conjuntivales ha obtenido una elevada sensibilidad, superior a la obtenida mediante ganglio linfático, bazo o sangre (Strauss-Ayali *et al.*, 2004; Ferreira Sde *et al.*, 2008) y con la ventaja de utilizar una muestra no invasiva. Recientemente, la PCR cuantitativa a tiempo real ha permitido la estimación del número relativo de parásitos en diferentes muestras (Alberola *et al.*, 2004; Francino *et al.*, 2006). Esta técnica tiene varias ventajas sobre la PCR tradicional como son el aumento de la sensibilidad hasta valores inferiores a 1 parásito por mL, la reducción del tiempo de la prueba y del riesgo de contaminación, y la utilidad en la monitorización de la carga parasitaria del animal durante la infección y el tratamiento (Mortarino *et al.*, 2004; Francino *et al.*, 2006; Rodríguez-Cortés *et al.*, 2007b).

8.3. Diagnóstico inmunológico

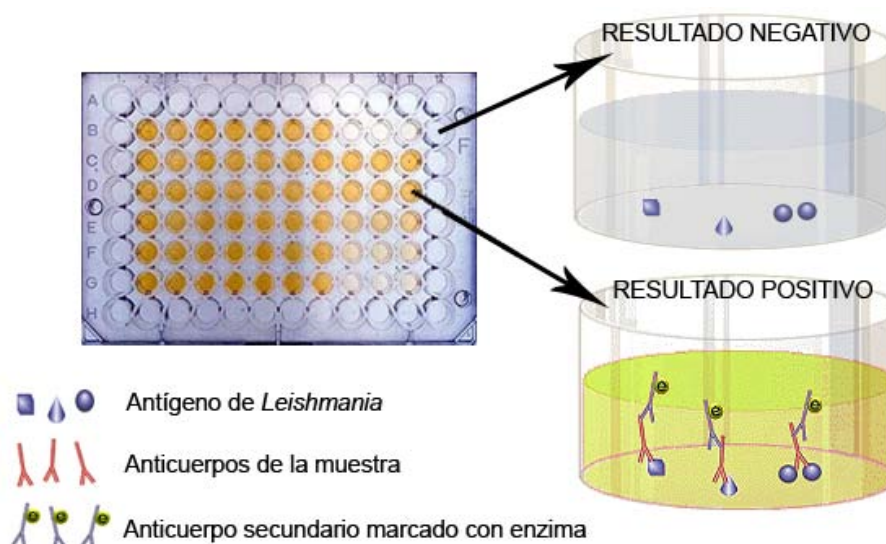
8.3.1. Detección de la respuesta humoral específica frente a *Leishmania* spp.

El diagnóstico de la CanL puede realizarse mediante la detección de anticuerpos específicos contra el parásito. La muestra más habitual para la detección de estos anticuerpos es el suero, donde además, las concentraciones de anticuerpos anti-*Leishmania* específicos se correlacionan con la parasitemia y con el estado clínico del animal (Reis *et al.*, 2006c; Rodríguez-Cortés *et al.*, 2007b). Aunque pueden emplearse muestras menos invasivas como la orina, su sensibilidad es inferior a la del suero (Solano-Gallego *et al.*, 2003b; Todoli *et al.*, 2009). Es aconsejable evaluar la serología conjuntamente con el cuadro clínico, ya que la presencia de anticuerpos no significa necesariamente el desarrollo de la enfermedad (Fisa *et al.*, 1999; Nieto *et al.*, 1999), y la ausencia de anticuerpos puede darse en perros infectados que en cambio muestran una respuesta celular específica (Cabral *et al.*, 1993). En los perros infectados clínicamente sanos las concentraciones

de anticuerpos son más bajas que en los enfermos y es por ello que la sensibilidad de las técnicas de respuesta humoral es generalmente menor en estos animales (Mettler *et al.*, 2005a). Por otro lado, debido al período previo a la seroconversión, este método puede ser poco sensible en las primeras fases de la infección. Se ha calculado que la serología puede estar infraestimando aproximadamente un 30 % de las infecciones recientes (Courtenay *et al.*, 2002).

Existen diversas pruebas serológicas utilizadas para el diagnóstico de la leishmaniosis, siendo las más utilizadas la inmunofluorescencia indirecta (IFI), el test de aglutinación directa (DAT) y el ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA). La IFI se ha considerado como el método de referencia para el diagnóstico serológico debido a su elevada sensibilidad y especificidad (Scalone *et al.*, 2002; Maia y Campino, 2008), sin embargo es una técnica laboriosa y difícil de interpretar. En comparación, el ELISA presenta una sensibilidad y especificidad comparables a las de la IFI (Scalone *et al.*, 2002; Mettler *et al.*, 2005; Otranto *et al.*, 2009) y a diferencia de la IFI y el DAT, tiene la ventaja de ser un método objetivo de lectura espectrofotométrica, fácilmente automatizable y más adecuado para el diagnóstico rutinario o cribado serológico de un gran número de muestras. La Figura 5 muestra el funcionamiento de esta prueba. Otros métodos serológicos de diagnóstico son el Western-blot (WB) (Fernandez-Perez *et al.*, 1999; Marin *et al.*, 2007), el dot-ELISA, (Mancianti *et al.*, 1996), los tests inmunocromatográficos o *dipsticks* (da Costa *et al.*, 2003) o la inmunodifusión (Bernadina *et al.*, 1997).

Figura 5. Esquema del funcionamiento de una prueba de ELISA



La estandarización de una prueba serológica para el diagnóstico de la leishmaniosis se ha visto dificultada por el uso de antígeno total crudo del parásito cuya composición es muy variable. Por este motivo se han desarrollado diferentes ensayos con proteínas recombinantes del parásito, con

el objetivo de encontrar antígenos que sean reconocidos por la mayoría de los perros infectados y que puedan emplearse para el diagnóstico. Diferentes ELISAs basados en proteínas recombinantes del parásito se muestran en la Tabla 4.

El antígeno rK39, una repetición de 39 aminoácidos de la proteína cinesina LcKin perteneciente a la superfamilia de las proteínas motoras y predominante en los amastigotes (Burns *et al.*, 1993), constituye un potente inmunógeno de linfocitos B durante la VL y la CanL. Esta propiedad ha sido aprovechada para desarrollar técnicas diagnósticas a partir de la forma recombinante del antígeno (rK39), convirtiéndolo en uno de los más estudiados para el diagnóstico. Los métodos serológicos basados en rK39 presentan una elevada sensibilidad y especificidad para el diagnóstico de la VL en los humanos (Singh *et al.*, 1995; Houghton *et al.*, 1998; Carvalho *et al.*, 2003; Toz *et al.*, 2004; Mathur *et al.*, 2005; Ritmeijer *et al.*, 2006; Sundar *et al.*, 2006) y diversos estudios han obtenido buenos resultados en el diagnóstico de la CanL (Rhalem *et al.*, 1999a; Scalone *et al.*, 2002; da Costa *et al.*, 2003; Mettler *et al.*, 2005; Otranto *et al.*, 2005; Rosario *et al.*, 2005; Porrozzi *et al.*, 2007). Sin embargo, la respuesta humoral contra esta proteína parece no ser tan dominante en los perros como en los humanos. Es por ello que la identificación de nuevos antígenos inmunógenos de células B sería de interés para complementar el diagnóstico mediante rK39 (Goto *et al.*, 2009).

En general, la utilización de diversos antígenos parece incrementar la sensibilidad de los ELISA en relación al uso de un solo antígeno. La combinación puede hacerse en paralelo (Rosati *et al.*, 2003; Porrozzi *et al.*, 2007) o empleando una proteína quimera (Soto *et al.*, 1998; Boarino *et al.*, 2005; Boarino *et al.*, 2008; Dapra *et al.*, 2008). La primera forma es más laboriosa pero evalúa la respuesta humoral contra las proteínas íntegras, en cambio el uso de proteínas quimeras simplifica el diagnóstico, pero es posible que se pierdan ciertos epítomos conformacionales en la fusión.

El uso de proteínas recombinantes permitiría desarrollar una técnica estandarizable de diagnóstico, pero también mejorar la especificidad respecto al antígeno crudo, al evitar reacciones cruzadas con otros patógenos. Además, la detección de anticuerpos dirigidos contra diferentes antígenos del parásito permitiría la caracterización de los patrones de respuesta humoral en los perros enfermos. Es posible que diferentes patrones se asocien a diferentes cursos de la enfermedad, abriendo así la posibilidad de investigar marcadores pronósticos de la CanL.

Tabla 4. Sensibilidad y especificidad de diferentes ELISA basados en proteínas recombinantes para el diagnóstico de la leishmaniosis canina

Antígeno	Sensibilidad	Especificidad	Referencia
A2	87 % (E: 70 %-93 %, S:77 %-88 %)	98 %-100 %	Carvalho <i>et al.</i> , 2002; Porrozzi <i>et al.</i> , 2007
CPA	100 %	ND	Rafati <i>et al.</i> , 2003
CPB	76 %	ND	Rafati <i>et al.</i> , 2003
GP63	100 %	ND	Morales <i>et al.</i> , 1997
GRP94	84 %	ND	Larreta <i>et al.</i> , 2000
H2A	72 %-78 %	ND	Soto <i>et al.</i> , 1995b; Soto <i>et al.</i> , 1999
H2B	63 %	ND	Soto <i>et al.</i> , 1999
H3	68 %-81 %	100 %	Soto <i>et al.</i> , 1996; Soto <i>et al.</i> , 1999
H4	47 %	ND	Soto <i>et al.</i> , 1999
Hsp70	75 %-100 %	ND	Quijada <i>et al.</i> , 1996
Hsp83	90 %	ND	Angel <i>et al.</i> , 1996
K26	92 %-99 % (E: 94 %-100 %, S: 66 %-98 %)	96 %-99 %	Porrozzi <i>et al.</i> , 2007; Rosario <i>et al.</i> , 2005; Rosati <i>et al.</i> , 2003
K39	97 %-99 % (E: 80 %-100 %, S:65 %-94 %)	85 %-100 %	Mettler <i>et al.</i> , 2005a; Porrozzi <i>et al.</i> , 2007; Rosario <i>et al.</i> , 2005; Scalone <i>et al.</i> , 2002
K39, K26, A2 en paralelo	100 %	85 %	Porrozzi <i>et al.</i> , 2007
K9, K39sub en paralelo	89 %	97 %	Rosati <i>et al.</i> , 2003
KMP11	96 %	ND	Berberich <i>et al.</i> , 1997
Ldcccys1	98 %	97 %	Pinheiro <i>et al.</i> , 2009
LiP0	78 %	ND	Soto <i>et al.</i> , 1995c
LiP2A	88 %	100 %	Soto <i>et al.</i> , 1995a
LiP2B	100 %	100 %	Soto <i>et al.</i> , 1995a
Proteína quimera (CA)	98 %	99 %	Dapra <i>et al.</i> , 2008
Proteína quimera (<i>Leishmancheck</i>)	82 %- 94 %	97 %	Boarino <i>et al.</i> , 2008
Proteína quimera (PQ): P2A +P2B +P0 +H2a	79 %-93 %	96 %-100 %	Soto <i>et al.</i> , 1998
Proteína quimera: K9 + K26+ K39sub	96 %	99 %	Boarino <i>et al.</i> , 2005
PSA	100 %	ND	Boceta <i>et al.</i> , 2000

E: Perros con enfermedad patente; S: Perros infectados sin signos clínicos, ND: No determinado.

8.3.2. Detección de la respuesta celular específica frente a *Leishmania* spp.

Desde que se descubrió la existencia de una respuesta celular específica en los perros infectados (Cabral *et al.*, 1992), el uso de técnicas de detección de la respuesta celular en estudios epidemiológicos ha permitido detectar un elevado número de perros infectados que no presentan signos clínicos de enfermedad, demostrando que la serología había infraestimado la tasa de infección (Cardoso *et al.*, 1998; Solano-Gallego *et al.*, 2000). Sin embargo, el uso de estas técnicas se encuentra poco estandarizado y limitado a la investigación.

Una de estas técnicas de evaluación de la respuesta celular es el test de reacción intradérmica, test de Montenegro o de Leishmanina (LST), que consiste en la valoración de la respuesta celular *in vivo* tras la inoculación intradérmica de promastigotes inactivados. Tras un período de 48–72 h se puede detectar la presencia de una reacción de hipersensibilidad de tipo IV, o hipersensibilidad retardada (DTH), que da lugar a eritema e induración de la zona inoculada (Figura 6). Tanto en el hombre como en el perro se considera que una reacción superior a los 5 mm es positiva (Pinelli *et al.*, 1994b; Cardoso *et al.*, 1998; Solano-Gallego *et al.*, 2000; Solano-Gallego *et al.*, 2001a) y refleja la presencia de una respuesta inmunitaria celular específica contra *Leishmania*. Aunque tradicionalmente la prueba se ha realizado con parásito entero fenolizado, un estudio ha valorado recientemente la reacción intradérmica contra la cisteína peptidasa recombinante de 30 kDa de *L. infantum* (rLdcccys1) en perros infectados (Pinheiro *et al.*, 2009) y otro contra el antígeno rTRYP en vacunados (Carson *et al.*, 2009). Este nuevo tipo de pruebas permitiría desarrollar una prueba estandarizable para el diagnóstico de infecciones no detectables mediante serología, establecer un pronóstico para los perros enfermos en tratamiento o evaluar la respuesta celular contra diferentes antígenos del parásito con el fin de detectar posibles candidatos vacunales.

Figura 6. Test de reacción intradérmico con leishmanina (LST) en un perro con reacción positiva.



La linfoproliferación (LPA) es una técnica que permite valorar la respuesta celular *in vitro*. Consiste en el cultivo de linfocitos, preferentemente PBMCs, con antígenos del parásito para valorar su capacidad blastogénica. En la prueba también se incluye un mitógeno inespecífico para valorar la inmunocompetencia del individuo, y un control negativo no estimulado. La linfoproliferación puede

medirse mediante métodos radioactivos (timidina tritiada), inmunoenzimáticos (BrdU) o fluorocitométricos, y se expresa generalmente como un índice de estimulación (proliferación de las células estimuladas/proliferación de las células no estimuladas). Se consideran positivos índices de estimulación superiores a 2–3 (Pinelli *et al.*, 1994b, Leandro *et al.*, 2001, Fernandez-Bellon *et al.*, 2005). Como técnica diagnóstica es laboriosa, requiere de equipamiento especializado y además es poco sensible (60 %–75 %) y poco específica (83 %) (Quinnell *et al.*, 2001a).

La detección de IFN- γ , la citocina más importante involucrada en la respuesta celular frente al parásito, puede realizarse empleando los sobrenadantes de linfocitos estimulados con antígeno de *Leishmania*. El bioensayo de IFN (IFNb) estima la cantidad de IFN del sobrenadante valorando la protección que este infiere a una monocapa de células caninas renales infectadas con el virus de la estomatitis vesicular (Fernandez-Bellon *et al.*, 2005). Este bioensayo es laborioso y recientemente la disponibilidad de un kit comercial para la detección del IFN- γ canino ha simplificado la detección de esta citocina (Strauss-Ayali *et al.*, 2005).

De las tres pruebas, el LST es la más sencilla de realizar y la que más fácilmente podría aplicarse al diagnóstico rutinario. Además es la más sensible, ya que en un estudio comparativo realizado en perros clínicamente sanos de una zona endémica, la sensibilidad de las técnicas de evaluación de la respuesta celular fue 66 % para el LST, 30 % para la LPA y 57 % para el IFNb (Fernandez-Bellon *et al.*, 2005). No obstante, las tres pruebas parecen evaluar diferentes aspectos de la inmunidad celular, debido a que sus resultados son complementarios y los animales que resultan ser negativos a una prueba pueden ser positivos a otra (Fernandez-Bellon *et al.*, 2005) como se ha descrito también en los pacientes con VL (Khalil *et al.*, 2005). Su uso conjunto sería el más adecuado para obtener una visión más amplia de la respuesta celular (Rodriguez-Cortes *et al.*, 2007a).

9. TRATAMIENTO DE LA LEISHMANIOSIS CANINA

En general, los tratamientos existentes son capaces de reducir la carga parasitaria en el animal enfermo, pero la eliminación total del parásito es infrecuente (Noli y Auxilia, 2005). Tras un tratamiento eficaz se observa además de la disminución de la carga parasitaria, una disminución de las concentraciones de anticuerpos y un reestablecimiento de la respuesta celular (Moreno *et al.*, 1999; Rhalem *et al.*, 1999a).

Los fármacos de primera elección para el tratamiento de la VL y de la CanL siguen siendo hoy en día los antimoniales (antimoniato de meglumina o estibogluconato sódico), compuestos que llevan

usándose durante más de 90 años (Baneth y Shaw, 2002). Los antimoniales actúan inhibiendo selectivamente los enzimas de *Leishmania* implicados en la glicólisis y la oxidación de los ácidos grasos. Sin embargo, el uso prolongado de estos compuestos tanto en los humanos como en el perro ha provocado la aparición de resistencias en el parásito (Gramiccia *et al.*, 1992; Carrio y Portus, 2002; Alvar *et al.*, 2004; Singh, 2006). La eficacia clínica alcanza valores del 67 %–100 % (Noli y Auxilia, 2005). En perro se administran preferentemente por vía subcutánea (Valladares *et al.*, 1996) y es frecuente la aparición de dolor en el punto de inyección. Debido a su nefrotoxicidad, no es recomendable su utilización en caso de daño renal, ya que podría agravarse debido al tratamiento.

El alopurinol es un análogo estructural de la base púrica hipoxantina, que metabolizado por *Leishmania* e incorporado a su RNA produce un error en la síntesis de proteínas, actuando como parasitostático. La combinación del antimonio de meglumina y el alopurinol constituye el tratamiento más habitual de la CanL ya que su combinación produce un sinergismo en la obtención de remisión clínica (Denerolle y Bourdoiseau, 1999). La mejoría clínica se produce en un 96 %–100 % de los casos. El interés del uso del alopurinol reside sobre todo en la prevención de las recidivas, ya que cuando se administra durante periodos superiores a 5 meses, la tasa de recidivas es considerablemente menor que cuando se administra únicamente antimonio de meglumina (4 %–11 % frente a 32 %–100 %) (Noli y Auxilia, 2005). Otra ventaja de la combinación es que disminuye la duración del tratamiento con antimonio de meglumina, haciendo que la terapia sea más barata y mejor tolerada (Denerolle y Bourdoiseau, 1999). El alopurinol no suele causar efectos secundarios, pero pueden aparecer cálculos de xantina en la orina, principalmente en animales con alteraciones hepáticas (Ling *et al.*, 1991).

La anfotericina B es un macrólido poliénico tradicionalmente empleado como antifúngico, que se une a los lípidos de membrana de *Leishmania*, provocando pérdida de potasio, aminoácidos y purinas. En perros induce una mejoría clínica en el 85 %–100 % de los casos (Noli y Auxilia, 2005), pero tras el tratamiento existe un alto riesgo de recidiva (Moreno *et al.*, 1999; Cortadellas, 2003). La anfotericina B tiene el inconveniente de ser muy nefrotóxica, de manera que es necesaria una estrecha monitorización de la función renal. Diversas formulaciones mejoradas tales como emulsiones lipídicas o fármaco liposomal han conseguido disminuir la nefrotoxicidad de la forma libre (Oliva *et al.*, 1995; Lamothe, 2001). En general, su utilización ha estado limitada por su aplicación intravenosa y su elevado coste (Alvar *et al.*, 2006b).

Recientemente, el uso de la miltefosina en la CanL ha abierto una nueva línea de tratamiento para esta enfermedad (Miro *et al.*, 2008). La miltefosina es un análogo de la fosfatidilcolina y actúa probablemente alterando el metabolismo de los fosfolípidos, la transducción de señales y la

biosíntesis de la membrana, a la vez que induce apoptosis (Verma y Dey, 2004). Estudios recientes en perros señalan una efectividad similar a la del antimonio de meglumina, con la ventaja de la administración oral y la ausencia de toxicidad renal o hepática (Mateo *et al.*, 2009). A pesar de que la miltefosina consigue una remisión clínica, en algunos animales se observa la aparición de recidivas tras el tratamiento, aunque se combine con alopurinol (Manna *et al.*, 2008). Los principales efectos secundarios de la miltefosina son los gastrointestinales, principalmente el vómito (Woerly *et al.*, 2009). En humanos la utilización de miltefosina ha levantado muchas expectativas por su eficacia en zonas donde se ha desarrollado resistencia significativa al antimonio de meglumina (Jha *et al.*, 1999; Berman, 2005). La extensión de su uso en perros podría terminar provocando la aparición de resistencias como en el caso de los antimoniales. Idealmente, los tratamientos aplicados a los humanos y a los perros deberían tener diferentes mecanismos de acción para evitar la aparición de resistencias (Baneth y Shaw, 2002; Miro *et al.*, 2008).

Otros tratamientos descritos contra la CanL son la aminosidina (Poli *et al.*, 1997), la pentamidina (Rhalem *et al.*, 1999b), el metronidazol combinado con la espiamicina (Pennisi *et al.*, 2005) o con la enrofloxacin (Bianciardi *et al.*, 2004), la domperidona (Gomez-Ochoa *et al.*, 2009), el trifluralín (Joao *et al.*, 2006), la marbofloxacin (Rougier *et al.*, 2008), los péptidos antimicrobianos (Alberola *et al.*, 2004) o la inmunoterapia con vacunas (Borja-Cabrera *et al.*, 2004; Santos *et al.*, 2007; Miret *et al.*, 2008).

10. CONTROL DE LA LEISHMANIOSIS VISCERAL ZONÓTICA

En ausencia de una vacuna contra la VL, el control de la enfermedad en las zonas endémicas radica en el diagnóstico temprano de los pacientes infectados y su tratamiento (Chappuis *et al.*, 2007). No obstante, el control de la VL debe tener en cuenta los otros dos componentes del ciclo epidemiológico del parásito: el vector y el reservorio.

Evitar la picadura del vector y la inoculación del parásito es una forma de prevenir la infección. Existen diversas sustancias con capacidad insecticida, de las cuales las más utilizadas han sido los piretroides, como la permetrina (Mercier *et al.*, 2003; Molina *et al.*, 2006; Miro *et al.*, 2007; Otranto *et al.*, 2007) o la deltametrina (Killick-Kendrick *et al.*, 1997; Halbig *et al.*, 2000; David *et al.*, 2001; Ferroglio *et al.*, 2008). Estos insecticidas pueden ser utilizados de forma tópica, pero la deltametrina se ha utilizado más habitualmente en collares para perros, debido a que esta forma es eficaz durante periodos más largos de tiempo (Reithinger *et al.*, 2001). El uso de collares impregnados con deltametrina no sólo ha demostrado proteger a los perros de las picaduras de

los flebotomos, sino que este hecho ha provocado paralelamente una disminución de la incidencia de ZVL en los niños (Gavvani *et al.*, 2002). Los insecticidas pueden utilizarse también en el ambiente, para fumigar el interior de las casas y el entorno peridoméstico o impregnar las mosquiteras. En algunos países como la India el insecticida más utilizado sigue siendo el DDT (Sharma y Singh, 2008). Actualmente se está investigando el uso de feromonas para atraer a los vectores (Kishore *et al.*, 2006).

En el control de la VL puede ser interesante el desarrollo de vacunas que actúen a su vez como bloqueantes de la transmisión (Sinden, 1993). Esta estrategia consiste en generar en el individuo vacunado anticuerpos específicos contra moléculas del parásito necesarias para el desarrollo del parásito en el vector. Cuando el vector se alimenta de un individuo vacunado, ingiere los anticuerpos, que bloquean el ciclo de transmisión. Este efecto ha sido demostrado recientemente en perros vacunados con el ligando fucosa-manosa de *L. donovani* (FML) (Saraiva *et al.*, 2006).

Dado el importante papel del perro como reservorio de *L. infantum*, las actuaciones de control de la VL han consistido en cribado serológico y la eliminación de los perros seropositivos, medidas recomendadas por la WHO y que se aplican actualmente en Brasil (Dantas-Torres y Brandao-Filho, 2006). No obstante, esta estrategia no ha demostrado eficacia y cada vez es menos aceptada socialmente (Tesh, 1995; Reithinger y Davies, 2002). Factores como la elevada incidencia de infección, el tiempo transcurrido entre la infección del perro, el correcto diagnóstico y el sacrificio, o la sustitución de los perros sacrificados por una nueva población susceptible pueden haber contribuido a la ineficacia de esta estrategia (Courtenay *et al.*, 2002). El tratamiento de los perros infectados puede reducir temporalmente la infectividad de los perros con CanL, pero es frecuente que los animales vuelvan a ser infectivos transcurrido un tiempo tras la finalización de la terapia.

11. MODELOS EXPERIMENTALES PARA EL DESARROLLO DE VACUNAS CONTRA LA LEISHMANIOSIS VISCERAL ZOONÓTICA

Los modelos de roedores más utilizados en el estudio de la VL son el ratón y el hámster (Hommel *et al.*, 1995; Garg y Dube, 2006). En los ratones BALB/c inoculados con especies viscerotrópicas de *Leishmania* por vía intravenosa, se produce un aumento en la carga parasitaria durante las primeras fases de infección. Mientras el hígado desarrolla una respuesta celular que reduce drásticamente la carga parasitaria, el bazo no es capaz de desarrollar una respuesta protectora y sufre la persistencia del parásito (Engwerda y Kaye, 2000). Aunque el ratón no mimetiza la enfermedad progresiva que puede observarse en los humanos y en el perro, es un buen modelo

de infección oligosintomática y puede servir para investigar los mecanismos de resistencia a la infección. De hecho, ha servido para esclarecer la mayoría de mecanismos inmunológicos conocidos de la infección por *Leishmania* y es una especie muy versátil debido a la gran disponibilidad de reactivos comerciales (Handman, 2001). Una variación del modelo que utiliza parásitos inoculados por vía intradérmica induce una enfermedad con mayor similitud a la de los humanos (Ahmed *et al.*, 2003).

El hámster es considerado como el mejor modelo de roedor para la VL, debido a la susceptibilidad que presenta a los patógenos intracelulares (de Oliveira *et al.*, 2004; Perez *et al.*, 2006). Aunque se empleó primero como modelo de infección por *L. donovani* (Gifawesen and Farell, 1989), actualmente existen evidencias de que es también un excelente modelo para la infección por *L. infantum* (Knechtli and Jenni, 1990; Binhazim *et al.*, 1993; Bories *et al.* 1998; Requena *et al.*, 2000; Riça-Capela *et al.*, 2003). El hámster puede presentar desde una infección sin signos clínicos hasta una enfermedad crónica y progresiva de curso fatal (Requena *et al.*, 2000). El animal enfermo desarrolla caquexia, astenia y hepatoesplenomegalia, y puede llegar a morir en las fases avanzadas de la infección. Dado el paralelismo existente entre las manifestaciones clínicas del hámster con las del hombre (Bittencourt, 1995) y el perro (Abranches *et al.*, 1991b), constituye un buen modelo para el estudio de los mecanismos de patogénesis y sobre todo para las primeras fases de ensayos de vacunas (Requena *et al.*, 2000; Garg y Dube, 2006). A medida que avanza la infección, los parásitos se multiplican en diferentes órganos –bazo, hígado, médula ósea, piel- y aparece hipergamaglobulinemia y una grave inmunosupresión con pérdida de linfoproliferación específica frente a antígenos de *Leishmania* (Riça-Capela, 2003). El patrón de citocinas detectado en los hámsters infectados con *L. donovani* es fundamentalmente T_H1 , sin embargo, la función efectora del macrófago parece estar afectada debido a algún defecto en la activación de la iNOS, hecho que se ha descrito también en humanos (Zhang *et al.*, 1996, Perez *et al.*, 2006). Además, en fases avanzadas de la infección por *L. donovani* se detecta IL-10, la cual podría estar favoreciendo la enfermedad (Melby *et al.*, 1998; Melby *et al.*, 2001) como se ha descrito en los pacientes con VL (Nylen and Sacks, 2007). La desventaja que presenta este modelo es la falta de reactivos comerciales suficientes para realizar un seguimiento de los procesos inmunológicos, lo que ha causado que sea un animal menos utilizado que el ratón. Sin embargo, la secuenciación de diferentes citoquinas del hámster (Melby *et al.*, 1998) ha permitido el avance de los estudios de vacunas en esta especie (Basu *et al.*, 2005, Gomes *et al.*, 2008).

El perro es un hospedador natural del parásito y también un modelo para la infección por *Leishmania* en el hombre. Además, debido a su papel como reservorio es el hospedador clave para el control de la ZVL. Como en los humanos, la infección por *L. infantum* en los perros puede ser desde subclínica hasta grave y mortal (Abranches *et al.*, 1991b; Pinelli *et al.*, 1994b). Los

signos clínicos de la CanL son muy similares a los de la VL, a excepción de la caquexia, la onicogrifosis y la alopecia (Moreno y Alvar, 2002). Del mismo modo, el abanico de respuestas inmunitarias que desarrollan los perros infectados es comparable al descrito en humanos (Meller-Melloul *et al.*, 1991; Cabral *et al.*, 1992). El principal problema es que la respuesta a la infección experimental es muy variable (Moreno y Alvar, 2002). Además, la utilización del perro como modelo experimental es éticamente más controvertida y también más costosa que la de roedores, de manera que se recomienda su limitación a los ensayos de vacunas que ya hayan superado con éxito una fase preclínica en ratón o hámster (Garg y Dube, 2006).

En todos los modelos, la susceptibilidad individual, la dosis, la vía de inoculación y la fase del parásito influyen en el resultado final de la infección (Moreno y Alvar, 2002; Garg y Dube, 2006).

12. VACUNACIÓN CONTRA LA LEISHMANIOSIS VISCERAL ZONÓTICA

El desarrollo de una vacuna eficaz contra la CanL sería la mejor medida de control de la enfermedad, tanto para la población canina como para la humana (Dye, 1996). La existencia de una población de perros infectados que desarrolla de manera natural una respuesta protectora de control del parásito indica que es posible forzar una respuesta inmunitaria eficaz mediante una vacuna (Cabral *et al.*, 1992; Pinelli *et al.*, 1994b). Sin embargo, el desarrollo de vacunas eficaces contra la leishmaniosis presenta algunas dificultades (Crompton y Vanniasinkam, 2007). Como muchos parásitos, *Leishmania* induce respuestas inmunitarias ineficaces en el huésped, previniendo su eliminación y prolongando la infección en el tiempo. Además, desarrolla estrategias de evasión de la respuesta inmunológica, como la supresión de los mecanismos leishmanicidas en el interior del macrófago, la inhibición de la presentación de antígenos o la infección de células sin capacidad leishmanicida (Bogdan *et al.*, 1990). Por otra parte presenta dos fases vitales, el amastigote y el promastigote, con diferentes características antigénicas (Kubar y Fragaki, 2006).

Idealmente, una vacuna eficaz contra la leishmaniosis debería mimetizar la infección en el individuo vacunado, generando una respuesta inmunológica protectora de larga duración. La vacuna debería estimular una respuesta T_H1 , con activación de linfocitos T CD4+ y CD8+ específicos, producción de IFN- γ e inducción de NO en los macrófagos (Barbieri, 2006) que permita el control del parásito. Por otro lado, debería conferir protección cruzada contra las diferentes especies de *Leishmania*, dirigiéndose preferentemente contra antígenos conservados evolutivamente (Palatnik-de-Sousa, 2008). La vacuna debería ser estable y producida a un bajo coste para permitir su acceso a todas las zonas afectadas por esta enfermedad, que son mayoritariamente países en vías de desarrollo (<http://www.who.int/leishmaniasis/en/>).

12.1. Vacunas de primera generación

12.1.1. Vacunas vivas

En Asia y África la aparición de las lesiones estigmáticas de la CL en la cara ya se prevenía hace siglos aplicando sobre la piel raspados procedentes de una lesión activa (Hotez y Ferris, 2006). Más tarde, el desarrollo de los cultivos *in vitro* del parásito permitió la aparición de la leishmanización, la infección deliberada con parásitos vivos de un individuo en una zona estéticamente aceptable del cuerpo (Handman, 2001). Las personas que se recuperan de la leishmanización son inmunes a la infección natural, sin embargo con esta práctica no se evita la aparición de una lesión en el punto de inyección y una parte de los individuos leishmanizados desarrolla lesiones graves y puede llegar a requerir tratamiento (Nadim *et al.*, 1983). Este hecho ha conllevado el abandono de la leishmanización excepto en Uzbekistán, el único país donde todavía se practica (Noazin *et al.*, 2008).

12.1.2. Vacunas vivas atenuadas

El uso de vacunas vivas atenuadas pretende aprovechar las ventajas de simular una infección natural pero avirulenta, la cual permite la exposición a un gran número de antígenos durante un largo tiempo y facilita la estimulación de la respuesta inmunitaria de memoria (Silvestre *et al.*, 2008). Diferentes métodos de atenuación han sido ensayados con *Leishmania*: cultivos *in vitro* de larga duración (Mitchell *et al.*, 1984), cultivos con fármacos (Daneshvar *et al.*, 2003) y selección por sensibilidad a la temperatura (Gorczynski, 1985) o irradiación (Rivier *et al.*, 1993). Sin embargo, el uso de las vacunas vivas atenuadas es controvertido, especialmente cuando se desconoce el perfil genético de la cepa atenuada y existe el riesgo potencial de mutación y reversión a un fenotipo virulento (Handman, 2001). Otra alternativa es la de utilizar parásitos manipulados genéticamente. Diversas cepas mutantes han conferido protección contra la infección en modelos murinos de CL (Titus *et al.*, 1995; Saravia *et al.*, 2006) y de VL (Papadopoulou *et al.*, 2002; Silvestre *et al.*, 2007).

Utilizar especies no patogénicas, como *L. tarentolae*, permite también inducir una inmunidad cruzada protectora contra las especies patógenas (Breton *et al.*, 2005). En individuos inmunodeprimidos, se han aislado cepas de *L. infantum* que no pertenecen al zimodema MON-1 (Jimenez *et al.*, 1995; Gramiccia, 2003), hecho que podría indicar que estas especies son patógenas sólo en este tipo de individuos. La infección *in vitro* de macrófagos con estas cepas muestra que son poco virulentas y que son capaces de estimular estas células, de manera que su utilización podría ser útil para la vacunación (Carrillo, 2007).

12.1.3. Vacunas de parásito muerto

Para evitar el potencial efecto patogénico de las vacunas vivas, diferentes estudios han ensayado desde 1940 vacunas compuestas de parásito muerto (Noazin *et al.*, 2008), primero contra la CL y después también contra la VL. Estas vacunas tendrían la ventaja de poderse producir a un bajo coste, pero con la desventaja de la dificultad de estandarización.

Hacia 1970 se desarrolló en Brasil una vacuna compuesta por 5 cepas diferentes de *Leishmania* (Leishvacin®) que demostró estimular una respuesta DTH en un 78 % de las personas vacunadas (Mayrink *et al.*, 1978; Mayrink *et al.*, 1979). Sin embargo, diferentes estudios realizados con esta vacuna demostraron que no era protectora frente a la CL (Antunes *et al.*, 1986). Estudios posteriores sugirieron la continuación de los ensayos utilizando únicamente *L. amazonensis* IFLA/BR/67/PH8, una de las cinco cepas que componían la vacuna inicial (de Luca *et al.*, 2001). Del mismo modo, a pesar de ser inmunogénica, no resultó ser protectora en estudios realizados en Colombia (Velez *et al.*, 2005). En Ecuador, una vacuna compuesta por cepas de 3 especies diferentes de *Leishmania* aisladas de lesiones de individuos enfermos residentes en la zona —*L. braziliensis*, *L. guyanensis* y *L. amazonensis*— y usando Bacillus de Calmette y Guérin (BCG) como adyuvante obtuvo una eficacia del 73 % a corto plazo (Armijos *et al.*, 1998), pero que no fue duradera a largo plazo (Armijos *et al.*, 2003). En Irán y Sudán se ha ensayado en diferentes estudios la inmunogenicidad y la protección de una vacuna con *L. major* autoclavada (ALM) y BCG. De nuevo, aunque inmunogénica, la vacuna no fue eficaz (Momeni *et al.*, 1999; Satti *et al.*, 2001; Mahmoodi *et al.*, 2003). La formulación se sustituyó más tarde por una nueva que incluía ALM precipitado en hidróxido de aluminio (Alum). La inmunogenicidad mejoró (Kamil *et al.*, 2003) y la eficacia está siendo evaluada en la actualidad (Noazin *et al.*, 2008).

Aunque la mayoría de las vacunas de parásito muerto se han ensayado contra la CL, existen algunos estudios contra la VL. En general, los resultados obtenidos indican que son seguras e inmunogénicas, pero no protectoras. La vacuna de ALM-BCG fue segura y bien tolerada, pero no consiguió protección significativa contra la VL (Khalil *et al.*, 2000a; Khalil *et al.*, 2000b). Un estudio más reciente evalúa la vacunación con Alum-ALM-BCG, pero el escaso número de casos de enfermedad ocurridos en los pacientes del estudio no permite calcular la eficacia clínica (Kamil *et al.*, 2003; Khalil *et al.*, 2006). Las vacunas de primera generación contra la CanL se muestran en la Tabla 6. De las diferentes vacunas ensayadas en el modelo canino frente a la VL, la única vacuna con resultados positivos en fase III ha sido precisamente la de Alum-ALM-BCG (Mohebbali *et al.*, 2004). Debido a que este tipo de inmunización ha sido ensayado desde hace años, la mayoría de vacunas han entrado en fase II y III, tanto en humanos como en perros. No constan en la literatura nuevas vacunas ensayadas sólo en roedores.

Tabla 6. Vacunas de primera generación ensayadas contra *L. infantum* en el perro

Vacuna	Régimen	Inmunogenicidad		Infección	Protección		Referencia
		Preinf.	Postinf.		Parasitol. ⁽¹⁾	Clínica	
<i>L. braziliensis</i> sonicadas + BCG	600 µg proteína, ID, 3 dosis	ND	LPA	2.3 × 10 ⁶ pmg, IV	90 %	90 %	Mayrink <i>et al.</i> , 1996
<i>L. major</i> o <i>infantum</i> autoclavadas + BCG (Fase I y II)	1 mg proteína, ID, 3 dosis	DTH	DTH	2.5 × 10 ⁶ pmg, IP	87 %	ND	Mohebbali <i>et al.</i> , 1998
<i>L. major</i> autoclavada + BCG	2.2-1 mg proteína, ID, 3 dosis	Ac, LPA	ND	ND	ND	ND	Lasri <i>et al.</i> , 1999
<i>L. infantum</i> fraccionadas + FCA	3 × 10 ⁷ pmg, SC, 1 dosis	T _h 1, NO	ND	ND	ND	ND	Panaro <i>et al.</i> , 2001
Alum- <i>L. major</i> autoclavada + BCG (Fase III)	200 µg proteína, ID, 1 dosis	ND	ND	Natural	69 % ⁽²⁾	ND	Mohebbali <i>et al.</i> , 2004
<i>L. braziliensis</i> sonicadas + Saponina	600 µg proteína, SC, 3 dosis	Ac, LPA, NO	ND	ND	ND	ND	Giunchetti <i>et al.</i> , 2007
<i>L. braziliensis</i> sonicadas + SGE + Saponina	600 µg proteína, SC, 3 dosis	Ac ⁽³⁾ , LPA, NO	ND	ND	ND	ND	Giunchetti <i>et al.</i> , 2008a
<i>L. amazonensis</i> + <i>L. braziliensis</i> extractos crudos + BCG	SC, 3 dosis	Ac, LPA	ND	ND	ND	ND	Giunchetti <i>et al.</i> , 2008c

Ac: Anticuerpos vacunales, BCG: Bacillus Calmette-Guerin, FCA: Adyuvante Completo de Freund, ID: Intradérmico, IP: Intraperitoneal, IV: Intravenoso, LPA: Linfoproliferación, ND: No determinado, NO: Inducción de óxido nítrico. Pmg: Promastigotes, Preinf: Preinfección, Postinf.: Postinfección, SC: Subcutáneo, SGE: Homogeneizado de glándula salival de *Lu. Longigalpis*, T_h1: Perfil de citocinas T_h1, ⁽¹⁾ Protección parasitológica, expresada como eficacia referida al porcentaje de individuos con inmunidad estéril. ⁽²⁾ Eficacia valorada mediante seroconversión. ⁽³⁾ Dirigidos contra el parásito y contra SGE.

12.2. Vacunas de segunda generación

12.2.1. Vacunas de fracciones purificadas

Este tipo de vacunas consisten en la inmunización con determinadas fracciones del parásito purificadas a partir de cultivos del parásito entero. Las vacunas con fracciones purificadas probadas contra la CanL se muestran en la Tabla 7.

La vacuna más prometedora contra la CanL por el momento, y que ya ha sido registrada y comercializada en Brasil bajo el nombre de Leishmune®, se compone del ligando fucosa-manosa (FML) purificado de *L. donovani*. Los dos ensayos de Fase III demuestran que la vacuna es

INTRODUCCIÓN

segura, inmunogénica y protectora a largo plazo (da Silva *et al.*, 2000; Borja-Cabrera *et al.*, 2002). Además se ha descrito su potencial como inmunoterapia (Borja-Cabrera *et al.*, 2004) y como vacuna bloqueante de la transmisión del parásito (Nogueira *et al.*, 2005; Saraiva *et al.*, 2006). Su registro y comercialización en Europa requerirá nuevos ensayos.

Otra vacuna con buenos resultados ha sido la formada por antígenos excretados-secretados por promastigotes de *L. infantum* (LiESAp) en Francia, que ha resultado segura e inmunogénica. La protección parasitológica fue prácticamente completa (Lemesre *et al.*, 2005, Lemesre *et al.*, 2007), sin embargo esta vacuna se enfrentará seguramente a graves problemas en el registro debido a su dificultad de estandarización.

Tabla 7. Vacunas de segunda generación con fracciones purificadas ensayadas contra *L. infantum* en el perro

Vacuna	Régimen	Inmunogenicidad		Infección	Protección		Referencia
		Preinf.	Postinf.		Parasitol. ⁽¹⁾	Clínica	
LIF2 + MDP	25 µg, SC, 3 dosis	Ac	ND	ND	ND	ND	Ogunkolade <i>et al.</i> , 1988
LIF2 + MDP	20 µg, SC, 3 dosis	ND	ND	Natural	Exacerbante	Exacerbante	Dunan <i>et al.</i> , 1989
FML (Fase III)	1.5 mg, SC, 3 dosis+ 1 al año	ND	Ac, DTH	Natural	ND	75 %	da Silva <i>et al.</i> , 2000
FML+ Saponina QuilA (Leishmune®) (Fase III)	1.5 mg, SC, 3 dosis+ 1 al año	ND	Ac, DTH	Natural	100 %	80 %	Borja-Cabrera <i>et al.</i> , 2002 Nogueira <i>et al.</i> , 2005
LiESAp + MDP (Fase II)	100 µg, SC, 2 dosis	Ac, LPA, NO, T _h 1	Ac, LPA, NO, T _h 1	1 × 10 ⁸ pmg, IV	100 %	ND	Lemesre <i>et al.</i> , 2005
LiESAp + MDP (Fase III)	100 µg, SC, 2 dosis + 1 al año	ND	Ac, NO, T _h 1	Natural	92 %	78 %	Lemesre <i>et al.</i> , 2007
FML + Saponina QuilA (Leishmune®) (Fase III)	1.5 mg, SC, 3 dosis+ 1 al año	ND	Ac, DTH	Natural	ND	94 %	Borja-Cabrera <i>et al.</i> , 2008
FML + Saponina QuilA (Leishmune®) (Fase I)	1.5 mg, SC, 3 dosis	Ac, T _h 1, NO	ND	ND	ND	ND	Araujo <i>et al.</i> , 2009

Ac: Anticuerpos vacunales, IV: Intravenoso, LPA: Linfoproliferación, MDP: Muramil dipéptido, ND: No determinado, NO: Inducción de óxido nítrico, Pmg: Promastigotes, Postinf.: Postinfección, Preinf.: Preinfección, SC: Subcutáneo, T_h1: Perfil de citocinas T_h1.

⁽¹⁾ Protección parasitológica. Expresada como eficacia referida al porcentaje de individuos con inmunidad estéril.

Paradójicamente, la inmunización con LiF2 en perros exacerbó la enfermedad en lugar de conferir protección (Dunan *et al.*, 1989). Este hecho refuerza la idea de que pueden existir antígenos potencialmente protectores y potencialmente agravantes de la enfermedad, y de que es necesaria una elección racional de los mismos.

Tampoco en este caso figuran en la literatura nuevas vacunas de fracciones purificadas contra *L. infantum* ensayadas sólo en roedores.

12.2.2. Vacunas de proteínas recombinantes

Desde hace más de 20 años, se ha llevado a cabo la clonación y caracterización de diferentes proteínas recombinantes derivadas del DNA del parásito (Kubar y Fragaki, 2005). La obtención de proteínas a partir de la recombinación en lugar de la purificación ha facilitado el proceso, impulsando el desarrollo de un gran número de nuevas vacunas compuestas por un solo antígeno o por una combinación de ellos. El problema que pueden presentar estas proteínas es que pierdan inmunogenicidad debido a que su conformación no sea igual a la de la proteína nativa y se pierdan epítomos conformacionales (Coler y Reed, 2005).

En general, las vacunas de proteínas recombinantes necesitan ser administradas con adyuvantes para generar una respuesta T_H1 . Algunos adyuvantes empleados son el BCG, el Monofosforil Lípido (MPL), el Muramil Dipéptido (MDP), la citocina IL-12 o ciertos oligonucleótidos (secuencias CpG) (Coler y Reed, 2005). Sin embargo, algunas proteínas como HASPB1 han resultado ser protectoras sin adyuvante en el modelo murino (Stager *et al.*, 2000).

La vacuna ideal contra la leishmaniosis sería aquella que incluyese varios antígenos evolutivamente conservados entre las diferentes especies del parásito (Coler y Reed, 2005). Hasta el momento, y aparte de las vacunas de parásito muerto, sólo una vacuna de segunda generación compuesta por la fusión de las proteínas TRYF, LeiF y LmSTI1 (Leish-111f) ha llegado a ensayos clínicos en humanos contra la CL (Coler *et al.*, 2007). A pesar de que todos sus componentes fueron inmunogénicos en el perro (Fujiwara *et al.*, 2005) y de que la proteína fusión consigue una protección casi completa en ratones y hámsters infectados con *L. infantum* (Coler *et al.*, 2007), esta vacuna no ha demostrado protección en los ensayos de fase II y III contra la CanL (Gradoni *et al.*, 2005; Moreno *et al.*, 2007). En cambio, la vacunación con la proteína Q obtenida de la fusión de las proteínas LiP2b, LiP2a, LiP0 y H2A (Molano *et al.*, 2003) consiguió una protección del 90 %, aunque de momento sólo ha sido evaluada frente a una infección experimental. No obstante esta vacuna empleó BCG, un adyuvante con el que se han descrito reacciones adversas en el perro. La vacunación con una proteína similar a la Q (rJPCM5_Q)

empleada con cuatro adyuvantes diferentes al BCG no ha obtenido protección en perros (Poot *et al.*, 2009). La inmunización con otras proteínas como rHASP B1 o rH1 ha resultado ser sólo parcialmente protectora (Moreno *et al.*, 2007). Recientemente, la vacuna basada en rA2 que ha obtenido una protección moderada en el perro (Fernandes *et al.*, 2008), ha sido registrada en Brasil bajo el nombre de LeishTec®, y constituye la segunda vacuna comercializada contra la CanL.

Nuevas proteínas como rNH36 y rSMT han obtenido buenos resultados en ensayos con ratones y podrían ser buenos candidatos vacunales para ensayos en perros (Aguilar-Be *et al.*, 2005; Goto *et al.*, 2007). La proteína rORFF también ha obtenido elevados grados de protección en el modelo murino de VL con el parásito *L. donovani* (Tewary *et al.*, 2006). Las vacunas basadas en proteínas recombinantes contra *L. infantum* se muestran en la Tabla 8.

Otra posibilidad es la de modificar genéticamente bacterias para utilizarlas como vehículos de las proteínas y como adyuvantes al mismo tiempo, como en el caso del BCG recombinante expresando LCR1 que fue protector en ratones infectados con *L. infantum* (Streit *et al.*, 2000).

12.3. Vacunas de tercera generación

El avance de la biotecnología ha permitido el desarrollo de una nueva generación de vacunas basadas en el DNA. En este tipo de vacunación, el gen que codifica la proteína de interés vacunal se inserta en un plásmido bacteriano, el cual es inyectado en el individuo para que este exprese las proteínas *in vivo* (Wolff *et al.*, 1990). De esta manera, las vacunas de DNA ofrecen la ventaja de mimetizar los efectos de las vacunas vivas, pero sin el riesgo de infección. El DNA plasmídico funciona como vehículo pero también como adyuvante gracias a la presencia de elementos CpG no metilados en su secuencia (Sato *et al.*, 1996). Tras la captación del plásmido por las células presentadoras de antígeno (APC), los elementos CpG activan el receptor TLR9 de la respuesta inmunitaria innata (Hemmi *et al.*, 2000) y el antígeno producido *in vivo* es procesado estimulando la respuesta humoral y celular (Huygen, 2005). Una gran ventaja de estas vacunas es que son capaces de inducir una respuesta celular citotóxica mediada por linfocitos T CD8+, de manera que son muy útiles contra los patógenos intracelulares, como el HIV, *Plasmodium* spp. o *Mycobacterium tuberculosis* (Seder y Gurunathan, 1999; Gurunathan *et al.*, 2000). Las vacunas de DNA son baratas, termoestables y seguras para los individuos inmunodeprimidos en los que la aplicación de vacunas atenuadas puede ser arriesgada. Futuros estudios tendrán que evaluar el riesgo de inserción de los genes vacunales en el DNA propio del individuo (Huygen, 2005).

Tabla 8. Vacunas de segunda generación con antígenos recombinantes contra *L. infantum* en el perro y vacunas ensayadas sólo en roedores

Vacuna	Régimen	Especie	Inmunogenicidad		Infección	Protección		Referencia
			Preinf.	Postinf.		Parasitol. ⁽¹⁾	Clínica	
Proteína Q (LiP2b + LiP2a + LIPO + H2A) + BCG	4 µg/kg, IP, 3 dosis	Perro	Ac	Ac, Inh Ac _{CTLA} , DTH	5 × 10 ⁵ pmg, IV	90 % E	90 %	Molano <i>et al.</i> , 2003
TSA + LeIF + LmST11 + MPL-SE®/ AdjuPrime®	10 µg, SC, 3 dosis	Perro	Ac	Ac	1 × 10 ⁶ pmg, IV	ND	ND	Fujiwara <i>et al.</i> , 2005
Leish-111f + MPL-SE®/ AdjuPrime® (Fase III)	45 µg, SC, 3 dosis + 1 al año	Perro	ND	Ac, LPA	Natural	No protectora	No protectora	Gradoni <i>et al.</i> , 2005
CPA + CPB + rIL12 + QuilA	50 µg, SC, 2 dosis	Perro	Ac	Ac, no DTH	5 × 10 ⁷ pmg, IV	No protectora	No protectora	Poot <i>et al.</i> , 2006
H1 (a), HASPB1 (b) o ambos (c) + Montanide™	100 µg – 45 µg, ID, 3 dosis	Perro	Ac, no LPA	Ac, no LPA	1 × 10 ⁸ pmg, IV	(a) < 37 % E; (b y c) No protectoras	(a) 50 %; (b y c) 33 %	Moreno <i>et al.</i> , 2007
Leish-111f + MPL-SE®	45 µg, ID, 3 dosis	Perro	Ac, no LPA	Ac, no LPA	1 × 10 ⁸ pmg, IV	No protectora	5 %	Moreno <i>et al.</i> , 2007
A2 + Saponina (LeishTec®)	100 µg, SC, 3 dosis	Perro	Ac, T _h 1	Ac, Inh Ac CTLA ⁺ , T _h 1	5 × 10 ⁷ pmg, IV	43 - 60 % E	60 %	Fernandes <i>et al.</i> , 2008
Proteína Q similar (rJPCM5_Q) + MDP/ Matrix C/ Alum/ <i>P. acnes</i>	70 µg, SC, 2 dosis	Perro	Ac, LPA	Ac, LPA, DTH	5 × 10 ⁷ pmg, IV	No protectora	No protectora	Poot <i>et al.</i> , 2009
LCR1 + FCA	20 µg, SC, 2 dosis	Ratón	Ac	ND	1 × 10 ⁷ pmg, IV	63 % R	ND	Wilson <i>et al.</i> , 1995
NH36 + Saponina	100 µg, SC, 3 dosis	Ratón	Ac, DTH	Ac	2 × 10 ⁸ amg, IV	79 % R	ND	Aguilar-Be <i>et al.</i> , 2005
SMT + MPL-SE®	10 µg, SC, 3 dosis	Ratón	Ac, T _h 1	ND	5 × 10 ⁶ pmg, IV	99 % R	ND	Goto <i>et al.</i> , 2007

Ac: Anticuerpos vacunales, Alum: Hidróxido de aluminio, Amg: Amastigotes, BCG: Bacillus Calmette-Guerin, DTH: Inducción de respuesta DTH, FCA: Adyuvante Completo de Freund, ID: Intradérmico, IM: Intramuscular, Inh Ac_{CTLA}: Inhibición de anticuerpos anti-parásito, IP: Intraperitoneal, IV: Intravenoso, LPA: Linfoproliferación, MDP: Muramil dipéptido, MPL-SE®: Monofosforil Lípido en emulsión estable, ND: No determinado, NO: Inducción de óxido nítrico, *P. acnes*: *Propionibacterium acnes*, Pmg: Promastigotes, Postinf.: Postinfección, Preinf.: Preinfección, SC: Subcutáneo, T_h1, T_h2: Perfil de citocinas T_h1, T_h2. ⁽¹⁾ Protección parasitológica. Expresada como eficacia (E) referida al porcentaje de individuos con inmunidad estéril, o reducción (R) referida a la disminución de carga parasitaria en comparación con el grupo control.

A pesar de que estas vacunas han sido inmunogénicas y han conferido protección en los modelos murinos de diversos patógenos intracelulares, al escalar hacia especies más complejas no han resultado ser lo suficientemente potentes como para conferir protección (Gurunathan *et al.*, 2000). Una vacuna de DNA multigénica ha resultado ser inmunogénica en el perro, pero su eficacia contra la CanL aún no ha sido probada (Saldarriaga *et al.*, 2006). Otro estudio ensayará la eficacia de la vacunación con DNA de NH36, un antígeno contenido en el complejo FML (Palatnik-de-Sousa *et al.*, 2008). De momento, el único estudio que ha evaluado la eficacia de una vacuna multigénica de DNA ante una infección experimental en perros no ha observado protección (Rodríguez-Cortes *et al.*, 2007c), incluso conteniendo un antígeno que confirió protección casi total en el modelo de hámster frente a *L. donovani* (Basu *et al.*, 2005). Por el contrario, la mayoría de las vacunas de DNA ensayadas en el modelo murino han resultado inmunogénicas y protectoras, con eficacias del 63 %–99 %. Sin embargo, el éxito de esta estrategia parece depender del antígeno empleado. La vacunación de DNA con histonas (Carrion *et al.*, 2008) y en general las estrategias de DNA basadas en LACK (Marques-da-Silva *et al.*, 2005; Melby *et al.*, 2001) no han obtenido protección frente a VL, a excepción de un estudio que empleó LACK por vía intranasal (Gomes *et al.*, 2007a). La Tabla 9 muestra las vacunas de DNA probadas contra *L. infantum*.

Como se ha expuesto anteriormente, la saliva del vector es muy importante en el establecimiento de la infección por *Leishmania* y puesto que la respuesta celular contra el parásito se ha correlacionado con los niveles de anticuerpos contra la saliva (Barral *et al.*, 2000; Gomes *et al.*, 2002), las estrategias de vacunación basadas en proteínas salivares del vector podrían ser útiles para conferir protección. En este sentido, cabe destacar la elevada protección que se consiguió tras la vacunación de hámsters con DNA codificando una proteína salivar del vector *Lu. longipalpis* (LJM19), en un modelo que mimetizaba la infección natural con *L. infantum* (Gomes *et al.*, 2008).

Tabla 9. Vacunas de DNA ensayadas contra *L. infantum* en el perro y vacunas ensayadas sólo en roedores

Vacuna	Régimen	Especie	Inmunogenicidad		Infección	Protección parasitol. ⁽¹⁾	Referencia
			Preinf.	Postinf.			
LACK+ PSA2 + TSA + ARP1 + H1 + H2A + H2B + H3 + H4 +ST11 + IL-12/GM-CSF	50 µg/ plásmido, IM/ID, 3 dosis	Perro	LPA, T _h 1	DTH	1 × 10 ⁶ pmg <i>L. donovani</i> , ID	96 % R ⁽²⁾	Saldarriaga <i>et al.</i> , 2006
KMPII + TRYP + LACK + GP63	200 µg/ plásmido, ID, 4 dosis	Perro	Ac, LPA	LPA	5 × 10 ⁷ pmg, IV	No protectora	Rodriguez-Cortes <i>et al.</i> , 2007c
papLe22	100 µg, IM, 1 dosis	Hámster	Ac	Ac, Inh Ac _{CTLA}	1 × 10 ⁷ amg, IP	50 % R	Fragaki <i>et al.</i> , 2001
NH36	100 µg, IM, 3 dosis	Ratón	No Ac, T _h 1, DTH	Ac	2 × 10 ⁸ amg, IV	88 % R	Aguilar-Be <i>et al.</i> , 2005
LACK + Sucrosa	100 µg, IM o SC, 2 dosis	Ratón	T _h 1/T _h 2	T _h 1/T _h 2	1×10 ⁷ pmg, IV	No protectora	Marques-da-Silva <i>et al.</i> , 2005
A2 + Sucrosa	100 µg, IM, 2 dosis	Ratón	T _h 1	T _h 1	1 × 10 ⁷ pmg, IV	99 % R	Zanin <i>et al.</i> , 2007
NH + Sucrosa	100 µg, IM, 2 dosis	Ratón	T _h 1/T _h 2	T _h 1/T _h 2	1 × 10 ⁷ pmg, IV	No protectora	Zanin <i>et al.</i> , 2007
NH/A2 + Sucrosa	100 µg, IM, 2 dosis	Ratón	T _h 1/T _h 2	T _h 1/T _h 2	1 × 10 ⁷ pmg, IV	99 % R	Zanin <i>et al.</i> , 2007
LACK	30 µg, IN, 2 dosis	Ratón	ND	Ac, T _h 1/T _h 2	1 × 10 ⁷ pmg, IV	80 – 90 %	Gomes <i>et al.</i> , 2007a
H2A, H2B, H3, H4	80 µg, SC, 3 dosis	Ratón	ND	Inh Ac _{CTLA}	1 × 10 ⁵ pmg, IV	No protectora	Carrion <i>et al.</i> , 2008
LJM19⁽³⁾	20 µg, ID, 3 dosis	Hámster	DTH	DTH, T _h 1>T _h 2, iNOS, Inh Ac _{CTLA}	1 × 10 ⁵ pmg + SGH, ID	> 99 % R	Gomes <i>et al.</i> , 2008

Ac: Anticuerpos vacunales, Amg: Amastigotes, DTH: Inducción de respuesta DTH, ID: Intradérmico, IM: Intramuscular, IN: Intranasal, Inh Ac_{CTLA}: Inhibición de anticuerpos anti-parásito, iNOS: Inducción de la sintasa de óxido nítrico, IV: Intravenoso, LPA: Linfoproliferación, ND: No determinado, Pmg: Promastigotes, SGH: Homogenizado de glándula salival, T_h1: Perfil de citocinas T_h1, T_h2: Perfil de citocinas T_h2, Preinf.: Preinfección, Postinf.: Postinfección, SC: Subcutáneo. ⁽¹⁾ Protección parasitológica. Expresada como eficacia (E) referida al porcentaje de individuos con inmunidad estéril, o reducción (R) referida a la disminución de carga parasitaria en comparación con el grupo control. ⁽²⁾ Aproximación a una posible protección parasitológica evaluando la carga parasitaria en ganglio linfático tras 96h de una prueba DTH con parásito vivo. ⁽³⁾ Componente de la saliva del vector *Lu. longipalpis*.

12.3.1. Mejora de las vacunas de tercera generación: la estrategia *prime-boost*

Actualmente se ha conseguido mejorar la efectividad de las vacunas de DNA mediante la estrategia de vacunación-revacunación heteróloga. Esta estrategia consiste en la vacunación (*prime*) con un vector que contiene el gen de interés, y la revacunación heteróloga (*heterologous boost*) con un vector diferente al primero pero conteniendo el mismo gen o antígeno. El método *prime-boost* ha mejorado la inmunogenicidad de las vacunas de DNA, obteniendo niveles de inmunidad celular CD4+ y CD8+ y niveles de protección sin precedentes (Schneider *et al.*, 1998; Hanke *et al.*, 1999). Su eficacia probablemente sea debida a la amplificación de los linfocitos T específicos del antígeno y la selección de aquellos con mayor avidéz por el mismo (Ramshaw y Ramsay, 2000; Woodland, 2004).

Figura 7. Funcionamiento de la estrategia de vacunación-revacunación heteróloga (*prime-boost*)

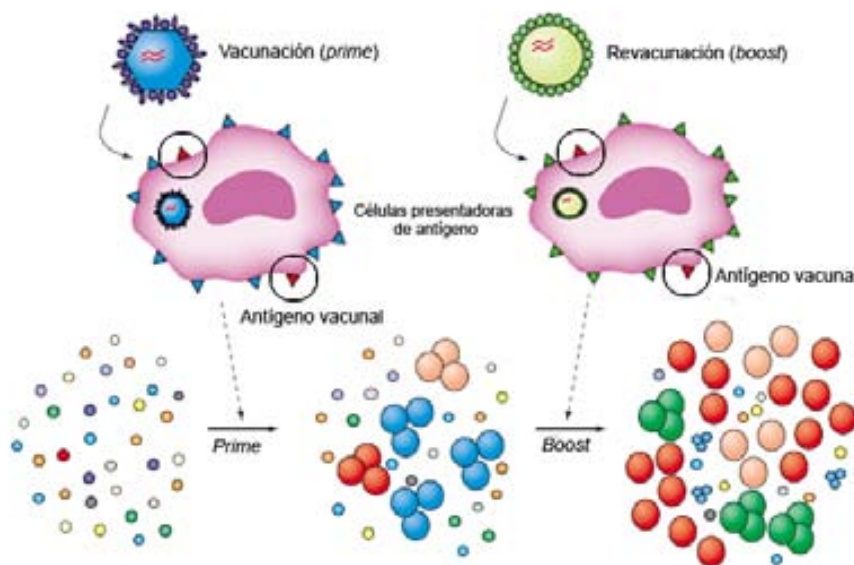


Figura extraída y modificada de Woodland, 2004

Aunque el mecanismo de funcionamiento de estas vacunas no se conoce con exactitud, se cree que su éxito se basa en aprovechar el fenómeno de la inmunodominancia de los linfocitos T (Figura 7). En la fase de *prime*, las células presentadoras de antígeno procesan tanto los antígenos del vector (triángulo azul) como los vacunales (triángulo rojo), y se produce una estimulación de los linfocitos T no activados para su diferenciación en linfocitos T activados específicos contra los diferentes antígenos presentados (esferas azules y rojas). En la revacunación heteróloga o fase de *boost*, los diferentes antígenos inoculados vuelven a ser presentados (triángulo verde y rojo), pero el único antígeno compartido con la primera vacunación es el antígeno vacunal de interés. De este modo y debido al fenómeno de la inmunodominancia, se consigue una expansión de los linfocitos T específicos de memoria contra el antígeno vacunal

que aumentan no sólo en número sino también en avidez contra el antígeno (McShane, 2002). La Figura 7 es representativa de una situación hipotética, sin embargo, muchos de los vectores no generan apenas reacción contra sus propios antígenos (Woodland, 2004).

Existen diferentes vectores que pueden ser utilizados en la estrategia *prime-boost*. Sin embargo no todos ellos son capaces de generar respuestas CD4+ y CD8+ o de potenciar en el *boost* las previamente generadas durante la fase de *prime* (Tabla 10). Los virus recombinantes, en particular los poxvirus y los adenovirus, son los más efectivos en generar y expandir los linfocitos T CD4+ y CD8+.

Tabla 10. Vectores empleados en la vacunación-revacunación heteróloga (*prime-boost*) y tipo de células que son capaces de estimular

Vector	Prime	Boost
DNA plasmídico	CD4+, CD8+	Uso no indicado
Proteínas recombinantes	CD4+	CD4+
Virus recombinantes	CD4+, CD8+	CD4+, CD8+

Información extraída de McShane, 2002

En la vacunación contra los patógenos intracelulares, donde las vacunas tradicionales no tuvieron éxito, esta estrategia está dando muy buenos resultados. Diferentes ensayos clínicos en fase I–III se están llevando a cabo en humanos contra enfermedades tan importantes como las causadas por HIV (Trinvuthipong, 2004; Rerks-Ngarm *et al.*, 2006), *M. tuberculosis* (McShane *et al.*, 2005), o *Plasmodium* spp. (Habeck, 2002), entre otros.

Varios tipos de vacunación-revacunación han sido ensayados contra la VL en modelos animales, empleando diferentes antígenos y vectores. Las vacunas que mejores resultados han obtenido en el perro han sido las basadas en los antígenos cisteína peptidasa CPA y CPB (Rafati *et al.*, 2005) empleando DNA plasmídico y proteínas recombinantes, y la basada en el antígeno LACK, con DNA plasmídico y virus vaccinia recombinante (rVV) (Ramiro *et al.*, 2003). En los modelos murinos, nuevos antígenos como Ldcccys1 (Ferreira *et al.*, 2008), ORFF de *L. donovani* (Tewary *et al.*, 2005) y CPC (Khoshgoo *et al.*, 2008) están obteniendo elevados grados de protección. Una estrategia muy interesante consistiría en incluir antígenos de la saliva del vector en la vacunación frente al parásito. Recientemente, se ha descrito que la vacunación *prime-boost* en perros con las proteínas LJL143 y LJM17 de *Lu. longivalpis* es capaz de inducir una respuesta T_H1 en perros vacunados y de estimular la actividad leishmanicida de los macrófagos *in vitro* (Collin *et al.*, 2009). Las vacunas *prime-boost* probadas contra *L. infantum* se muestran en la Tabla 11.

Tabla 11. Vacunas de régimen *prime-boost* heterólogo contra *L. infantum* en el perro y vacunas ensayadas sólo en roedores

Vacuna	Régimen	Especie	Inmunogenicidad		Infección	Protección		Referencia
			Pre-Inf.	Post-Inf.		Parasitol. ⁽¹⁾	Clinica	
LACK DNA + rVV	P: 100 µg, SC, 1 dosis + B: 10 ⁸ PFU, SC, 1 dosis	Perro	ND	Ac, Inh Ac _{CTLA} , LPA, T _h 1/T _h 2	1 × 10 ⁸ pmg, IV	60 % E	80 %	Ramiro <i>et al.</i> , 2003
CPA y CPB, DNA + Prot. Rec. + Montanide™, CpG	P: 100 µg/plásmido, IM, 2 dosis + B: 200 µg, IM, 1 dosis	Perro	Ac, T _h 1>T _h 2	Ac, LPA, T _h 1>T _h 2, DTH	5 × 10 ⁶ pmg, IV	80 % E	ND	Rafati <i>et al.</i> , 2005
LACK DNA + rMVA	P: 100 µg, IM, 1 dosis + B: 10 ⁸ PFU, IM, 1 dosis	Perro	ND	Inh Ac _{CTLA} , LPA, T _h 1>T _h 2	1 × 10 ⁸ pmg, IV	No protectora	68 %	Ramos <i>et al.</i> , 2008
LACK DNA + rMVA	P: 100 µg o 1000 µg, IM, 1 dosis + B: 10 ⁸ PFU rMVA, IM, 1 dosis	Perro	DTH	ND	ND	ND	ND	Carson <i>et al.</i> , 2009
TRYP DNA + rMVA	P: 100 µg o 1000 µg, IM, 1 dosis + B: 10 ⁸ PFU rMVA, IM, 1 dosis	Perro	Ac, T _h 1, DTH	ND	ND	ND	ND	Carson <i>et al.</i> , 2009
LJL143 y LJM17 ⁽²⁾ DNA + Prot. Rec. + rCPV	P: 500 µg, ID e IM, 3 dosis + B: 100 µg Prot. Rec., ID, 1 dosis + 10 ⁸ PFU rCPV, IM, 1 dosis	Perro	Ac, T _h 1, DTH	T _h 1, DTH	Exposición a <i>Lu. longipalpis</i> Infectados	74 % - 82 % R en macrófagos infectados <i>In vitro</i>	ND	Collin <i>et al.</i> , 2009
CPC DNA + Prot. Rec. + Montanide™, CpG	P: 100 µg, SC, 1 dosis + B: 30 µg, SC, 1 dosis	Ratón	Ac (IgG2a>IgG1)	Ac, T _h 1, NO	2 × 10 ⁶ pmg, IV	80 - 97 % R	ND	Khooshgoo <i>et al.</i> , 2008
Ldcy1 DNA + Prot. Rec. + CpG	P: 100 µg, IM, 3 dosis + B: 25 µg, SC, 1 dosis	Ratón	Ac (IgG2a>IgG1)	T _h 1, NO	1 × 10 ⁷ amg, IV	> 99 % R	ND	Ferreira <i>et al.</i> , 2008
CTE DNA + Prot. Rec. + Montanide™, CpG	P: 100 µg, SC, 1 dosis + B: 30 µg, SC, 1 dosis	Ratón	Ac (IgG1>IgG2a)	Ac (IgG1 = IgG2a), T _h 2>T _h 1	5 × 10 ⁶ pmg, IV	Exacerbante	ND	Rafati <i>et al.</i> , 2008

Ac: Anticuerpos vacunales, Amg: Amastigotes, B: Boost, CpG: Secuencias de citosina y guanina, DTH: Inducción de respuesta DTH, Inh Ac_{CTLA}: Inhibición de anticuerpos anti-parásito, IM: Intramuscular, IV: Intravenoso, LPA: Linfoproliferación, ND: No determinado, NO: Inducción de óxido nítrico, P: *Prime*, PFU: Unidades Formadoras de Colonia, Pmg: Promastigotes, Prot. Rec.: Proteína recombinante, rCPV: Canarypoxvirus Recombinante, rMVA: Virus Ankara Modificado Recombinante, rVV: Virus Vaccinia recombinante, SC: Subcutáneo, T_h1: Perfil de citocinas T_h1, T_h2: Perfil de citocinas T_h2. ⁽¹⁾ Protección parasitológica. Expresada como eficacia (E) referida al porcentaje de individuos con inmunidad estéril, o reducción (R) referida a la disminución de carga parasitaria en comparación con el grupo control. ⁽²⁾ Componentes de la saliva del vector *Lu. longipalpis*.

13. LA UTILIZACIÓN DE LARVAS DE INSECTO INFECTADAS CON BACULOVIRUS COMO SISTEMA DE PRODUCCIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES

Las proteínas recombinantes se pueden obtener utilizando diversos sistemas, como cultivos de microorganismos, cultivos de células de mamífero y vegetales o animales transgénicos (Dingermann, 2008). Desde la obtención de IFN- α humano en células de *Bombyx mori* infectadas con baculovirus (Maeda *et al.*, 1985), numerosas proteínas han sido producidas empleando células o larvas de insecto.

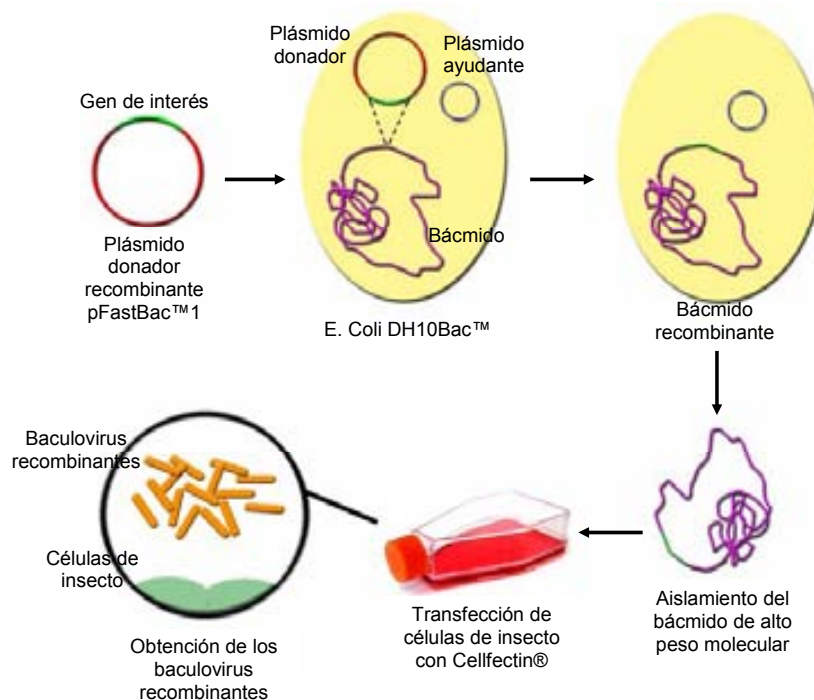
En comparación con el sistema de producción en microorganismos, las proteínas producidas en insecto son sometidas a la mayoría de modificaciones postraduccionales propias de las proteínas eucariotas (Medin *et al.*, 1990). De esta manera, es esperable que la estructura de las proteínas recombinantes producidas en este sistema sea más semejante a la de la proteína nativa que si se utiliza un sistema procarionta para la producción. La importancia de este hecho puede observarse en un estudio donde la inmunización con una proteína recombinante de *Plasmodium berghei* producida en *Bombyx mori* indujo anticuerpos que reconocieron tanto la proteína recombinante como la proteína nativa, mientras que la inmunización con la proteína recombinante producida en *E. coli* no. Esta diferencia fue atribuida a la presencia de epítopos conformacionales, presentes en la proteína producida en *B. mori* y ausentes en la de *E. coli* (Matsuoka *et al.*, 1996). Aunque los insectos carecen de la capacidad para realizar ciertas modificaciones como la N-glicosilación, se está trabajando en estrategias que mejorarían el procesamiento de las proteínas en estos sistemas (Kost *et al.*, 2005).

Las proteínas pueden producirse en cultivos de células de insecto (Hitchman *et al.*, 2009), pero este método es costoso para la producción de grandes cantidades y requiere de un equipamiento especializado. En cambio, la infección de larvas en lugar de células de insecto ha facilitado y abaratado el proceso, permitiendo la obtención de grandes cantidades de proteína a bajo coste. Diversas proteínas han sido producidas en larvas de insecto (Medin *et al.*, 1990; Rabah *et al.*, 2004; O'Connell *et al.*, 2007; Na *et al.*, 2008) y empleadas para fines diagnósticos (Barderas *et al.*, 2000; Gomez-Sebastian *et al.*, 2008; Perez-Martin *et al.*, 2008) y vacunales (Barderas *et al.*, 2001; Perez-Filgueira *et al.*, 2007). Recientemente, una vacuna contra el virus del papiloma humano (Cervarix®) ha sido la primera vacuna producida en el sistema de expresión de baculovirus en células de insecto que ha obtenido el registro sanitario (EMA, 2007).

La obtención de los baculovirus recombinantes se ha visto facilitada por la disponibilidad de kits comerciales (Bac-to-Bac®, Invitrogen). El proceso comienza con la clonación del gen que codifica para la proteína de interés. Este gen se inserta en un plásmido donador (pFastBac1), donde

queda ubicado bajo el control de la secuencia del promotor de la polihedrina y flanqueado por dos secuencias señal de transposición. Estas secuencias marcan la zona que será transpuesta al vector que contiene la información genética del baculovirus (bácmido). El proceso de transposición tiene lugar en el interior de células *E. coli* DH10Bac, las cuales contienen el bácmido, que presenta una secuencia señal que marca el lugar de inserción del gen, y un vector ayudante o *helper*, que codifica proteínas necesarias para la el proceso. Una vez que el gen de interés se ha transpuesto en el bácmido, este bácmido recombinante es aislado y utilizado para transfectar células de insecto, en cuyo interior se ensamblan y multiplican los baculovirus recombinantes. Los baculovirus obtenidos tras esta transformación, se amplifican en varios ciclos de infección en células de insecto, hasta alcanzar un título suficientemente elevado como para infectar larvas de insecto.

Figura 8. Proceso de producción de baculovirus recombinantes



Las especies de insecto lepidóptero más utilizadas para la obtención de proteínas recombinantes son *Bombyx mori* y *Trichoplusia ni*. Para ello, se utilizan generalmente el virus de la nucleopolihedrosis de *Bombix mori* (BmNPV) y el de la nucleopolihedrosis de *Autographa californica* (AcMNPV), en los cuales se inserta el gen que codifica la proteína de interés (Kost *et al.*, 2005). El proceso de expresión *in vivo* ocurre como se explica a continuación. Primero las orugas son infectadas por vía oral o subcutánea con el baculovirus recombinante. La infección progresa por el cuerpo de la oruga y las células que han sido infectadas cesan en su división y redirigen todo su metabolismo a la producción de las proteínas codificadas en el baculovirus

recombinante. La mayor parte de la proteína se produce en el cuerpo graso de la oruga, análogo al hígado de los vertebrados. Tras 72–96 h, cuando se observan signos de la infección, se alcanza el momento de máxima producción. En ese momento las larvas son recogidas y sacrificadas, y se procede a la extracción y purificación de las proteínas, que es más o menos extensa en función de la utilidad que quiera darse a la proteína recombinante (Medin, 1995). Para ciertas aplicaciones, se puede usar directamente un homogenizado de las larvas sin más purificación (Barderas *et al.*, 2000; Barderas *et al.*, 2001; Perez-Filgueira *et al.*, 2007; Gomez-Sebastian *et al.*, 2008; Perez-Martin *et al.*, 2008).

En los estudios de rendimiento, la oruga de *T. ni* presenta el mejor índice de producción de proteínas recombinantes por peso corporal de entre las diferentes especies evaluadas, y además se adapta muy bien a entornos de alta densidad evitándose el canibalismo (Medin *et al.*, 1995; Kovaleva *et al.*, 2009).

Figura 9. Larvas de *Trichoplusia ni*



14. CARACTERÍSTICAS DE LAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES EMPLEADAS EN ESTA TESIS

En esta tesis hemos empleado cuatro proteínas recombinantes de *L. infantum* producidas en el sistema de larvas de *T. ni* infectadas con baculovirus recombinantes: KMP11 (proteína de 11 kDa de la membrana de los kinetoplástidos), TRYP (tryparedoxin peroxidasa), LACK (homólogo de *Leishmania* de los receptores de la kinasa C activada) y papLe22 (proteína de 22 kDa potencialmente agravante de *Leishmania*).

KMP11, también conocido como KMP-11, es un antígeno de membrana, presente de forma abundante en el género *Leishmania* (Tolson *et al.*, 1994) y expresado principalmente en la fase de promastigote (Berberich *et al.*, 1998). Su función biológica es todavía desconocida pero los estudios apuntan a que puede estar implicado en la movilidad del parásito, en su unión a la célula huésped (Thomas *et al.*, 2000) y en la estabilización de la membrana (Jardim *et al.*, 1995).

Diferentes estudios evidencian que KMP11 es inmunógeno de los linfocitos B (Berberich *et al.*, 1997; Ramirez *et al.*, 1998; Trujillo *et al.*, 1999; Jensen *et al.*, 1998; de Carvalho *et al.*, 2003) y de los linfocitos T de pacientes humanos (Kemp *et al.*, 1993; Kurtzhals *et al.*, 1994; Jensen *et al.*, 1998; Delgado *et al.*, 2003; Basu *et al.*, 2007). En los perros, se ha descrito que 24 de 25 individuos infectados naturalmente tienen anticuerpos contra KMP11 (Berberich *et al.*, 1997) y también que los individuos infectados experimentalmente reconocen esta proteína (Nieto *et al.*, 1999; Carrillo *et al.*, 2008).

TRYP, anteriormente conocido como TSA (proteína antioxidante específica de tior), es un enzima con actividad peroxidasa cuya función es la de proteger al parásito contra el estrés oxidativo al que se encuentra sometido tanto en el aparato digestivo del vector como en el interior del macrófago (Levick *et al.*, 1998). También se ha descrito su participación en la resistencia del parásito frente a compuestos antimoniales (Wyllie *et al.*, 2008). Un estudio realizado en pacientes con diversas formas de la enfermedad indica que esta proteína es un moderado inmunógeno de los linfocitos B y un potente estimulador de los linfocitos T (Webb *et al.*, 1998).

LACK es una de las proteínas más estudiadas de *Leishmania* en el ratón, debido a que la respuesta tipo T_H2 no protectora que se observa en el modelo murino BALB/c infectado con *L. major* se inicia al reconocer este antígeno (Launois *et al.*, 1997). Se localiza en el citoplasma cerca del kinetoplasto y probablemente esté implicado en el metabolismo del DNA y del RNA (Gonzalez-Aseguinolaza *et al.*, 1999). Además, constituye un factor de virulencia necesario para el establecimiento de la infección (Kelly *et al.*, 2003). En pacientes humanos, LACK es capaz de estimular los linfocitos B (Maalej *et al.*, 2003). Sobre los linfocitos T de los pacientes con CL, induce un patrón mixto de citocinas T_H1/T_H2 (Bottrel *et al.*, 2001; Maasho *et al.*, 2001; Bourreau *et al.*, 2002; Antonelli *et al.*, 2004; Carvalho *et al.*, 2005).

PapLe22 es una proteína nuclear considerada como potencialmente agravante de la enfermedad. Actúa como un inmunógeno sobre los linfocitos B en pacientes con VL (Suffia *et al.*, 2000) así como en perros infectados naturalmente (Fragaki *et al.*, 2001). Esta proteína induce la producción de IL-10 e inhibe la proliferación de los PBMC de pacientes con VL (Suffia *et al.*, 2000).

Las cuatro proteínas empleadas se han conservado evolutivamente en diferentes especies del parásito, inducen una respuesta humoral y/o celular en los humanos y han sido propuestas como candidatos vacunales contra la leishmaniosis (Palatnik-de-Sousa, 2008). A pesar de ello, poco se ha investigado sobre la respuesta inmunológica que generan en el perro infectado por *L. infantum*, el principal reservorio de la ZVL, y se desconoce si ésta podría aprovecharse para obtener herramientas de control del parásito.

BIBLIOGRAFÍA

- Abranches, P., Santos-Gomes, G., Rachamim, N., Campino, L., Schnur, L. F., and Jaffe, C. L.** (1991a): An experimental model for canine visceral leishmaniasis. *Parasite Immunol* 13, 537-50.
- Abranches, P., Silva-Pereira, M. C., Conceicao-Silva, F. M., Santos-Gomes, G. M., and Janz, J. G.** (1991b): Canine leishmaniasis: pathological and ecological factors influencing transmission of infection. *J Parasitol* 77, 557-61.
- Acedo-Sanchez, C., Morillas-Marquez, F., Sanchiz-Marin, M. C., and Martin-Sanchez, J.** (1998): Changes in antibody titres against *Leishmania infantum* in naturally infected dogs in southern Spain. *Vet Parasitol* 75, 1-8.
- Aguilar-Be, I., da Silva Zardo, R., Paraguai de Souza, E., Borja-Cabrera, G. P., Rosado-Vallado, M., Mut-Martin, M., Garcia-Miss Mdel, R., Palatnik de Sousa, C. B., and Dumonteil, E.** (2005): Cross-protective efficacy of a prophylactic *Leishmania donovani* DNA vaccine against visceral and cutaneous murine leishmaniasis. *Infect Immun* 73, 812-9.
- Ahmed, S., Colmenares, M., Soong, L., Goldsmith-Pestana, K., Munstermann, L., Molina, R., and McMahon-Pratt, D.** (2003): Intradermal infection model for pathogenesis and vaccine studies of murine visceral leishmaniasis. *Infect Immun* 71, 401-10.
- Akopyants, N. S., Kimblin, N., Secundino, N., Patrick, R., Peters, N., Lawyer, P., Dobson, D. E., Beverley, S. M., and Sacks, D. L.** (2009): Demonstration of genetic exchange during cyclical development of *Leishmania* in the sand fly vector. *Science* 324, 265-8.
- Alberola, J., Rodriguez, A., Francino, O., Roura, X., Rivas, L., and Andreu, D.** (2004): Safety and efficacy of antimicrobial peptides against naturally acquired leishmaniasis. *Antimicrob Agents Chemother* 48, 641-3.
- Alexander, J., Satoskar, A. R., and Russell, D. G.** (1999): *Leishmania* species: models of intracellular parasitism. *J Cell Sci* 112 Pt 18, 2993-3002.
- Alexander, J., and Bryson, K.** (2005): T helper (h)1/Th2 and *Leishmania*: paradox rather than paradigm. *Immunol Lett* 99, 17-23.
- Alexandre-Pires, G., Pais, D., Correia, M., and Pina, J. A.** (2006): Leishmaniasis--a report about the microvascular and cellular architecture of the infected spleen in *Canis familiaris*. *Microsc Res Tech* 69, 227-35.
- Almeida, M. A., Jesus, E. E., Sousa-Atta, M. L., Alves, L. C., Berne, M. E., and Atta, A. M.** (2005): Antileishmanial antibody profile in dogs naturally infected with *Leishmania chagasi*. *Vet Immunol Immunopathol* 106, 151-8.
- Alvar, J.** (1994): Leishmaniasis and AIDS co-infection: the Spanish example. *Parasitol Today* 10, 160-3.
- Alvar, J., Molina, R., San Andres, M., Tesouro, M., Nieto, J., Vitutia, M., Gonzalez, F., San Andres, M. D., Boggio, J., Rodriguez, F., and et al.** (1994): Canine leishmaniasis: clinical, parasitological and entomological follow-up after chemotherapy. *Ann Trop Med Parasitol* 88, 371-8.
- Alvar, J., Canavate, C., Molina, R., Moreno, J., and Nieto, J.** (2004): Canine leishmaniasis. *Adv Parasitol* 57, 1-88.
- Alvar, J., Yactayo, S., and Bern, C.** (2006a): Leishmaniasis and poverty. *Trends Parasitol* 22, 552-7.
- Alvar, J., Croft, S., and Olliaro, P.** (2006b): Chemotherapy in the treatment and control of leishmaniasis. *Adv Parasitol* 61, 223-74.
- Alvar, J., Aparicio, P., Aseffa, A., Den Boer, M., Canavate, C., Dedet, J. P., Gradoni, L., Ter Horst, R., Lopez-Velez, R., and Moreno, J.** (2008): The relationship between leishmaniasis and AIDS: the second 10 years. *Clin Microbiol Rev* 21, 334-59.
- Alves, C. F., de Amorim, I. F., Moura, E. P., Ribeiro, R. R., Alves, C. F., Michalick, M. S., Kalapothakis, E., Bruna-Romero, O., Tafuri, W. L., Teixeira, M. M., and Melo, M. N.** (2009): Expression of IFN-gamma, TNF-alpha, IL-10 and TGF-beta in lymph nodes associates with parasite load and clinical form of disease in dogs naturally infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi*. *Vet Immunol Immunopathol* 128, 349-58.
- Amela, C., Mendez, I., Torcal, J. M., Medina, G., Pachon, I., Canavate, C., and Alvar, J.** (1995): Epidemiology of canine leishmaniasis in the Madrid region, Spain. *Eur J Epidemiol* 11, 157-61.
- Anderson, D. C., Buckner, R. G., Glenn, B. L., and MacVean, D. W.** (1980): Endemic canine leishmaniasis. *Vet Pathol* 17, 94-6.
- Andrade, B. B., de Oliveira, C. I., Brodskyn, C. I., Barral, A., and Barral-Netto, M.** (2007): Role of sand fly saliva in human and experimental leishmaniasis: current insights. *Scand J Immunol* 66, 122-7.
- Angel, S. O., Requena, J. M., Soto, M., Criado, D., and Alonso, C.** (1996): During canine leishmaniasis a protein belonging to the 83-kDa heat-shock protein family elicits a strong humoral response. *Acta Trop* 62, 45-56.

- Anjili, C. O., Mbatia, P. A., Mwangi, R. W., Githure, J. I., Olobo, J. O., Robert, L. L., and Koech, D. K. (1995): The chemotactic effect of *Phlebotomus duboscqi* (Diptera: Psychodidae) salivary gland lysates to murine monocytes. *Acta Trop* 60, 97-100.
- Antoine, J. C., Prina, E., Lang, T., and Courret, N. (1998): The biogenesis and properties of the parasitophorous vacuoles that harbour *Leishmania* in murine macrophages. *Trends Microbiol* 6, 392-401.
- Antonelli, L. R., Dutra, W. O., Almeida, R. P., Bacellar, O., and Gollob, K. J. (2004): Antigen specific correlations of cellular immune responses in human leishmaniasis suggests mechanisms for immunoregulation. *Clin Exp Immunol* 136, 341-8.
- Antoniou, M., Haralambous, C., Mazeris, A., Pralong, F., Dedet, J. P., and Soteriadou, K. (2008): *Leishmania donovani* leishmaniasis in Cyprus. *Lancet Infect Dis* 8, 6-7.
- Antunes, C. M., Mayrink, W., Magalhaes, P. A., Costa, C. A., Melo, M. N., Dias, M., Michalick, M. S., Williams, P., Lima, A. O., Vieira, J. B., and *et al.* (1986): Controlled field trials of a vaccine against New World cutaneous leishmaniasis. *Int J Epidemiol* 15, 572-80.
- Araujo, M. S., de Andrade, R. A., Sathler-Avelar, R., Teixeira-Carvalho, A., Andrade, M. C., Vianna, L. R., Mayrink, W., Reis, A. B., Malaquias, L. C., Mello, M. N., and Martins-Filho, O. A. (2009): T-cell-derived cytokines, nitric oxide production by peripheral blood monocytes and seric anti-*Leishmania (Leishmania) chagasi* IgG subclass patterns following immunization against canine visceral leishmaniasis using Leishvaccine and Leishmune. *Vaccine* 27, 1008-17.
- Armijos, R. X., Weigel, M. M., Aviles, H., Maldonado, R., and Racines, J. (1998): Field trial of a vaccine against New World cutaneous leishmaniasis in an at-risk child population: safety, immunogenicity, and efficacy during the first 12 months of follow-up. *J Infect Dis* 177, 1352-7.
- Armijos, R. X., Weigel, M. M., Romero, L., Garcia, V., and Salazar, J. (2003): Field trial of a vaccine against new world cutaneous leishmaniasis in an at-risk child population: how long does protection last? *J Infect Dis* 187, 1959-61.
- Ashford, D. A., Bozza, M., Freire, M., Miranda, J. C., Sherlock, I., Eulalio, C., Lopes, U., Fernandes, O., Degraeve, W., Barker, R. H., Jr., and *et al.* (1995): Comparison of the polymerase chain reaction and serology for the detection of canine visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* 53, 251-5.
- Bahia, D., Gontijo, N. F., Leon, I. R., Perales, J., Pereira, M. H., Oliveira, G., Correa-Oliveira, R., and Reis, A. B. (2007): Antibodies from dogs with canine visceral leishmaniasis recognise two proteins from the saliva of *Lutzomyia longipalpis*. *Parasitol Res* 100, 449-54.
- Baldelli, R., Battelli, G., Maroli, M., Mollicone, E., Gudi, A., Stegagno, G., and Tasini, G. (2001): A new stable focus of canine leishmaniasis in northern Italy. *Parassitologia* 43, 151-3.
- Baneth, G., and Shaw, S. E. (2002): Chemotherapy of canine leishmaniasis. *Vet Parasitol* 106, 315-24.
- Baneth, G., Koutinas, A. F., Solano-Gallego, L., Bourdeau, P., and Ferrer, L. (2008): Canine leishmaniasis - new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. *Trends Parasitol* 24, 324-30.
- Barbieri, C. L. (2006): Immunology of canine leishmaniasis. *Parasite Immunol* 28, 329-37.
- Barderas, M. G., Wigdorovitz, A., Merelo, F., Beitia, F., Alonso, C., Borca, M. V., and Escribano, J. M. (2000): Serodiagnosis of African swine fever using the recombinant protein p30 expressed in insect larvae. *J Virol Methods* 89, 129-36.
- Barderas, M. G., Rodriguez, F., Gomez-Puertas, P., Aviles, M., Beitia, F., Alonso, C., and Escribano, J. M. (2001): Antigenic and immunogenic properties of a chimera of two immunodominant African swine fever virus proteins. *Arch Virol* 146, 1681-91.
- Barral, A., Honda, E., Caldas, A., Costa, J., Vinhas, V., Rowton, E. D., Valenzuela, J. G., Charlab, R., Barral-Netto, M., and Ribeiro, J. M. (2000): Human immune response to sand fly salivary gland antigens: a useful epidemiological marker? *Am J Trop Med Hyg* 62, 740-5.
- Basu, R., Bhaumik, S., Basu, J. M., Naskar, K., De, T., and Roy, S. (2005): Kinetoplastid membrane protein-11 DNA vaccination induces complete protection against both pentavalent antimonial-sensitive and -resistant strains of *Leishmania donovani* that correlates with inducible nitric oxide synthase activity and IL-4 generation: evidence for mixed Th1- and Th2-like responses in visceral leishmaniasis. *J Immunol* 174, 7160-71.
- Basu, R., Roy, S., and Walden, P. (2007): HLA class I-restricted T cell epitopes of the kinetoplastid membrane protein-11 presented by *Leishmania donovani*-infected human macrophages. *J Infect Dis* 195, 1373-80.
- Bates, P. A. (2008): *Leishmania* sand fly interaction: progress and challenges. *Curr Opin Microbiol* 11, 340-4.
- Bayele, H. K., Peyssonnaud, C., Giatromanolaki, A., Arrais-Silva, W. W., Mohamed, H. S., Collins, H., Giorgio, S., Koukourakis, M., Johnson, R. S., Blackwell, J. M., Nizet, V., and Srail, S. K. (2007):

- HIF-1 regulates heritable variation and allele expression phenotypes of the macrophage immune response gene SLC11A1 from a Z-DNA forming microsatellite. *Blood* 110, 3039-48.
- Belkaid, Y., Piccirillo, C. A., Mendez, S., Shevach, E. M., and Sacks, D. L.** (2002): CD4+CD25+ regulatory T cells control *Leishmania major* persistence and immunity. *Nature* 420, 502-7.
- Benderitter, T., Casanova, P., Nashkidachvili, L., and Quilici, M.** (1988): Glomerulonephritis in dogs with canine leishmaniasis. *Ann Trop Med Parasitol* 82, 335-41.
- Berberich, C., Requena, J. M., and Alonso, C.** (1997): Cloning of genes and expression and antigenicity analysis of the *Leishmania infantum* KMP-11 protein. *Exp Parasitol* 85, 105-8.
- Berberich, C., Machado, G., Morales, G., Carrillo, G., Jimenez-Ruiz, A., and Alonso, C.** (1998): The expression of the *Leishmania infantum* KMP-11 protein is developmentally regulated and stage specific. *Biochim Biophys Acta* 1442, 230-7.
- Berman, J.** (2005): Miltefosine to treat leishmaniasis. *Expert Opin Pharmacother* 6, 1381-8.
- Bernadina, W. E., De Luna, R., Oliva, G., and Ciaramella, P.** (1997): An immunodiffusion assay for the detection of canine leishmaniasis due to infection with *Leishmania infantum*. *Vet Parasitol* 73, 207-13.
- Berrahal, F., Mary, C., Roze, M., Berenger, A., Escoffier, K., Lamouroux, D., and Dunan, S.** (1996): Canine leishmaniasis: identification of asymptomatic carriers by polymerase chain reaction and immunoblotting. *Am J Trop Med Hyg* 55, 273-7.
- Bettini, S., Gradoni, L., and Pozio, E.** (1978): Isolation of *Leishmania strains* from *Rattus rattus* in Italy. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 72, 441-2.
- Bhattacharya, S. K., Sur, D., and Karbwang, J.** (2006): Childhood visceral leishmaniasis. *Indian J Med Res* 123, 353-6.
- Bianciardi, P., Fasanella, A., Foglia Manzillo, V., Trotta, T., Pagano, A., Sorino, S., Gradoni, L., and Oliva, G.** (2004): The efficacy of enrofloxacin, alone or combined with metronidazole, in the therapy of canine leishmaniasis. *Parasitol Res* 93, 486-92.
- Biedermann, T., Zimmermann, S., Himmelrich, H., Gumy, A., Egeter, O., Sakrauski, A. K., Seegmuller, I., Voigt, H., Launois, P., Levine, A. D., Wagner, H., Heeg, K., Louis, J. A., and Rocken, M.** (2001): IL-4 instructs TH1 responses and resistance to *Leishmania major* in susceptible BALB/c mice. *Nat Immunol* 2, 1054-60.
- Binhazim A.A., Chapman W.L. Jr., Shin S.S., Hanson W.L.** (1993): Determination of virulence and pathogenesis of a canine strain of *Leishmania leishmania infantum* in hamsters and dogs. *Am J Vet Res* 54, 113-21.
- Bittencourt, A.** (1995): *Leishmaniasis*. Springer.
- Blackwell, J. M., Mohamed, H. S., and Ibrahim, M. E.** (2004): Genetics and visceral leishmaniasis in the Sudan: seeking a link. *Trends Parasitol* 20, 268-74.
- Boarino, A., Scalone, A., Gradoni, L., Ferroglio, E., Vitale, F., Zanatta, R., Giuffrida, M. G., and Rosati, S.** (2005): Development of recombinant chimeric antigen expressing immunodominant B epitopes of *Leishmania infantum* for serodiagnosis of visceral leishmaniasis. *Clin Diagn Lab Immunol* 12, 647-53.
- Boarino, A., Bollo, E., Prunotto, L., Canale, L., Uslenghi, F., and Poletti, P.** (2008): Application of a recombinant protein for the serological diagnosis of canine leishmaniasis. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 31, 527-36.
- Boceta, C., Alonso, C., and Jimenez-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.
- Bogdan, C., Rollinghoff, M., and Solbach, W.** (1990): Evasion strategies of *Leishmania* parasites. *Parasitol Today* 6, 183-7.
- Bogdan, C., Schonian, G., Banuls, A. L., Hide, M., Pratlong, F., Lorenz, E., Rollinghoff, M., and Mertens, R.** (2001): Visceral leishmaniasis in a German child who had never entered a known endemic area: case report and review of the literature. *Clin Infect Dis* 32, 302-6.
- Bories C., Coffin C., Mathieu D., Bories P.N., Scherman E., Rivollet D., Deniau M.** (1998) Lack of a nitric-oxide response during the course of *Leishmania infantum* infection in the golden hamster (*Mesocricetus auratus*), with or without treatment with liposomal amphotericin B. *Ann Trop Med Parasitol* 92, 685-92.
- Borja-Cabrera, G. P., Correia Pontes, N. N., da Silva, V. O., Paraguai de Souza, E., Santos, W. R., Gomes, E. M., Luz, K. G., Palatnik, M., and Palatnik de Sousa, C. B.** (2002): Long lasting protection against canine kala-azar using the FML-QuilA saponin vaccine in an endemic area of Brazil (Sao Goncalo do Amarante, RN). *Vaccine* 20, 3277-84.
- Borja-Cabrera, G. P., Cruz Mendes, A., Paraguai de Souza, E., Hashimoto Okada, L. Y., de, A. T. F. A., Kawasaki, J. K., Costa, A. C., Reis, A. B., Genaro, O., Batista, L. M., Palatnik, M., and Palatnik-**

- de-Sousa, C. B. (2004): Effective immunotherapy against canine visceral leishmaniasis with the FML-vaccine. *Vaccine* 22, 2234-43.
- Borja-Cabrera, G. P., Santos, F. N., Bauer, F. S., Parra, L. E., Menz, I., Morgado, A. A., Soares, I. S., Batista, L. M., and Palatnik-de-Sousa, C. B. (2008): Immunogenicity assay of the Leishmune vaccine against canine visceral leishmaniasis in Brazil. *Vaccine* 26, 4991-7.
- Bottrel, R. L., Dutra, W. O., Martins, F. A., Gontijo, B., Carvalho, E., Barral-Netto, M., Barral, A., Almeida, R. P., Mayrink, W., Locksley, R., and Gollob, K. J. (2001): Flow cytometric determination of cellular sources and frequencies of key cytokine-producing lymphocytes directed against recombinant LACK and soluble *Leishmania* antigen in human cutaneous leishmaniasis. *Infect Immun* 69, 3232-9.
- Bourdoiseau, G., Bonnefont, C., Hoareau, E., Boehringer, C., Stolle, T., and Chabanne, L. (1997a): Specific IgG1 and IgG2 antibody and lymphocyte subset levels in naturally *Leishmania infantum*-infected treated and untreated dogs. *Vet Immunol Immunopathol* 59, 21-30.
- Bourdoiseau, G., Bonnefont, C., Magnol, J. P., Saint-Andre, I., and Chabanne, L. (1997b): Lymphocyte subset abnormalities in canine leishmaniasis. *Vet Immunol Immunopathol* 56, 345-51.
- Bourdoiseau, G., Marchal, T., and Magnol, J. P. (1997c): Immunohistochemical detection of *Leishmania infantum* in formalin-fixed, paraffin-embedded sections of canine skin and lymph nodes. *J Vet Diagn Invest* 9, 439-40.
- Bourreau, E., Prevot, G., Gardon, J., Pradinaud, R., Hasagewa, H., Milon, G., and Launois, P. (2002): LACK-specific CD4(+) T cells that induce gamma interferon production in patients with localized cutaneous leishmaniasis during an early stage of infection. *Infect Immun* 70, 3122-9.
- Bozza, M., Soares, M. B., Bozza, P. T., Satoskar, A. R., Diacovo, T. G., Brombacher, F., Titus, R. G., Shoemaker, C. B., and David, J. R. (1998): The PACAP-type I receptor agonist maxadilan from sand fly saliva protects mice against lethal endotoxemia by a mechanism partially dependent on IL-10. *Eur J Immunol* 28, 3120-7.
- Brachelente, C., Muller, N., Doherr, M. G., Sattler, U., and Welle, M. (2005): Cutaneous leishmaniasis in naturally infected dogs is associated with a T helper-2-biased immune response. *Vet Pathol* 42, 166-75.
- Brandonisio, O., Panaro, M. A., Sisto, M., Acquafredda, A., Fumarola, L., and Leogrande, D. (2000): Interactions between *Leishmania* parasites and host cells. *Parassitologia* 42, 183-90.
- Breton, M., Tremblay, M. J., Ouellette, M., and Papadopolou, B. (2005): Live nonpathogenic parasitic vector as a candidate vaccine against visceral leishmaniasis. *Infect Immun* 73, 6372-82.
- Burns, J. M., Jr., Shreffler, W. G., Benson, D. R., Ghalib, H. W., Badaro, R., and Reed, S. G. (1993): Molecular characterization of a kinesin-related antigen of *Leishmania chagasi* that detects specific antibody in African and American visceral leishmaniasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 775-9.
- Cabral, M., O'Grady, J., and Alexander, J. (1992): Demonstration of *Leishmania* specific cell mediated and humoral immunity in asymptomatic dogs. *Parasite Immunol* 14, 531-9.
- Cabral, M., Mc Nerney, R., Gomes, S., O'Grady, J., Frame, I., Sousa, J. C., Miles, M. A., and Alexander, J. (1993): Demonstration of natural *Leishmania* infection in asymptomatic dogs in the absence of specific humoral immunity. *Arch Inst Pasteur Tunis* 70, 473-9.
- Capelli, G., Baldelli, R., Ferroglio, E., Genchi, C., Gradoni, L., Gramiccia, M., Maroli, M., Mortarino, M., Pietrobelli, M., Rossi, L., and Ruggiero, M. (2004): [Monitoring of canine leishmaniasis in northern Italy: an update from a scientific network]. *Parassitologia* 46, 193-7.
- Cardoso, L., Neto, F., Sousa, J. C., Rodrigues, M., and Cabral, M. (1998): Use of a leishmanin skin test in the detection of canine *Leishmania*-specific cellular immunity. *Vet Parasitol* 79, 213-20.
- Cardoso, L., Rodrigues, M., Santos, H., Schoone, G. J., Carreta, P., Varejao, E., van Benthem, B., Afonso, M. O., Alves-Pires, C., Semiao-Santos, S. J., Rodrigues, J., and Schallig, H. D. (2004): Sero-epidemiological study of canine *Leishmania* spp. infection in the municipality of Alijo (Alto Douro, Portugal). *Vet Parasitol* 121, 21-32.
- Carrillo, E., Ahmed, S., Goldsmith-Pestana, K., Nieto, J., Osorio, Y., Travi, B., Moreno, J., and McMahon-Pratt, D. (2007): Immunogenicity of the P-8 amastigote antigen in the experimental model of canine visceral leishmaniasis. *Vaccine* 25, 1534-43.
- Carrillo, E., Crusat, M., Nieto, J., Chicharro, C., Thomas Mdel, C., Martinez, E., Valladares, B., Canavate, C., Requena, J. M., Lopez, M. C., Alvar, J., and Moreno, J. (2008): Immunogenicity of HSP-70, KMP-11 and PFR-2 leishmanial antigens in the experimental model of canine visceral leishmaniasis. *Vaccine* 26, 1902-11.
- Carrillo, E., and Moreno, J. (2009): Cytokine profiles in canine visceral leishmaniasis. *Vet Immunol Immunopathol* 128, 67-70.

- Carrillo, E.** (2007): Estudio de la inmunogenicidad de candidatos a vacuna contra la leishmaniasis visceral en el modelo canino de infección experimental, pp. 266: Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, Madrid.
- Carrío, J., and Portus, M.** (2002): In vitro susceptibility to pentavalent antimony in *Leishmania infantum* strains is not modified during in vitro or in vivo passages but is modified after host treatment with meglumine antimoniate. *BMC Pharmacol* 2, 11.
- Carrion, J., Folgueira, C., and Alonso, C.** (2008): Immunization strategies against visceral leishmaniasis with the nucleosomal histones of *Leishmania infantum* encoded in DNA vaccine or pulsed in dendritic cells. *Vaccine* 26, 2537-44.
- Carson, C., Antoniou, M., Ruiz-Arguello, M. B., Alcami, A., Christodoulou, V., Messaritakis, I., Blackwell, J. M., and Courtenay, O.** (2009): A prime/boost DNA/Modified vaccinia virus Ankara vaccine expressing recombinant *Leishmania* DNA encoding TRYP is safe and immunogenic in outbred dogs, the reservoir of zoonotic visceral leishmaniasis. *Vaccine* 27, 1080-6.
- Carter, K. C., Gallagher, G., Baillie, A. J., and Alexander, J.** (1989): The induction of protective immunity to *Leishmania major* in the BALB/c mouse by interleukin 4 treatment. *Eur J Immunol* 19, 779-82.
- Carvalho, F. A., Charest, H., Tavares, C. A., Matlashewski, G., Valente, E. P., Rabello, A., Gazzinelli, R. T., and Fernandes, A. P.** (2002): Diagnosis of American visceral leishmaniasis in humans and dogs using the recombinant *Leishmania donovani* A2 antigen. *Diagn Microbiol Infect Dis* 43, 289-95.
- Carvalho, L. P., Passos, S., Dutra, W. O., Soto, M., Alonso, C., Gollob, K. J., Carvalho, E. M., and Ribeiro de Jesus, A.** (2005): Effect of LACK and KMP11 on IFN-gamma production by peripheral blood mononuclear cells from cutaneous and mucosal leishmaniasis patients. *Scand J Immunol* 61, 337-42.
- Carvalho, S. F., Lemos, E. M., Corey, R., and Dietze, R.** (2003): Performance of recombinant K39 antigen in the diagnosis of Brazilian visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* 68, 321-4.
- Cavalcante, R. R., Pereira, M. H., and Gontijo, N. F.** (2003): Anti-complement activity in the saliva of phlebotomine sand flies and other haematophagous insects. *Parasitology* 127, 87-93.
- Ciaramella, P., Oliva, G., Luna, R. D., Gradoni, L., Ambrosio, R., Cortese, L., Scalone, A., and Persechino, A.** (1997): A retrospective clinical study of canine leishmaniasis in 150 dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. *Vet Rec* 141, 539-43.
- Coler, R. N., and Reed, S. G.** (2005): Second-generation vaccines against leishmaniasis. *Trends Parasitol* 21, 244-9.
- Coler, R. N., Goto, Y., Bogatzki, L., Raman, V., and Reed, S. G.** (2007): Leish-111f, a recombinant polyprotein vaccine that protects against visceral Leishmaniasis by elicitation of CD4+ T cells. *Infect Immun* 75, 4648-54.
- Collin, N., Gomes, R., Teixeira, C., Cheng, L., Laughinghouse, A., Ward, J. M., Elnaïem, D. E., Fischer, L., Valenzuela, J. G., and Kamhawi, S.** (2009): Sand fly salivary proteins induce strong cellular immunity in a natural reservoir of visceral leishmaniasis with adverse consequences for *Leishmania*. *PLoS Pathog* 5, e1000441.
- Correa, A. P., Dossi, A. C., de Oliveira Vasconcelos, R., Munari, D. P., and de Lima, V. M.** (2007): Evaluation of transformation growth factor beta1, interleukin-10, and interferon-gamma in male symptomatic and asymptomatic dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi*. *Vet Parasitol* 143, 267-74.
- Cortadellas, O.** (2003): Initial and long-term efficacy of a lipid emulsion of amphotericin B desoxycholate in the management of canine leishmaniasis. *J Vet Intern Med* 17, 808-12.
- Costa, F. A., Guerra J. L., Silva S.M., Klein, R.P., Mendonça I. L., Goto H.** (2000): CD4(+) T cells participate in the nephropathy of canine visceral leishmaniasis. *Braz J Med Biol Res* 33, 1455-8.
- Costa, F. A., Goto, H., Saldanha, L. C., Silva, S. M., Senhorini, I. L., Silva, T. C., and Guerra, J. L.** (2003): Histopathologic patterns of nephropathy in naturally acquired canine visceral leishmaniasis. *Vet Pathol* 40, 677-84.
- Courtenay, O., Quinnell, R. J., Garcez, L. M., Shaw, J. J., and Dye, C.** (2002): Infectiousness in a cohort of Brazilian dogs: why culling fails to control visceral leishmaniasis in areas of high transmission. *J Infect Dis* 186, 1314-20.
- Coutinho, M. T., Bueno, L. L., Sterzik, A., Fujiwara, R. T., Botelho, J. R., De Maria, M., Genaro, O., and Linardi, P. M.** (2005): Participation of Rhipicephalus sanguineus (Acari: Ixodidae) in the epidemiology of canine visceral leishmaniasis. *Vet Parasitol* 128, 149-55.
- Crampton, A., and Vanniasinkam, T.** (2007): Parasite vaccines: the new generation. *Infect Genet Evol* 7, 664-73.
- Cruz, I., Morales, M. A., Noguer, I., Rodriguez, A., and Alvar, J.** (2002): *Leishmania* in discarded syringes from intravenous drug users. *Lancet* 359, 1124-5.

- Chamizo, C., Moreno, J., and Alvar, J.** (2005): Semi-quantitative analysis of cytokine expression in asymptomatic canine leishmaniasis. *Vet Immunol Immunopathol* 103, 67-75.
- Chang, K. P., Reed, S. G., McGwire, B. S., and Soong, L.** (2003): *Leishmania* model for microbial virulence: the relevance of parasite multiplication and pathoantigenicity. *Acta Trop* 85, 375-90.
- Chappuis, F., Sundar, S., Hailu, A., Ghalib, H., Rijal, S., Peeling, R. W., Alvar, J., and Boelaert, M.** (2007): Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? *Nat Rev Microbiol* 5, 873-82.
- da Costa-Val, A. P., Cavalcanti, R. R., de Figueiredo Gontijo, N., Michalick, M. S., Alexander, B., Williams, P., and Melo, M. N.** (2007): Canine visceral leishmaniasis: relationships between clinical status, humoral immune response, haematology and *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* infectivity. *Vet J* 174, 636-43.
- da Costa, R. T., Franca, J. C., Mayrink, W., Nascimento, E., Genaro, O., and Campos-Neto, A.** (2003): Standardization of a rapid immunochromatographic test with the recombinant antigens K39 and K26 for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 97, 678-82.
- da Silva, V. O., Borja-Cabrera, G. P., Correia Pontes, N. N., de Souza, E. P., Luz, K. G., Palatnik, M., and Palatnik de Sousa, C. B.** (2000): A phase III trial of efficacy of the FML-vaccine against canine kala-azar in an endemic area of Brazil (Sao Goncalo do Amaranto, RN). *Vaccine* 19, 1082-92.
- Daneshvar, H., Hagan, P., and Phillips, R. S.** (2003): *Leishmania mexicana* H-line attenuated under pressure of gentamicin, potentiates a Th1 response and control of cutaneous leishmaniasis in BALB/c mice. *Parasite Immunol* 25, 589-96.
- Dantas-Torres, F., and Brandao-Filho, S. P.** (2006): Visceral leishmaniasis in Brazil: revisiting paradigms of epidemiology and control. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 48, 151-6.
- Dantas-Torres, F., de Brito, M. E., and Brandao-Filho, S. P.** (2006): Seroepidemiological survey on canine leishmaniasis among dogs from an urban area of Brazil. *Vet Parasitol* 140, 54-60.
- Dapra, F., Scalone, A., Mignone, W., Ferroglio, E., Mannelli, A., Biglino, A., Zanatta, R., Gradoni, L., and Rosati, S.** (2008): Validation of a recombinant based antibody ELISA for diagnosis of human and canine leishmaniasis. *J Immunoassay Immunochem* 29, 244-56.
- David, J. R., Stamm, L. M., Bezerra, H. S., Souza, R. N., Killick-Kendrick, R., and Lima, J. W.** (2001): Deltamethrin-impregnated dog collars have a potent anti-feeding and insecticidal effect on *Lutzomyia longipalpis* and *Lutzomyia migonei*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 96, 839-47.
- Day, M. J.** (2007): Immunoglobulin G subclass distribution in canine leishmaniasis: a review and analysis of pitfalls in interpretation. *Vet Parasitol* 147, 2-8.
- de Almeida, M. C., Vilhena, V., Barral, A., and Barral-Netto, M.** (2003): Leishmanial infection: analysis of its first steps. A review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 98, 861-70.
- de Carvalho, L. P., Soto, M., Jeronimo, S., Dondji, B., Bacellar, O., Luz, V., Orge Orge, G., Alonso, C., Jesus, A. R., and Carvalho, E. M.** (2003): Characterization of the immune response to *Leishmania infantum* recombinant antigens. *Microbes Infect* 5, 7-12.
- de Luca, P. M., Mayrink, W., Pinto, J. A., Coutinho, S. G., Santiago, M. A., Toledo, V. P., Costa, C. A., Genaro, O., Reis, A. B., and Mendonca, S. C.** (2001): A randomized double-blind placebo-controlled trial to evaluate the immunogenicity of a candidate vaccine against American tegumentary leishmaniasis. *Acta Trop* 80, 251-60.
- de Oliveira C.I., T. M. J., Gomes R. , Barral A. , Brodskyn C.** (2004): Animal models for infectious diseases caused by parasites: Leishmaniasis *Drug Discovery Today: Disease Models* 1, 81-86.
- Delgado, G., Parra-Lopez, C. A., Vargas, L. E., Hoya, R., Estupinan, M., Guzman, F., Torres, A., Alonso, C., Velez, I. D., Spinel, C., and Patarroyo, M. E.** (2003): Characterizing cellular immune response to kinetoplastid membrane protein-11 (KMP-11) during *Leishmania (Viannia) panamensis* infection using dendritic cells (DCs) as antigen presenting cells (APCs). *Parasite Immunol* 25, 199-209.
- Denerolle, P., and Bourdoiseau, G.** (1999): Combination allopurinol and antimony treatment versus antimony alone and allopurinol alone in the treatment of canine leishmaniasis (96 cases). *J Vet Intern Med* 13, 413-5.
- Deplazes, P., Smith, N. C., Arnold, P., Lutz, H., and Eckert, J.** (1995): Specific IgG1 and IgG2 antibody responses of dogs to *Leishmania infantum* and other parasites. *Parasite Immunol* 17, 451-8.
- Dereure, J., Vanwambeke, S. O., Male, P., Martinez, S., Pralong, F., Balard, Y., and Dedet, J. P.** (2009): The Potential Effects of Global Warming on Changes in Canine Leishmaniasis in a Focus outside the Classical Area of the Disease in Southern France. *Vector Borne Zoonotic Dis.*
- Desjeux, P.** (2004): Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 27, 305-18.
- Dingermann, T.** (2008): Recombinant therapeutic proteins: production platforms and challenges. *Biotechnol J* 3, 90-7.

- Donnelly, K. B., Lima, H. C., and Titus, R. G.** (1998): Histologic characterization of experimental cutaneous leishmaniasis in mice infected with *Leishmania braziliensis* in the presence or absence of sand fly vector salivary gland lysate. *J Parasitol* 84, 97-103.
- Dos-Santos, W. L., David, J., Badaro, R., and de-Freitas, L. A.** (2004): Association between skin parasitism and a granulomatous inflammatory pattern in canine visceral leishmaniasis. *Parasitol Res* 92, 89-94.
- Dos-Santos, W. L., Jesus, E. E., Paranhos-Silva, M., Pereira, A. M., Santos, J. C., Baleeiro, C. O., Nascimento, E. G., Moreira, E. D., Oliveira, G. G., and Pontes-de-Carvalho, L. C.** (2008): Associations among immunological, parasitological and clinical parameters in canine visceral leishmaniasis: Emaciation, spleen parasitism, specific antibodies and leishmanin skin test reaction. *Vet Immunol Immunopathol* 123, 251-9.
- Dujardin, J. C., Campino, L., Canavate, C., Dedet, J. P., Gradoni, L., Soteriadou, K., Mazeris, A., Ozbek, Y., and Boelaert, M.** (2008): Spread of vector-borne diseases and neglect of Leishmaniasis, Europe. *Emerg Infect Dis* 14, 1013-8.
- Dunan, S., Frommel, D., Monjour, L., Ogunkolade, B. W., Cruz, A., and Quilici, M.** (1989): Vaccination trial against canine visceral leishmaniasis. Phocian Veterinary Study Group on Visceral Leishmaniasis. *Parasite Immunol* 11, 397-402.
- Dye, C.** (1996): The logic of visceral leishmaniasis control. *Am J Trop Med Hyg* 55, 125-30.
- EMA** (2007). Cervarix®. <<http://www.emea.europa.eu/humandocs/PDFs/EPAR/cervarix/H-721-en6.pdf>>
- Engwerda, C. R., and Kaye, P. M.** (2000): Organ-specific immune responses associated with infectious disease. *Immunol Today* 21, 73-8.
- Enserink, M.** (2000): Infectious diseases. Has leishmaniasis become endemic in the U.S.? *Science* 290, 1881-3.
- Fernandes, A. P., Costa, M. M., Coelho, E. A., Michalick, M. S., de Freitas, E., Melo, M. N., Luiz Tafuri, W., Resende Dde, M., Hermont, V., Abrantes Cde, F., and Gazzinelli, R. T.** (2008): Protective immunity against challenge with *Leishmania (Leishmania) chagasi* in beagle dogs vaccinated with recombinant A2 protein. *Vaccine* 26, 5888-95.
- Fernandez-Bellon, H., Solano-Gallego, L., Rodriguez, A., Rutten, V. P., Hoek, A., Ramis, A., Alberola, J., and Ferrer, L.** (2005): Comparison of three assays for the evaluation of specific cellular immunity to *Leishmania infantum* in dogs. *Vet Immunol Immunopathol* 107, 163-9.
- Fernandez-Perez, F. J., Mendez, S., de la Fuente, C., Cuquerella, M., Gomez, M. T., and Alunda, J. M.** (1999): Value of Western blotting in the clinical follow-up of canine leishmaniasis. *J Vet Diagn Invest* 11, 170-3.
- Ferreira, J. H., Gentil, L. G., Dias, S. S., Fedeli, C. E., Katz, S., and Barbieri, C. L.** (2008): Immunization with the cysteine proteinase Ldcccys1 gene from *Leishmania (Leishmania) chagasi* and the recombinant Ldcccys1 protein elicits protective immune responses in a murine model of visceral leishmaniasis. *Vaccine* 26, 677-85.
- Ferreira, M. G., Fattori, K. R., Souza, F., and Lima, V. M.** (2009): Potential role for dog fleas in the cycle of *Leishmania* spp. *Vet Parasitol*, doi:10.1016/j.vetpar.2009.06.026.
- Ferreira Sde, A., Ituassu, L. T., de Melo, M. N., and de Andrade, A. S.** (2008): Evaluation of the conjunctival swab for canine visceral leishmaniasis diagnosis by PCR-hybridization in Minas Gerais State, Brazil. *Vet Parasitol* 152, 257-63.
- Ferrer, L.** (1992): Leishmaniasis, pp. 266-269. In R. W. Kirk, and J. D. Bonagura (Eds): *Current Veterinary Therapy XI*, Saunders, W.B., Philadelphia.
- Ferroglio, E., Poggi, M., and Triscioglio, A.** (2008): Evaluation of 65% permethrin spot-on and deltamethrin-impregnated collars for canine *Leishmania infantum* infection prevention. *Zoonoses Public Health* 55, 145-8.
- Fisa, R., Gallego, M., Castillejo, S., Aisa, M. J., Serra, T., Riera, C., Carrio, J., Gallego, J., and Portus, M.** (1999): Epidemiology of canine leishmaniasis in Catalonia (Spain) the example of the Priorat focus. *Vet Parasitol* 83, 87-97.
- Fisa, R., Riera, C., Gallego, M., Manubens, J., and Portus, M.** (2001): Nested PCR for diagnosis of canine leishmaniasis in peripheral blood, lymph node and bone marrow aspirates. *Vet Parasitol* 99, 105-11.
- Fondevila, D., Vilafranca, M., and Ferrer, L.** (1997): Epidermal immunocompetence in canine leishmaniasis. *Vet Immunol Immunopathol* 56, 319-27.
- Fortier, A., Min-Oo, G., Forbes, J., Lam-Yuk-Tseung, S., and Gros, P.** (2005): Single gene effects in mouse models of host: pathogen interactions. *J Leukoc Biol* 77, 868-77.
- Fragaki, K., Suffia, I., Ferrua, B., Rousseau, D., Le Fichoux, Y., and Kubar, J.** (2001): Immunisation with DNA encoding *Leishmania infantum* protein papLe22 decreases the frequency of parasitemic episodes in infected hamsters. *Vaccine* 19, 1701-9.

- Franca-Silva, J. C., da Costa, R. T., Siqueira, A. M., Machado-Coelho, G. L., da Costa, C. A., Mayrink, W., Vieira, E. P., Costa, J. S., Genaro, O., and Nascimento, E.** (2003): Epidemiology of canine visceral leishmaniasis in the endemic area of Montes Claros Municipality, Minas Gerais State, Brazil. *Vet Parasitol* 111, 161-73.
- Francino, O., Altet, L., Sanchez-Robert, E., Rodriguez, A., Solano-Gallego, L., Alberola, J., Ferrer, L., Sanchez, A., and Roura, X.** (2006): Advantages of real-time PCR assay for diagnosis and monitoring of canine leishmaniasis. *Vet Parasitol* 137, 214-21.
- Fujiwara, R. T., Vale, A. M., Franca da Silva, J. C., da Costa, R. T., Quetz Jda, S., Martins Filho, O. A., Reis, A. B., Correa Oliveira, R., Machado-Coelho, G. L., Bueno, L. L., Bethony, J. M., Frank, G., Nascimento, E., Genaro, O., Mayrink, W., Reed, S., and Campos-Neto, A.** (2005): Immunogenicity in dogs of three recombinant antigens (TSA, LeIF and LmST11) potential vaccine candidates for canine visceral leishmaniasis. *Vet Res* 36, 827-38.
- Gallego, M., Pratlong, F., Fisa, R., Riera, C., Rioux, J. A., Dedet, J. P., and Portus, M.** (2001): The life-cycle of *Leishmania infantum* MON-77 in the Priorat (Catalonia, Spain) involves humans, dogs and sandflies; also literature review of distribution and hosts of *L. infantum* zymodemes in the Old World. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 95, 269-71.
- Garg, R., and Dube, A.** (2006): Animal models for vaccine studies for visceral leishmaniasis. *Indian J Med Res* 123, 439-54.
- Gavani, A. S., Hodjati, M. H., Mohite, H., and Davies, C. R.** (2002): Effect of insecticide-impregnated dog collars on incidence of zoonotic visceral leishmaniasis in Iranian children: a matched-cluster randomised trial. *Lancet* 360, 374-9.
- Gazzinelli, R. T., and Denkers, E. Y.** (2006): Protozoan encounters with Toll-like receptor signalling pathways: implications for host parasitism. *Nat Rev Immunol* 6, 895-906.
- Gibson-Corley, K. N., Hostetter, J. M., Hostetter, S. J., Mullin, K., Ramer-Tait, A. E., Boggiatto, P. M., and Petersen, C. A.** (2008): Disseminated *Leishmania infantum* infection in two sibling foxhounds due to possible vertical transmission. *Can Vet J* 49, 1005-8.
- Gifawesen C., Farell J. P.** (1989): Comparison of T-cell responses in self-limiting versus progressive visceral *Leishmania donovani* infections in golden hamsters. *Infect Immun* 57, 3091-6.
- Gillespie, R. D., Mbow, M. L., and Titus, R. G.** (2000): The immunomodulatory factors of bloodfeeding arthropod saliva. *Parasite Immunol* 22, 319-31.
- Giunchetti, R. C., Mayrink, W., Genaro, O., Carneiro, C. M., Correa-Oliveira, R., Martins-Filho, O. A., Marques, M. J., Tafuri, W. L., and Reis, A. B.** (2006): Relationship between canine visceral leishmaniasis and the *Leishmania (Leishmania) chagasi* burden in dermal inflammatory foci. *J Comp Pathol* 135, 100-7.
- Giunchetti, R. C., Correa-Oliveira, R., Martins-Filho, O. A., Teixeira-Carvalho, A., Roatt, B. M., de Oliveira Aguiar-Soares, R. D., de Souza, J. V., das Dores Moreira, N., Malaquias, L. C., Mota e Castro, L. L., de Lana, M., and Reis, A. B.** (2007): Immunogenicity of a killed *Leishmania* vaccine with saponin adjuvant in dogs. *Vaccine* 25, 7674-86.
- Giunchetti, R. C., Correa-Oliveira, R., Martins-Filho, O. A., Teixeira-Carvalho, A., Roatt, B. M., de Oliveira Aguiar-Soares, R. D., Coura-Vital, W., de Abreu, R. T., Malaquias, L. C., Gontijo, N. F., Brodskyn, C., de Oliveira, C. I., Costa, D. J., de Lana, M., and Reis, A. B.** (2008a): A killed *Leishmania* vaccine with sand fly saliva extract and saponin adjuvant displays immunogenicity in dogs. *Vaccine* 26, 623-38.
- Giunchetti, R. C., Mayrink, W., Carneiro, C. M., Correa-Oliveira, R., Martins-Filho, O. A., Marques, M. J., Tafuri, W. L., and Reis, A. B.** (2008b): Histopathological and immunohistochemical investigations of the hepatic compartment associated with parasitism and serum biochemical changes in canine visceral leishmaniasis. *Res Vet Sci* 84, 269-77.
- Giunchetti, R. C., Reis, A. B., da Silveira-Lemos, D., Martins-Filho, O. A., Correa-Oliveira, R., Bethony, J., Vale, A. M., da Silva Quetz, J., Bueno, L. L., Franca-Silva, J. C., Nascimento, E., Mayrink, W., and Fujiwara, R. T.** (2008c): Antigenicity of a whole parasite vaccine as promising candidate against canine leishmaniasis. *Res Vet Sci* 85, 106-12.
- Gomes, R. B., Brodskyn, C., de Oliveira, C. I., Costa, J., Miranda, J. C., Caldas, A., Valenzuela, J. G., Barral-Netto, M., and Barral, A.** (2002): Seroconversion against *Lutzomyia longipalpis* saliva concurrent with the development of anti-*Leishmania chagasi* delayed-type hypersensitivity. *J Infect Dis* 186, 1530-4.
- Gomes, D. C., Pinto, E. F., de Melo, L. D., Lima, W. P., Larraga, V., Lopes, U. G., and Rossi-Bergmann, B.** (2007a): Intranasal delivery of naked DNA encoding the LACK antigen leads to protective immunity against visceral leishmaniasis in mice. *Vaccine* 25, 2168-72.

- Gomes, R. B., Mendonca, I. L., Silva, V. C., Ruas, J., Silva, M. B., Cruz, M. S., Barral, A., and Costa, C. H. (2007b): Antibodies against *Lutzomyia longipalpis* saliva in the fox *Cercocyon thous* and the sylvatic cycle of *Leishmania chagasi*. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 101, 127-33.
- Gomes, R., Teixeira, C., Teixeira, M. J., Oliveira, F., Menezes, M. J., Silva, C., de Oliveira, C. I., Miranda, J. C., Elnaiem, D. E., Kamhawi, S., Valenzuela, J. G., and Brodskyn, C. I. (2008): Immunity to a salivary protein of a sand fly vector protects against the fatal outcome of visceral leishmaniasis in a hamster model. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 7845-50.
- Gomez-Ochoa, P., Castillo, J. A., Gascon, M., Zarate, J. J., Alvarez, F., and Couto, C. G. (2009): Use of domperidone in the treatment of canine visceral leishmaniasis: a clinical trial. *Vet J* 179, 259-63.
- Gomez-Sebastian, S., Perez-Filgueira, D. M., Gomez-Casado, E., Nunez, M. C., Sanchez-Ramos, I., Tabares, E., and Escribano, J. M. (2008): DIVA diagnostic of Aujeszky's disease using an insect-derived virus glycoprotein E. *J Virol Methods* 153, 29-35.
- Gonzalez-Aseguinolaza, G., Taladriz, S., Marquet, A., and Larraga, V. (1999): Molecular cloning, cell localization and binding affinity to DNA replication proteins of the p36/LACK protective antigen from *Leishmania infantum*. *Eur J Biochem* 259, 909-16.
- Gonzalez, J. L., Rollan, E., Novoa, C., and Castano, M. (1988): Structural and ultrastructural hepatic changes in experimental canine leishmaniasis. *Histol Histopathol* 3, 323-9.
- Gonzalez, L. M., and Velez, I. D. (2006): [Miltefosine for disseminated cutaneous leishmaniasis]. *Biomedica* 26 Suppl 1, 13-6.
- Gorczynski, R. M. (1985): Immunization of susceptible BALB/c mice against *Leishmania braziliensis*. II. Use of temperature-sensitive avirulent clones of parasite for vaccination purposes. *Cell Immunol* 94, 11-20.
- Goto, Y., Bogatzki, L. Y., Bertholet, S., Coler, R. N., and Reed, S. G. (2007): Protective immunization against visceral leishmaniasis using *Leishmania* sterol 24-c-methyltransferase formulated in adjuvant. *Vaccine* 25, 7450-8.
- Goto, Y., Howard, R. F., Bhatia, A., Trigo, J., Nakatani, M., Netto, E. M., and Reed, S. G. (2009): Distinct antigen recognition pattern during zoonotic visceral leishmaniasis in humans and dogs. *Vet Parasitol* 160, 215-20.
- Gradoni, L., Maroli, M., Gramiccia, M., and Mancianti, F. (1987): *Leishmania infantum* infection rates in *Phlebotomus perniciosus* fed on naturally infected dogs under antimonial treatment. *Med Vet Entomol* 1, 339-42.
- Gradoni, L., Foglia Manzillo, V., Pagano, A., Piantedosi, D., De Luna, R., Gramiccia, M., Scalone, A., Di Muccio, T., and Oliva, G. (2005): Failure of a multi-subunit recombinant leishmanial vaccine (MML) to protect dogs from *Leishmania infantum* infection and to prevent disease progression in infected animals. *Vaccine* 23, 5245-51.
- Gramiccia, M., Gradoni, L., and Orsini, S. (1992): Decreased sensitivity to meglumine antimoniate (Glucantime) of *Leishmania infantum* isolated from dogs after several courses of drug treatment. *Ann Trop Med Parasitol* 86, 613-20.
- Gramiccia, M. (2003): The identification and variability of the parasites causing leishmaniasis in HIV-positive patients in Italy. *Ann Trop Med Parasitol* 97 Suppl 1, 65-73.
- Gramiccia, M., and Gradoni, L. (2005): The current status of zoonotic leishmaniases and approaches to disease control. *Int J Parasitol* 35, 1169-80.
- Grevelink, S. A., and Lerner, E. A. (1996): Leishmaniasis. *J Am Acad Dermatol* 34, 257-72.
- Guarga, J. L., Lucientes, J., Peribanez, M. A., Molina, R., Gracia, M. J., and Castillo, J. A. (2000): Experimental infection of *Phlebotomus perniciosus* and determination of the natural infection rates of *Leishmania infantum* in dogs. *Acta Trop* 77, 203-7.
- Guarga, J. L., Moreno, J., Lucientes, J., Gracia, M. J., Peribanez, M. A., and Castillo, J. A. (2002): Evaluation of a specific immunochemotherapy for the treatment of canine visceral leishmaniasis. *Vet Immunol Immunopathol* 88, 13-20.
- Gurunathan, S., Klinman, D. M., and Seder, R. A. (2000): DNA vaccines: immunology, application, and optimization*. *Annu Rev Immunol* 18, 927-74.
- Habeck, M. (2002): Prime-boost malaria vaccine in field trial. *Lancet Infect Dis* 2, 584.
- Halbig, P., Hodjati, M. H., Mazloumi-Gavvani, A. S., Mohite, H., and Davies, C. R. (2000): Further evidence that deltamethrin-impregnated collars protect domestic dogs from sandfly bites. *Med Vet Entomol* 14, 223-6.
- Hall, L. R., and Titus, R. G. (1995): Sand fly vector saliva selectively modulates macrophage functions that inhibit killing of *Leishmania major* and nitric oxide production. *J Immunol* 155, 3501-6.
- Handman, E. (2001): Leishmaniasis: current status of vaccine development. *Clin Microbiol Rev* 14, 229-43.
- Hanke, T., Samuel, R. V., Blanchard, T. J., Neumann, V. C., Allen, T. M., Boyson, J. E., Sharpe, S. A., Cook, N., Smith, G. L., Watkins, D. I., Cranage, M. P., and McMichael, A. J. (1999): Effective

induction of simian immunodeficiency virus-specific cytotoxic T lymphocytes in macaques by using a multiepitope gene and DNA prime-modified vaccinia virus Ankara boost vaccination regimen. *J Virol* 73, 7524-32.

- Hashiguchi Y, G. E., Uezato H, Kato H, Mimori T, Flor T, Muzzio J, Chum YW, Martini L** (2007): "Comparison of Diffuse (DCL) and Disseminated (DSCL) Cutaneous Leishmaniasis: an Overview of Cases in Ecuador, and a Brief Comment" pp. 175-185. In H. Y. ed. (Ed.): *Studies on New World and Old World Leishmaniasis and their Transmission, with Particular Reference to Ecuador, Peru, Argentina and Pakistan.*, Japan: Kyowa Printing.
- Hemmi, H., Takeuchi, O., Kawai, T., Kaisho, T., Sato, S., Sanjo, H., Matsumoto, M., Hoshino, K., Wagner, H., Takeda, K., and Akira, S.** (2000): A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* 408, 740-5.
- Hitchman, R. B., Possee, R. D., and King, L. A.** (2009): Baculovirus expression systems for recombinant protein production in insect cells. *Recent Pat Biotechnol* 3, 46-54.
- Holzmuller, P., Cavaleyra, M., Moreaux, J., Kovacic, R., Vincendeau, P., Papierok, G., and Lemesre, J. L.** (2005): Lymphocytes of dogs immunised with purified excreted-secreted antigens of *Leishmania infantum* co-incubated with *Leishmania* infected macrophages produce IFN gamma resulting in nitric oxide-mediated amastigote apoptosis. *Vet Immunol Immunopathol* 106, 247-57.
- Holzmuller, P., Bras-Goncalves, R., and Lemesre, J. L.** (2006): Phenotypical characteristics, biochemical pathways, molecular targets and putative role of nitric oxide-mediated programmed cell death in *Leishmania*. *Parasitology* 132 Suppl, S19-32.
- Hommel, M., Jaffe, C. L., Travi, B., and Milon, G.** (1995): Experimental models for leishmaniasis and for testing anti-leishmanial vaccines. *Ann Trop Med Parasitol* 89 Suppl 1, 55-73.
- Hostomska, J., Rohousova, I., Volfova, V., Stanneck, D., Mencke, N., and Volf, P.** (2008): Kinetics of canine antibody response to saliva of the sand fly *Lutzomyia longipalpis*. *Vector Borne Zoonotic Dis* 8, 443-50.
- Hotez, P. J., and Ferris, M. T.** (2006): The antipoverty vaccines. *Vaccine* 24, 5787-99.
- Hotez, P. J., Bottazzi, M. E., Franco-Paredes, C., Ault, S. K., and Periago, M. R.** (2008): The neglected tropical diseases of latin america and the Caribbean: a review of disease burden and distribution and a roadmap for control and elimination. *PLoS Negl Trop Dis* 2, e300.
- Houghton, R. L., Petrescu, M., Benson, D. R., Skeiky, Y. A., Scalone, A., Badaro, R., Reed, S. G., and Gradoni, L.** (1998): A cloned antigen (recombinant K39) of *Leishmania chagasi* diagnostic for visceral leishmaniasis in human immunodeficiency virus type 1 patients and a prognostic indicator for monitoring patients undergoing drug therapy. *J Infect Dis* 177, 1339-44.
- Huygen, K.** (2005): Plasmid DNA vaccination. *Microbes Infect* 7, 932-8.
- Iniesta, L., Gallego, M., and Portus, M.** (2005): Immunoglobulin G and E responses in various stages of canine leishmaniosis. *Vet Immunol Immunopathol* 103, 77-81.
- Janeway, C. A., Jr., and Medzhitov, R.** (2002): Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* 20, 197-216.
- Jardim, A., Hanson, S., Ullman, B., McCubbin, W. D., Kay, C. M., and Olafson, R. W.** (1995): Cloning and structure-function analysis of the *Leishmania donovani* kinetoplastid membrane protein-11. *Biochem J* 305 (Pt 1), 315-20.
- Jensen, A. T., Gasim, S., Ismail, A., Gaafar, A., Kurtzhals, J. A., Kemp, M., El Hassan, A. M., Kharazmi, A., and Theander, T. G.** (1998): Humoral and cellular immune responses to synthetic peptides of the *Leishmania donovani* kinetoplastid membrane protein-11. *Scand J Immunol* 48, 103-9.
- Jha, T. K., Sundar, S., Thakur, C. P., Bachmann, P., Karbwang, J., Fischer, C., Voss, A., and Berman, J.** (1999): Miltefosine, an oral agent, for the treatment of Indian visceral leishmaniasis. *N Engl J Med* 341, 1795-800.
- Jimenez, M., Ferrer-Dufol, M., Canavate, C., Gutierrez-Solar, B., Molina, R., Laguna, F., Lopez-Velez, R., Cercenado, E., Dauden, E., Blazquez, J., and et al.** (1995): Variability of *Leishmania (Leishmania) infantum* among stocks from immunocompromised, immunocompetent patients and dogs in Spain. *FEMS Microbiol Lett* 131, 197-204.
- Joao, A., Pereira, M. A., Cortes, S., and Santos-Gomes, G. M.** (2006): Canine leishmaniasis chemotherapy: dog's clinical condition and risk of *Leishmania* transmission. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med* 53, 540-5.
- Julia, V., and Glaichenhaus, N.** (1999): CD4(+) T cells which react to the *Leishmania major* LACK antigen rapidly secrete interleukin-4 and are detrimental to the host in resistant B10.D2 mice. *Infect Immun* 67, 3641-4.
- Kamhawi, S., Belkaid, Y., Modi, G., Rowton, E., and Sacks, D.** (2000): Protection against cutaneous leishmaniasis resulting from bites of uninfected sand flies. *Science* 290, 1351-4.

- Kamil, A. A., Khalil, E. A., Musa, A. M., Modabber, F., Mukhtar, M. M., Ibrahim, M. E., Zijlstra, E. E., Sacks, D., Smith, P. G., Zicker, F., and El-Hassan, A. M. (2003): Alum-precipitated autoclaved *Leishmania major* plus bacille Calmette-Guerrin, a candidate vaccine for visceral leishmaniasis: safety, skin-delayed type hypersensitivity response and dose finding in healthy volunteers. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 97, 365-8.
- Katz, O., Waitumbi, J. N., Zer, R., and Warburg, A. (2000): Adenosine, AMP, and protein phosphatase activity in sandfly saliva. *Am J Trop Med Hyg* 62, 145-50.
- Kedzierski, L., Sakthianandeswaren, A., Curtis, J. M., Andrews, P. C., Junk, P. C., and Kedzierska, K. (2009): Leishmaniasis: current treatment and prospects for new drugs and vaccines. *Curr Med Chem* 16, 599-614.
- Keenan, C. M., Hendricks, L. D., Lightner, L., and Johnson, A. J. (1984): Visceral leishmaniasis in the German shepherd dog. II. Pathology. *Vet Pathol* 21, 80-6.
- Kelly, B. L., Stetson, D. B., and Locksley, R. M. (2003): *Leishmania major* LACK antigen is required for efficient vertebrate parasitization. *J Exp Med* 198, 1689-98.
- Kemp, M., Kurtzals, J. A., Bendtzen, K., Poulsen, L. K., Hansen, M. B., Koech, D. K., Kharazmi, A., and Theander, T. G. (1993): *Leishmania donovani*-reactive Th1- and Th2-like T-cell clones from individuals who have recovered from visceral leishmaniasis. *Infect Immun* 61, 1069-73.
- Khalil, E. A., El Hassan, A. M., Zijlstra, E. E., Mukhtar, M. M., Ghalib, H. W., Musa, B., Ibrahim, M. E., Kamil, A. A., Elsheikh, M., Babiker, A., and Modabber, F. (2000a): Autoclaved *Leishmania major* vaccine for prevention of visceral leishmaniasis: a randomised, double-blind, BCG-controlled trial in Sudan. *Lancet* 356, 1565-9.
- Khalil, E. A., Elhassan, A. M., Zijlstra, E. E., Osman, O. F., Eljack, I. A., Ibrahim, M. E., Mukhtar, M. M., Ghalib, H. W., and Modabbers, F. (2000b): Safety and immunogenicity of an autoclaved *Leishmania major* vaccine. *East Afr Med J* 77, 468-70.
- Khalil, E. A., Ayed, N. B., Musa, A. M., Ibrahim, M. E., Mukhtar, M. M., Zijlstra, E. E., Elhassan, I. M., Smith, P. G., Kieny, P. M., Ghalib, H. W., Zicker, F., Modabber, F., and Elhassan, A. M. (2005): Dichotomy of protective cellular immune responses to human visceral leishmaniasis. *Clin Exp Immunol* 140, 349-53.
- Khalil, E. A., Musa, A. M., Modabber, F., and El-Hassan, A. M. (2006): Safety and immunogenicity of a candidate vaccine for visceral leishmaniasis (Alum-precipitated autoclaved *Leishmania major* + BCG) in children: an extended phase II study. *Ann Trop Paediatr* 26, 357-61.
- Khoshgoo, N., Zahedifard, F., Azizi, H., Taslimi, Y., Alonso, M. J., and Rafati, S. (2008): Cysteine proteinase type III is protective against *Leishmania infantum* infection in BALB/c mice and highly antigenic in visceral leishmaniasis individuals. *Vaccine* 26, 5822-9.
- Killick-Kendrick, R., Killick-Kendrick, M., Focheux, C., Dereure, J., Puech, M. P., and Cadiergues, M. C. (1997): Protection of dogs from bites of phlebotomine sandflies by deltamethrin collars for control of canine leishmaniasis. *Med Vet Entomol* 11, 105-11.
- Kishore, K., Kumar, V., Kesari, S., Dinesh, D. S., Kumar, A. J., Das, P., and Bhattacharya, S. K. (2006): Vector control in leishmaniasis. *Indian J Med Res* 123, 467-72.
- Knechtli J., Jenni L. (1990): Experimental transmission of *Leishmania infantum* by the bite of *Phlebotomus perniciosus* from Switzerland. *Acta Trop* 47, 213-6.
- Kost, T. A., Condreay, J. P., and Jarvis, D. L. (2005): Baculovirus as versatile vectors for protein expression in insect and mammalian cells. *Nat Biotechnol* 23, 567-75.
- Koutinas, A. F., Polizopoulou, Z. S., Saridomichelakis, M. N., Argyriadis, D., Fytianou, A., and Plevraki, K. G. (1999): Clinical considerations on canine visceral leishmaniasis in Greece: a retrospective study of 158 cases (1989-1996). *J Am Anim Hosp Assoc* 35, 376-83.
- Koutinas, A. F., Saridomichelakis, M. N., Mylonakis, M. E., Leontides, L., Polizopoulou, Z., Billinis, C., Argyriadis, D., Diakou, N., and Papadopoulos, O. (2001): A randomised, blinded, placebo-controlled clinical trial with allopurinol in canine leishmaniasis. *Vet Parasitol* 98, 247-61.
- Kovaleva, E. S., O'Connell, K. P., Buckley, P., Liu, Z., and Davis, D. C. (2009): Recombinant protein production in insect larvae: host choice, tissue distribution, and heterologous gene instability. *Biotechnol Lett* 31, 381-6.
- Kubar, J., and Fragaki, K. (2005): Recombinant DNA-derived leishmania proteins: from the laboratory to the field. *Lancet Infect Dis* 5, 107-14.
- Kubar, J., and Fragaki, K. (2006): *Leishmania* proteins derived from recombinant DNA: current status and next steps. *Trends Parasitol* 22, 111-6.
- Kuhls, K., Chicharro, C., Canavate, C., Cortes, S., Campino, L., Haralambous, C., Soteriadou, K., Pralong, F., Dedet, J. P., Mauricio, I., Miles, M., Schaar, M., Ochsenreither, S., Radtke, O. A., and Schonian, G. (2008): Differentiation and Gene Flow among European Populations of *Leishmania infantum* MON-1. *PLoS Negl Trop Dis* 2, e261.

- Kurtzhals, J. A., Hey, A. S., Jardim, A., Kemp, M., Schaefer, K. U., Odera, E. O., Christensen, C. B., Githure, J. I., Olafson, R. W., Theander, T. G., and *et al.* (1994): Dichotomy of the human T cell response to *Leishmania* antigens. II. Absent or Th2-like response to gp63 and Th1-like response to lipophosphoglycan-associated protein in cells from cured visceral leishmaniasis patients. *Clin Exp Immunol* 96, 416-21.
- Lachaud, L., Chabbert, E., Dubessay, P., Dereure, J., Lamothe, J., Dedet, J. P., and Bastien, P. (2002): Value of two PCR methods for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis and the detection of asymptomatic carriers. *Parasitology* 125, 197-207.
- Lage, R. S., Oliveira, G. C., Busek, S. U., Guerra, L. L., Giunchetti, R. C., Correa-Oliveira, R., and Reis, A. B. (2007): Analysis of the cytokine profile in spleen cells from dogs naturally infected by *Leishmania chagasi*. *Vet Immunol Immunopathol* 115, 135-45.
- Lamothe, J. (2001): Activity of amphotericin B in lipid emulsion in the initial treatment of canine leishmaniasis. *J Small Anim Pract* 42, 170-5.
- Larreta, R., Soto, M., Alonso, C., and Requena, J. M. (2000): *Leishmania infantum*: gene cloning of the GRP94 homologue, its expression as recombinant protein, and analysis of antigenicity. *Exp Parasitol* 96, 108-15.
- Lasri, S., Sahibi, H., Sadak, A., Jaffe, C. L., and Rhalem, A. (1999): Immune responses in vaccinated dogs with autoclaved *Leishmania major* promastigotes. *Vet Res* 30, 441-9.
- Launois, P., Maillard, I., Pingel, S., Swihart, K. G., Xenarios, I., Acha-Orbea, H., Diggelmann, H., Locksley, R. M., MacDonald, H. R., and Louis, J. A. (1997): IL-4 rapidly produced by V beta 4 V alpha 8 CD4+ T cells instructs Th2 development and susceptibility to *Leishmania major* in BALB/c mice. *Immunity* 6, 541-9.
- le Fichoux, Y., Quaranta, J. F., Aufeuve, J. P., Lelievre, A., Marty, P., Suffia, I., Rousseau, D., and Kubar, J. (1999): Occurrence of *Leishmania infantum* parasitemia in asymptomatic blood donors living in an area of endemicity in southern France. *J Clin Microbiol* 37, 1953-7.
- Leandro, C., Santos-Gomes, G. M., Campino, L., Romao, P., Cortes, S., Rolao, N., Gomes-Pereira, S., Rica Capela, M. J., and Abranches, P. (2001): Cell mediated immunity and specific IgG1 and IgG2 antibody response in natural and experimental canine leishmaniasis. *Vet Immunol Immunopathol* 79, 273-84.
- Lemesre, J. L., Holzmuller, P., Cavaleyra, M., Goncalves, R. B., Hottin, G., and Papierok, G. (2005): Protection against experimental visceral leishmaniasis infection in dogs immunized with purified excreted secreted antigens of *Leishmania infantum* promastigotes. *Vaccine* 23, 2825-40.
- Lemesre, J. L., Holzmuller, P., Goncalves, R. B., Bourdoiseau, G., Hugnet, C., Cavaleyra, M., and Papierok, G. (2007): Long-lasting protection against canine visceral leishmaniasis using the LiESAp-MDP vaccine in endemic areas of France: double-blind randomised efficacy field trial. *Vaccine* 25, 4223-34.
- Levick, M. P., Tetaud, E., Fairlamb, A. H., and Blackwell, J. M. (1998): Identification and characterisation of a functional peroxidase from *Leishmania major*. *Mol Biochem Parasitol* 96, 125-37.
- Liese, J., Schleicher, U., and Bogdan, C. (2007): TLR9 signaling is essential for the innate NK cell response in murine cutaneous leishmaniasis. *Eur J Immunol* 37, 3424-34.
- Liese, J., Schleicher, U., and Bogdan, C. (2008): The innate immune response against *Leishmania* parasites. *Immunobiology* 213, 377-87.
- Lima, W. G., Michalick, M. S., de Melo, M. N., Luiz Tafuri, W., and Luiz Tafuri, W. (2004): Canine visceral leishmaniasis: a histopathological study of lymph nodes. *Acta Trop* 92, 43-53.
- Ling, G. V., Ruby, A. L., Harrold, D. R., and Johnson, D. L. (1991): Xanthine-containing urinary calculi in dogs given allopurinol. *J Am Vet Med Assoc* 198, 1935-40.
- Lukes, J., Mauricio, I. L., Schonian, G., Dujardin, J. C., Soteriadou, K., Dedet, J. P., Kuhls, K., Tintaya, K. W., Jirku, M., Chocholova, E., Haralambous, C., Pralong, F., Obornik, M., Horak, A., Ayala, F. J., and Miles, M. A. (2007): Evolutionary and geographical history of the *Leishmania donovani* complex with a revision of current taxonomy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 9375-80.
- Maalej, I. A., Chenik, M., Louzir, H., Ben Salah, A., Bahloul, C., Amri, F., and Dellagi, K. (2003): Comparative evaluation of ELISAs based on ten recombinant or purified *Leishmania* antigens for the serodiagnosis of Mediterranean visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* 68, 312-20.
- Maasho, K., Wolday, D., Edjigu, M., Soderstrom, K., Britton, S., and Akuffo, H. (2001): Induction and abrogation of LACK reactive cells in the evolution of human leishmaniasis. *Clin Exp Immunol* 124, 255-61.
- Maciel, B. L., Lacerda, H. G., Queiroz, J. W., Galvao, J., Pontes, N. N., Dimenstein, R., McGowan, S. E., Pedrosa, L. F., and Jeronimo, S. M. (2008): Association of nutritional status with the response to infection with *Leishmania chagasi*. *Am J Trop Med Hyg* 79, 591-8.

- Maeda, S., Kawai, T., Obinata, M., Fujiwara, H., Horiuchi, T., Saeki, Y., Sato, Y., and Furusawa, M.** (1985): Production of human alpha-interferon in silkworm using a baculovirus vector. *Nature* 315, 592-4.
- Mahmoodi, M., Khamesipour, A., Dowlati, Y., Rafati, S., Momeni, A. Z., Emamjomeh, M., Hejazi, H., and Modabber, F.** (2003): Immune response measured in human volunteers vaccinated with autoclaved *Leishmania major* vaccine mixed with low dose of BCG. *Clin Exp Immunol* 134, 303-8.
- Maia, C., and Campino, L.** (2008): Methods for diagnosis of canine leishmaniasis and immune response to infection. *Vet Parasitol* 158, 274-87.
- Maia, C., Ramada, J., Cristovao, J. M., Goncalves, L., and Campino, L.** (2009): Diagnosis of canine leishmaniasis: conventional and molecular techniques using different tissues. *Vet J* 179, 142-4.
- Mancianti, F., Pedonese, F., and Poli, A.** (1996): Evaluation of dot enzyme-linked immunosorbent assay (dot-ELISA) for the serodiagnosis of canine leishmaniasis as compared with indirect immunofluorescence assay. *Vet Parasitol* 65, 1-9.
- Mancianti, F.** (2004): [Feline leishmaniasis: what's the epidemiological role of the cat?]. *Parassitologia* 46, 203-6.
- Manna, L., Vitale, F., Reale, S., Caracappa, S., Pavone, L. M., Morte, R. D., Cringoli, G., Staiano, N., and Gravino, A. E.** (2004): Comparison of different tissue sampling for PCR-based diagnosis and follow-up of canine visceral leishmaniasis. *Vet Parasitol* 125, 251-62.
- Manna, L., Reale, S., Viola, E., Vitale, F., Manzillo, V. F., Michele, P. L., Caracappa, S., and Gravino, A. E.** (2006): *Leishmania* DNA load and cytokine expression levels in asymptomatic naturally infected dogs. *Vet Parasitol* 142, 271-80.
- Manna, L., Vitale, F., Reale, S., Picillo, E., Neglia, G., Vescio, F., and Gravino, A. E.** (2008): Study of efficacy of miltefosine and allopurinol in dogs with leishmaniasis. *Vet J.* doi:10.1016/j.tvjl.2008.08.009.
- Manna, L., Reale, S., Vitale, F., and Gravino, A. E.** (2009): Evidence for a relationship between *Leishmania* load and clinical manifestations. *Res Vet Sci* 87, 76-78.
- Marin, C., Longoni, S. S., Mateo, H., de Diego, J. A., Alunda, J. M., Minaya, G., and Sanchez-Moreno, M.** (2007): The use of an excreted superoxide dismutase in an ELISA and Western blotting for the diagnosis of *Leishmania (Leishmania) infantum* naturally infected dogs. *Parasitol Res* 101, 801-8.
- Maroli, M., Rossi, L., Baldelli, R., Capelli, G., Ferroglio, E., Genchi, C., Gramiccia, M., Mortarino, M., Pietrobelli, M., and Gradoni, L.** (2008): The northward spread of leishmaniasis in Italy: evidence from retrospective and ongoing studies on the canine reservoir and phlebotomine vectors. *Trop Med Int Health* 13, 256-64.
- Marques-da-Silva, E. A., Coelho, E. A., Gomes, D. C., Vilela, M. C., Masioli, C. Z., Tavares, C. A., Fernandes, A. P., Afonso, L. C., and Rezende, S. A.** (2005): Intramuscular immunization with p36(LACK) DNA vaccine induces IFN-gamma production but does not protect BALB/c mice against *Leishmania chagasi* intravenous challenge. *Parasitol Res* 98, 67-74.
- Martin-Fontecha, A., Thomsen, L. L., Brett, S., Gerard, C., Lipp, M., Lanzavecchia, A., and Sallusto, F.** (2004): Induced recruitment of NK cells to lymph nodes provides IFN-gamma for T(H)1 priming. *Nat Immunol* 5, 1260-5.
- Martin-Sanchez, J., Guilvard, E., Acedo-Sanchez, C., Wolf-Echeverri, M., Sanchiz-Marin, M. C., and Morillas-Marquez, F.** (1994): *Phlebotomus perniciosus* Newstead, 1911, infection by various zymodemes of the *Leishmania infantum* complex in the Granada province (southern Spain). *Int J Parasitol* 24, 405-8.
- Martinez-Moreno, A., Moreno, T., Martinez-Moreno, F. J., Acosta, I., and Hernandez, S.** (1995): Humoral and cell-mediated immunity in natural and experimental canine leishmaniasis. *Vet Immunol Immunopathol* 48, 209-20.
- Mateo, M., Maynard, L., Vischer, C., Bianciardi, P., and Miro, G.** (2009): Comparative study on the short term efficacy and adverse effects of miltefosine and meglumine antimoniate in dogs with natural leishmaniasis. *Parasitol Res* 105, 155-62.
- Mathis, A., and Deplazes, P.** (1995): PCR and in vitro cultivation for detection of *Leishmania* spp. in diagnostic samples from humans and dogs. *J Clin Microbiol* 33, 1145-9.
- Mathur, P., Samantaray, J., and Chauhan, N. K.** (2005): Evaluation of a rapid immunochromatographic test for diagnosis of kala-azar & post kala-azar dermal leishmaniasis at a tertiary care centre of north India. *Indian J Med Res* 122, 485-90.
- Matsuoka, H., Kobayashi, J., Barker, G. C., Miura, K., Chinzei, Y., Miyajima, S., Ishii, A., and Sinden, R. E.** (1996): Induction of anti-malarial transmission blocking immunity with a recombinant ookinete surface antigen of *Plasmodium berghei* produced in silkworm larvae using the baculovirus expression vector system. *Vaccine* 14, 120-6.

- Mayrink, W., Magalhaes, P. A., Dias, M., Da Costa, C. A., Melo, M. N., and Lima, A. O. (1978): Responses to Montenegro antigen after immunization with killed *Leishmania* promastigotes. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 72, 676.
- Mayrink, W., da Costa, C. A., Magalhaes, P. A., Melo, M. N., Dias, M., Lima, A. O., Michalick, M. S., and Williams, P. (1979): A field trial of a vaccine against American dermal leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 73, 385-7.
- Mayrink, W., Genaro, O., Silva, J. C., da Costa, R. T., Tafuri, W. L., Toledo, V. P., da Silva, A. R., Reis, A. B., Williams, P., and da Costa, P. W. (1996): Phase I and II open clinical trials of a vaccine against *Leishmania chagasi* infections in dogs. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 91, 695-7.
- Mbow, M. L., Bleyenbergh, J. A., Hall, L. R., and Titus, R. G. (1998): *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* 161, 5571-7.
- McMahon-Pratt, D., and Alexander, J. (2004): Does the *Leishmania major* paradigm of pathogenesis and protection hold for New World cutaneous leishmaniasis or the visceral disease? *Immunol Rev* 201, 206-24.
- McShane, H. (2002): Prime-boost immunization strategies for infectious diseases. *Curr Opin Mol Ther* 4, 23-7.
- McShane, H., Pathan, A. A., Sander, C. R., Goonetilleke, N. P., Fletcher, H. A., and Hill, A. V. (2005): Boosting BCG with MVA85A: the first candidate subunit vaccine for tuberculosis in clinical trials. *Tuberculosis (Edinb)* 85, 47-52.
- Medin, J. A., Hunt, L., Gathy, K., Evans, R. K., and Coleman, M. S. (1990): Efficient, low-cost protein factories: expression of human adenosine deaminase in baculovirus-infected insect larvae. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 2760-4.
- Medin, J. A., Gathy, K., and Coleman, M. S. (1995): Expression of foreign proteins in *Trichoplusia ni* larvae. *Methods Mol Biol* 39, 265-75.
- Medin, J. A., Gathy, K. and Coleman, M.S. (1995): *Methods in Molecular Biology*, pp. 39: 265-75, Clifton, N.J.
- Meinecke, C. K., Schottelius, J., Oskam, L., and Fleischer, B. (1999): Congenital transmission of visceral leishmaniasis (Kala Azar) from an asymptomatic mother to her child. *Pediatrics* 104, e65.
- Melby, P. C., Tryon, V. V., Chandrasekar, B., and Freeman, G. L. (1998): Cloning of Syrian hamster (*Mesocricetus auratus*) cytokine cDNAs and analysis of cytokine mRNA expression in experimental visceral leishmaniasis. *Infect Immun* 66, 2135-42.
- Melby, P. C., Yang, J., Zhao, W., Perez, L. E., and Cheng, J. (2001): *Leishmania donovani* p36(LACK) DNA vaccine is highly immunogenic but not protective against experimental visceral leishmaniasis. *Infect Immun* 69, 4719-25.
- Melo, F., Amaral, M., Oliveira, P., Lima, W., Andrade, M., Michalick, M., Raso, P., Tafuri, W., and Tafuri, W. (2008): Diffuse intralobular liver fibrosis in dogs naturally infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi*. *Am J Trop Med Hyg* 79, 198-204.
- Meller-Melloul, C., Farnarier, C., Dunan, S., Faugere, B., Franck, J., Mary, C., Bongrand, P., Quilici, M., and Kaplanski, S. (1991): Evidence of subjects sensitized to *Leishmania infantum* on the French Mediterranean coast: differences in gamma interferon production between this population and visceral leishmaniasis patients. *Parasite Immunol* 13, 531-6.
- Menezes, M. J., Costa, D. J., Clarencio, J., Miranda, J. C., Barral, A., Barral-Netto, M., Brodskyn, C., and de Oliveira, C. I. (2008): Immunomodulation of human monocytes following exposure to *Lutzomyia intermedia* saliva. *BMC Immunol* 9, 12.
- Mercier, P., Jasmin, P., and Sanquer, A. (2003): Prevention of sand fly attack by topical application of a permethrin/pyriproxyfen combination on dogs. *Vet Ther* 4, 309-16.
- Mettler, M., Grimm, F., Capelli, G., Camp, H., and Deplazes, P. (2005a): 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, 5515-9.
- Mettler, M., Grimm, F., Naucke, T. J., Maasjost, C., and Deplazes, P. (2005b): [Canine leishmaniasis in Central Europe: retrospective survey and serological study of imported and travelling dogs]. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* 118, 37-44.
- Michalsky, E. M., Rocha, M. F., da Rocha Lima, A. C., Franca-Silva, J. C., Pires, M. Q., Oliveira, F. S., Pacheco, R. S., dos Santos, S. L., Barata, R. A., Romanha, A. J., Fortes-Dias, C. L., and Dias, E. S. (2007): Infectivity of seropositive dogs, showing different clinical forms of leishmaniasis, to *Lutzomyia longipalpis* phlebotomine sand flies. *Vet Parasitol* 147, 67-76.
- Miranda, S., Roura, X., Picado, A., Ferrer, L., and Ramis, A. (2008): Characterization of sex, age, and breed for a population of canine leishmaniasis diseased dogs. *Res Vet Sci* 85, 35-8.

- Miret, J., Nascimento, E., Sampaio, W., Franca, J. C., Fujiwara, R. T., Vale, A., Dias, E. S., Vieira, E., da Costa, R. T., Mayrink, W., Campos Neto, A., and Reed, S. (2008): Evaluation of an immunochemotherapeutic protocol constituted of N-methyl meglumine antimoniate (Glucantime) and the recombinant Leish-110f + MPL-SE vaccine to treat canine visceral leishmaniasis. *Vaccine* 26, 1585-94.
- Miro, G., Galvez, R., Mateo, M., Montoya, A., Descalzo, M. A., and Molina, R. (2007): Evaluation of the efficacy of a topically administered combination of imidacloprid and permethrin against *Phlebotomus perniciosus* in dog. *Vet Parasitol* 143, 375-9.
- Miro, G., Cardoso, L., Pennisi, M. G., Oliva, G., and Baneth, G. (2008): Canine leishmaniasis--new concepts and insights on an expanding zoonosis: part two. *Trends Parasitol* 24, 371-7.
- Mitchell, G. F., Anders, R. F., Chapman, C. B., Roberts-Thomson, I. C., Handman, E., Cruise, K. M., Rickard, M. D., Lightowers, M. W., and Garcia, E. G. (1984): Examination of strategies for vaccination against parasitic infection or disease using mouse models. *Contemp Top Immunobiol* 12, 323-58.
- Mohamed, H. S., Ibrahim, M. E., Miller, E. N., White, J. K., Cordell, H. J., Howson, J. M., Peacock, C. S., Khalil, E. A., El Hassan, A. M., and Blackwell, J. M. (2004): SLC11A1 (formerly NRAMP1) and susceptibility to visceral leishmaniasis in The Sudan. *Eur J Hum Genet* 12, 66-74.
- Mohebbali, M., Fallah, E., Jamshidi, S., H., H. (1998): Vaccine trial against canine leishmaniasis in the Islamic Republic of Iran. *East Mediterr Health J*, 4, 234-238.
- Mohebbali, M., Khamesipour, A., Mobedi, I., Zarei, Z., and Hashemi-Fesharki, R. (2004): Double-blind randomized efficacy field trial of alum precipitated autoclaved *Leishmania major* vaccine mixed with BCG against canine visceral leishmaniasis in Meshkin-Shahr district, I.R. Iran. *Vaccine* 22, 4097-100.
- Mohrs, M., Ledermann, B., Kohler, G., Dorfmüller, A., Gessner, A., and Brombacher, F. (1999): Differences between IL-4- and IL-4 receptor alpha-deficient mice in chronic leishmaniasis reveal a protective role for IL-13 receptor signaling. *J Immunol* 162, 7302-8.
- Molano, I., Alonso, M. G., Miron, C., Redondo, E., Requena, J. M., Soto, M., Nieto, C. G., and Alonso, C. (2003): A *Leishmania infantum* multi-component antigenic protein mixed with live BCG confers protection to dogs experimentally infected with *L. infantum*. *Vet Immunol Immunopathol* 92, 1-13.
- Molina, R., Amela, C., Nieto, J., San-Andrés, M., Gonzalez, F., Castillo, J. A., Lucientes, J., and Alvar, J. (1994): Infectivity of dogs naturally infected with *Leishmania infantum* to colonized *Phlebotomus perniciosus*. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 88, 491-3.
- Molina, R., Miro, G., Galvez, R., Nieto, J., and Descalzo, M. A. (2006): Evaluation of a spray of permethrin and pyriproxyfen for the protection of dogs against *Phlebotomus perniciosus*. *Vet Rec* 159, 206-9.
- Momeni, A. Z., Jalayer, T., Emamjomeh, M., Khamesipour, A., Zicker, F., Ghassemi, R. L., Dowlati, Y., Sharifi, I., Aminjavaheri, M., Shafiei, A., Alimohammadian, M. H., Hashemi-Fesharki, R., Nasser, K., Godal, T., Smith, P. G., and Modabber, F. (1999): A randomised, double-blind, controlled trial of a killed *L. major* vaccine plus BCG against zoonotic cutaneous leishmaniasis in Iran. *Vaccine* 17, 466-72.
- Morales, G., Carrillo, G., Requena, J. M., Guzman, F., Gomez, L. C., Patarroyo, M. E., and Alonso, C. (1997): Mapping of the antigenic determinants of the *Leishmania infantum* gp63 protein recognized by antibodies elicited during canine visceral leishmaniasis. *Parasitology* 114 (Pt 6), 507-16.
- Moreira, M. A., Luvizotto, M. C., Garcia, J. F., Corbett, C. E., and Laurenti, M. D. (2007): Comparison of parasitological, immunological and molecular methods for the diagnosis of leishmaniasis in dogs with different clinical signs. *Vet Parasitol* 145, 245-52.
- Moreno, J., Nieto, J., Chamizo, C., Gonzalez, F., Blanco, F., Barker, D. C., and Alva, J. (1999): The immune response and PBMC subsets in canine visceral leishmaniasis before, and after, chemotherapy. *Vet Immunol Immunopathol* 71, 181-95.
- Moreno, J., and Alvar, J. (2002): Canine leishmaniasis: epidemiological risk and the experimental model. *Trends Parasitol* 18, 399-405.
- Moreno, J., Nieto, J., Masina, S., Canavate, C., Cruz, I., Chicharro, C., Carrillo, E., Napp, S., Raymond, C., Kaye, P. M., Smith, D. F., Fasel, N., and Alvar, J. (2007): Immunization with H1, HASPB1 and MML *Leishmania* proteins in a vaccine trial against experimental canine leishmaniasis. *Vaccine* 25, 5290-300.
- Morris, R. V., Shoemaker, C. B., David, J. R., Lanzaro, G. C., and Titus, R. G. (2001): Sandfly maxadilan exacerbates infection with *Leishmania major* and vaccinating against it protects against *L. major* infection. *J Immunol* 167, 5226-30.
- Mortarino, M., Franceschi, A., Mancianti, F., Bazzocchi, C., Genchi, C., and Bandi, C. (2004): [Quantitative PCR in the diagnosis of *Leishmania*]. *Parassitologia* 46, 163-7.

- Muller, K., van Zandbergen, G., Hansen, B., Laufs, H., Jahnke, N., Solbach, W., and Laskay, T. (2001): Chemokines, natural killer cells and granulocytes in the early course of *Leishmania major* infection in mice. *Med Microbiol Immunol* 190, 73-6.
- Murray, H. W. (2001): Tissue granuloma structure-function in experimental visceral leishmaniasis. *Int J Exp Pathol* 82, 249-67.
- Mylonakis, M. E., Papaioannou, N., Saridomichelakis, M. N., Koutinas, A. F., Billinis, C., and Kontos, V. I. (2005): Cytologic patterns of lymphadenopathy in dogs infected with *Leishmania infantum*. *Vet Clin Pathol* 34, 243-7.
- Na, Z., Huipeng, Y., Lipan, L., Cuiping, C., Umashankar, M. L., Xingmeng, L., Xiaofeng, W., Bing, W., Weizheng, C., and Cen, J. L. (2008): Efficient production of canine interferon-alpha in silkworm *Bombyx mori* by use of a BmNPV/Bac-to-Bac expression system. *Appl Microbiol Biotechnol* 78, 221-6.
- Nadim, A., Javadian, E., Tahvildar-Bidruni, G., and Ghorbani, M. (1983): Effectiveness of leishmanization in the control of cutaneous leishmaniasis. *Bull Soc Pathol Exot Filiales* 76, 377-83.
- Natami, A., Sahibi, H., Lasri, S., Boudouma, M., Guessouss-Idrissi, N., and Rhalem, A. (2000): Serological, clinical and histopathological changes in naturally infected dogs with *Leishmania infantum* in the Khemisset province, Morocco. *Vet Res* 31, 355-63.
- Nieto, C. G., Navarrete, I., Habela, M. A., Serrano, F., and Redondo, E. (1992): Pathological changes in kidneys of dogs with natural *Leishmania* infection. *Vet Parasitol* 45, 33-47.
- Nieto, C. G., Garcia-Alonso, M., Requena, J. M., Miron, C., Soto, M., Alonso, C., and Navarrete, I. (1999): Analysis of the humoral immune response against total and recombinant antigens of *Leishmania infantum*: correlation with disease progression in canine experimental leishmaniasis. *Vet Immunol Immunopathol* 67, 117-30.
- Noazin, S., Modabber, F., Khamesipour, A., Smith, P. G., Moulton, L. H., Nasser, K., Sharifi, I., Khalil, E. A., Bernal, I. D., Antunes, C. M., Kieny, M. P., and Tanner, M. (2008): First generation leishmaniasis vaccines: a review of field efficacy trials. *Vaccine* 26, 6759-67.
- Nogueira, F. S., Moreira, M. A., Borja-Cabrera, G. P., Santos, F. N., Menz, I., Parra, L. E., Xu, Z., Chu, H. J., Palatnik-de-Sousa, C. B., and Luvizotto, M. C. (2005): Leishmune vaccine blocks the transmission of canine visceral leishmaniasis: absence of *Leishmania* parasites in blood, skin and lymph nodes of vaccinated exposed dogs. *Vaccine* 23, 4805-10.
- Noli, C., and Auxilia, S. T. (2005): Treatment of canine Old World visceral leishmaniasis: a systematic review. *Vet Dermatol* 16, 213-32.
- Norsworthy, N. B., Sun, J., Elnaem, D., Lanzaro, G., and Soong, L. (2004): Sand fly saliva enhances *Leishmania amazonensis* infection by modulating interleukin-10 production. *Infect Immun* 72, 1240-7.
- Nylen, S., and Sacks, D. (2007): Interleukin-10 and the pathogenesis of human visceral leishmaniasis. *Trends Immunol* 28, 378-84.
- O'Connell, K. P., Kovaleva, E., Campbell, J. H., Anderson, P. E., Brown, S. G., Davis, D. C., Valdes, J. J., Welch, R. W., Bentley, W. E., and van Beek, N. A. (2007): Production of a recombinant antibody fragment in whole insect larvae. *Mol Biotechnol* 36, 44-51.
- Ogunkolade, B. W., Vouldoukis, I., Frommel, D., Davoust, B., Rhodes-Feuillette, A., and Monjour, L. (1988): Immunization of dogs with a *Leishmania infantum*-derived vaccine. *Vet Parasitol* 28, 33-41.
- Oliva, G., Gradoni, L., Ciaramella, P., De Luna, R., Cortese, L., Orsini, S., Davidson, R. N., and Persechino, A. (1995): Activity of liposomal amphotericin B (AmBisome) in dogs naturally infected with *Leishmania infantum*. *J Antimicrob Chemother* 36, 1013-9.
- Oliveira, G. G., Santoro, F., and Sadigursky, M. (1993): The subclinical form of experimental visceral leishmaniasis in dogs. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 88, 243-8.
- Oliveira, F., Lawyer, P. G., Kamhawi, S., and Valenzuela, J. G. (2008): Immunity to Distinct Sand Fly Salivary Proteins Primes the Anti-*Leishmania* Immune Response towards Protection or Exacerbation of Disease. *PLoS Negl Trop Dis* 2, e226.
- Otranto, D., Paradies, P., Sasanelli, M., Leone, N., de Caprariis, D., Chirico, J., Spinelli, R., Capelli, G., and Brandonisio, O. (2005): Recombinant K39 dipstick immunochromatographic test: a new tool for the serodiagnosis of canine leishmaniasis. *J Vet Diagn Invest* 17, 32-7.
- Otranto, D., Paradies, P., Lia, R. P., Latrofa, M. S., Testini, G., Cantacessi, C., Mencke, N., Galli, G., Capelli, G., and Stanneck, D. (2007): Efficacy of a combination of 10% imidacloprid/50% permethrin for the prevention of leishmaniasis in kennelled dogs in an endemic area. *Vet Parasitol* 144, 270-8.
- Otranto, D., Paradies, P., de Caprariis, D., Stanneck, D., Testini, G., Grimm, F., Deplazes, P., and Capelli, G. (2009): Toward diagnosing *Leishmania infantum* infection in asymptomatic dogs in an area where leishmaniasis is endemic. *Clin Vaccine Immunol* 16, 337-43.

- Owens, S. D., Oakley, D. A., Marryott, K., Hatchett, W., Walton, R., Nolan, T. J., Newton, A., Steurer, F., Schantz, P., and Giger, U. (2001): Transmission of visceral leishmaniasis through blood transfusions from infected English foxhounds to anemic dogs. *J Am Vet Med Assoc* 219, 1076-83.
- Palatnik-de-Sousa, C. B. (2008): Vaccines for leishmaniasis in the fore coming 25 years. *Vaccine* 26, 1709-24.
- Palatnik-de-Sousa, C. B., Barbosa Ade, F., Oliveira, S. M., Nico, D., Bernardo, R. R., Santos, W. R., Rodrigues, M. M., Soares, I., and Borja-Cabrera, G. P. (2008): FML vaccine against canine visceral leishmaniasis: from second-generation to synthetic vaccine. *Expert Rev Vaccines* 7, 833-51.
- Pampiglione, S., Manson-Bahr, P. E., La Placa, M., Borgatti, M. A., and Musumeci, S. (1975): Studies in Mediterranean leishmaniasis. 3. The leishmanin skin test in kala-azar. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 69, 60-8.
- Panaro, M. A., Acquafredda, A., Lisi, S., Lofrumento, D. D., Mitolo, V., Sisto, M., Fasanella, A., Trotta, T., Bertani, F., Consenti, B., and Brandonisio, O. (2001): Nitric oxide production by macrophages of dogs vaccinated with killed *Leishmania infantum* promastigotes. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 24, 187-95.
- Panaro, M. A., Brandonisio, O., de Caprariis, D., Cavallo, P., Cianciulli, A., Mitolo, V., and Otranto, D. (2008): Canine leishmaniasis in Southern Italy: a role for nitric oxide released from activated macrophages in asymptomatic infection? *Parasit Vectors* 1, 10.
- Papadopoulou, B., Roy, G., Breton, M., Kundig, C., Dumas, C., Fillion, I., Singh, A. K., Olivier, M., and Ouellette, M. (2002): Reduced infectivity of a *Leishmania donovani* bioperin transporter genetic mutant and its use as an attenuated strain for vaccination. *Infect Immun* 70, 62-8.
- Papadopoulou, C., Kostoula, A., Dimitriou, D., Panagiou, A., Bobojianni, C., and Antoniadis, G. (2005): Human and canine leishmaniasis in asymptomatic and symptomatic population in Northwestern Greece. *J Infect* 50, 53-60.
- Paradies, P., Capelli, G., Cafarchia, C., de Caprariis, D., Sasanelli, M., and Otranto, D. (2006): Incidences of canine leishmaniasis in an endemic area of southern Italy. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 53, 295-8.
- Pennisi, M. G., De Majo, M., Masucci, M., Britti, D., Vitale, F., and Del Maso, R. (2005): Efficacy of the treatment of dogs with leishmaniosis with a combination of metronidazole and spiramycin. *Vet Rec* 156, 346-9.
- Perez, L. E., Chandrasekar, B., Saldarriaga, O. A., Zhao, W., Arteaga, L. T., Travi, B. L., and Melby, P. C. (2006): Reduced nitric oxide synthase 2 (NOS2) promoter activity in the Syrian hamster renders the animal functionally deficient in NOS2 activity and unable to control an intracellular pathogen. *J Immunol* 176, 5519-28.
- Perez-Filgueira, D. M., Resino-Talavan, P., Cubillos, C., Angulo, I., Barderas, M. G., Barcena, J., and Escribano, J. M. (2007): Development of a low-cost, insect larvae-derived recombinant subunit vaccine against RHDV. *Virology* 364, 422-30.
- Perez-Martin, E., Grau-Roma, L., Argilaguet, J. M., Nofrarias, M., Escribano, J. M., Gomez-Sebastian, S., Segales, J., and Rodriguez, F. (2008): Development of two *Trichoplusia ni* larvae-derived ELISAs for the detection of antibodies against replicase and capsid proteins of porcine circovirus type 2 in domestic pigs. *J Virol Methods* 154, 167-74.
- Peters, N., and Sacks, D. (2006): Immune privilege in sites of chronic infection: *Leishmania* and regulatory T cells. *Immunol Rev* 213, 159-79.
- Peters, N. C., Egen, J. G., Secundino, N., Debrabant, A., Kimblin, N., Kamhawi, S., Lawyer, P., Fay, M. P., Germain, R. N., and Sacks, D. (2008): In vivo imaging reveals an essential role for neutrophils in leishmaniasis transmitted by sand flies. *Science* 321, 970-4.
- Pimenta, P. F., Dos Santos, M. A., and De Souza, W. (1987): Fine structure and cytochemistry of the interaction between *Leishmania mexicana* amazonensis and rat neutrophils and eosinophils. *J Submicrosc Cytol* 19, 387-95.
- Pinelli, E., Boog, C. J., Rutten, V. P., van Dijk, B., Bernadina, W. E., and Ruitenbergh, E. J. (1994a): A canine CD8+ cytotoxic T-cell line specific for *Leishmania infantum*-infected macrophages. *Tissue Antigens* 43, 189-92.
- Pinelli, E., Killick-Kendrick, R., Wagenaar, J., Bernadina, W., del Real, G., and Ruitenbergh, J. (1994b): Cellular and humoral immune responses in dogs experimentally and naturally infected with *Leishmania infantum*. *Infect Immun* 62, 229-35.
- Pinelli, E., Rutten, V. P., Bruysters, M., Moore, P. F., and Ruitenbergh, E. J. (1999): Compensation for decreased expression of B7 molecules on *Leishmania infantum*-infected canine macrophages results in restoration of parasite-specific T-cell proliferation and gamma interferon production. *Infect Immun* 67, 237-43.

- Pinelli, E., Gebhard, D., Mommaas, A. M., van Hoeij, M., Langermans, J. A., Ruitenber, E. J., and Rutten, V. P.** (2000): Infection of a canine macrophage cell line with *Leishmania infantum*: determination of nitric oxide production and anti-leishmanial activity. *Vet Parasitol* 92, 181-9.
- Pinheiro, P. H., Pinheiro, A. N., Ferreira, J. H., Costa, F. A., Katz, S., and Barbieri, C. L.** (2009): A recombinant cysteine proteinase from *Leishmania (Leishmania) chagasi* as an antigen for delayed-type hypersensitivity assays and serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. *Vet Parasitol* 162, 32-9.
- Poli, A., Abramo, F., Mancianti, F., Nigro, M., Pieri, S., and Bionda, A.** (1991): Renal involvement in canine leishmaniasis. A light-microscopic, immunohistochemical and electron-microscopic study. *Nephron* 57, 444-52.
- Poli, A., Sozzi, S., Guidi, G., Bandinelli, P., and Mancianti, F.** (1997): Comparison of aminosidine (paromomycin) and sodium stibogluconate for treatment of canine leishmaniasis. *Vet Parasitol* 71, 263-71.
- Poot, J., Spreuwenberg, K., Sanderson, S. J., Schijns, V. E., Mottram, J. C., Coombs, G. H., and Vermeulen, A. N.** (2006): Vaccination with a preparation based on recombinant cysteine peptidases and canine IL-12 does not protect dogs from infection with *Leishmania infantum*. *Vaccine* 24, 2460-8.
- Poot, J., Janssen, L. H., van Kasteren-Westerneng, T. J., van der Heijden-Liefkens, K. H., Schijns, V. E., and Heckerroth, A.** (2009): Vaccination of dogs with six different candidate leishmaniasis vaccines composed of a chimerical recombinant protein containing ribosomal and histone protein epitopes in combination with different adjuvants. *Vaccine* 27, 4439-46.
- Porrozzì, R., Santos da Costa, M. V., Teva, A., Falqueto, A., Ferreira, A. L., dos Santos, C. D., Fernandes, A. P., Gazzinelli, R. T., Campos-Neto, A., and Grimaldi, G., Jr.** (2007): Comparative evaluation of enzyme-linked immunosorbent assays based on crude and recombinant leishmanial antigens for serodiagnosis of symptomatic and asymptomatic *Leishmania infantum* visceral infections in dogs. *Clin Vaccine Immunol* 14, 544-8.
- Quijada, L., Requena, J. M., Soto, M., and Alonso, C.** (1996): During canine viscero-cutaneous leishmaniasis the anti-Hsp70 antibodies are specifically elicited by the parasite protein. *Parasitology* 112 (Pt 3), 277-84.
- Quinnell, R. J., Courtenay, O., Garcez, L., and Dye, C.** (1997): The epidemiology of canine leishmaniasis: transmission rates estimated from a cohort study in Amazonian Brazil. *Parasitology* 115 (Pt 2), 143-56.
- Quinnell, R. J., Courtenay, O., Davidson, S., Garcez, L., Lambson, B., Ramos, P., Shaw, J. J., Shaw, M. A., and Dye, C.** (2001a): Detection of *Leishmania infantum* by PCR, serology and cellular immune response in a cohort study of Brazilian dogs. *Parasitology* 122, 253-61.
- Quinnell, R. J., Courtenay, O., Shaw, M. A., Day, M. J., Garcez, L. M., Dye, C., and Kaye, P. M.** (2001b): Tissue cytokine responses in canine visceral leishmaniasis. *J Infect Dis* 183, 1421-4.
- Quinnell, R. J., Courtenay, O., Garcez, L. M., Kaye, P. M., Shaw, M. A., Dye, C., and Day, M. J.** (2003a): IgG subclass responses in a longitudinal study of canine visceral leishmaniasis. *Vet Immunol Immunopathol* 91, 161-8.
- Quinnell, R. J., Kennedy, L. J., Barnes, A., Courtenay, O., Dye, C., Garcez, L. M., Shaw, M. A., Carter, S. D., Thomson, W., and Ollier, W. E.** (2003b): Susceptibility to visceral leishmaniasis in the domestic dog is associated with MHC class II polymorphism. *Immunogenetics* 55, 23-8.
- Qureshi, A. A., Asahina, A., Ohnuma, M., Tajima, M., Granstein, R. D., and Lerner, E. A.** (1996): Immunomodulatory properties of maxadilan, the vasodilator peptide from sand fly salivary gland extracts. *Am J Trop Med Hyg* 54, 665-71.
- Rabah, N., Gauthier, D. J., Gauthier, D., and Lazure, C.** (2004): Improved PC1/3 production through recombinant expression in insect cells and larvae. *Protein Expr Purif* 37, 377-84.
- Rafati, S., Nakhaee, A., Taheri, T., Ghashghaii, A., Salmanian, A. H., Jimenez, M., Mohebbali, M., Masina, S., and Fasel, N.** (2003): Expression of cysteine proteinase type I and II of *Leishmania infantum* and their recognition by sera during canine and human visceral leishmaniasis. *Exp Parasitol* 103, 143-51.
- Rafati, S., Nakhaee, A., Taheri, T., Taslimi, Y., Darabi, H., Eravani, D., Sanos, S., Kaye, P., Taghikhani, M., Jamshidi, S., and Rad, M. A.** (2005): Protective vaccination against experimental canine visceral leishmaniasis using a combination of DNA and protein immunization with cysteine proteinases type I and II of *L. infantum*. *Vaccine* 23, 3716-25.
- Rafati, S., Zahedifard, F., Azari, M. K., Taslimi, Y., and Taheri, T.** (2008): *Leishmania infantum*: prime boost vaccination with C-terminal extension of cysteine proteinase type I displays both type 1 and 2 immune signatures in BALB/c mice. *Exp Parasitol* 118, 393-401.

- Ramirez, J. R., Berberich, C., Jaramillo, A., Alonso, C., and Velez, I. V. (1998): Molecular and antigenic characterization of the *Leishmania (Viannia) panamensis* kinetoplastid membrane protein-11. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 93, 247-54.
- Ramiro, M. J., Zarate, J. J., Hanke, T., Rodriguez, D., Rodriguez, J. R., Esteban, M., Lucientes, J., Castillo, J. A., and Larraga, V. (2003): Protection in dogs against visceral leishmaniasis caused by *Leishmania infantum* is achieved by immunization with a heterologous prime-boost regime using DNA and vaccinia recombinant vectors expressing LACK. *Vaccine* 21, 2474-84.
- Ramos, I., Alonso, A., Marcen, J. M., Peris, A., Castillo, J. A., Colmenares, M., and Larraga, V. (2008): Heterologous prime-boost vaccination with a non-replicative vaccinia recombinant vector expressing LACK confers protection against canine visceral leishmaniasis with a predominant Th1-specific immune response. *Vaccine* 26, 333-44.
- Ramshaw, I. A., and Ramsay, A. J. (2000): The prime-boost strategy: exciting prospects for improved vaccination. *Immunol Today* 21, 163-5.
- Reis, A. B., Martins-Filho, O. A., Teixeira-Carvalho, A., Carvalho, M. G., Mayrink, W., Franca-Silva, J. C., Giunchetti, R. C., Genaro, O., and Correa-Oliveira, R. (2006a): Parasite density and impaired biochemical/hematological status are associated with severe clinical aspects of canine visceral leishmaniasis. *Res Vet Sci* 81, 68-75.
- Reis, A. B., Teixeira-Carvalho, A., Giunchetti, R. C., Guerra, L. L., Carvalho, M. G., Mayrink, W., Genaro, O., Correa-Oliveira, R., and Martins-Filho, O. A. (2006b): Phenotypic features of circulating leucocytes as immunological markers for clinical status and bone marrow parasite density in dogs naturally infected by *Leishmania chagasi*. *Clin Exp Immunol* 146, 303-11.
- Reis, A. B., Teixeira-Carvalho, A., Vale, A. M., Marques, M. J., Giunchetti, R. C., Mayrink, W., Guerra, L. L., Andrade, R. A., Correa-Oliveira, R., and Martins-Filho, O. A. (2006c): Isotype patterns of immunoglobulins: hallmarks for clinical status and tissue parasite density in Brazilian dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi*. *Vet Immunol Immunopathol* 112, 102-16.
- Reis, A. B., Martins-Filho, O. A., Teixeira-Carvalho, A., Giunchetti, R. C., Carneiro, C. M., Mayrink, W., Tafuri, W. L., and Correa-Oliveira, R. (2009): Systemic and compartmentalized immune response in canine visceral leishmaniasis. *Vet Immunol Immunopathol* 128, 87-95.
- Reithinger, R., Teodoro, U., and Davies, C. R. (2001): Topical insecticide treatments to protect dogs from sand fly vectors of leishmaniasis. *Emerg Infect Dis* 7, 872-6.
- Reithinger, R., and Davies, C. R. (2002): Canine leishmaniasis: novel strategies for control. *Trends Parasitol* 18, 289-90.
- Requena, J. M., Soto, M., Doria, M. D., and Alonso, C. (2000): Immune and clinical parameters associated with *Leishmania infantum* infection in the golden hamster model. *Vet Immunol Immunopathol* 76, 269-81.
- Rerks-Ngarm, S., Brown, A. E., Khamboonruang, C., Thongcharoen, P., and Kunasol, P. (2006): HIV/AIDS preventive vaccine 'prime-boost' phase III trial: foundations and initial lessons learned from Thailand. *Aids* 20, 1471-9.
- Rhalem, A., Sahibi, H., Guessous-Idrissi, N., Lasri, S., Natami, A., Riyad, M., and Berrag, B. (1999a): Immune response against *Leishmania* antigens in dogs naturally and experimentally infected with *Leishmania infantum*. *Vet Parasitol* 81, 173-84.
- Rhalem, A., Sahibi, H., Lasri, S., and Jaffe, C. L. (1999b): Analysis of immune responses in dogs with canine visceral leishmaniasis before, and after, drug treatment. *Vet Immunol Immunopathol* 71, 69-76.
- Ribeiro, J. M. (1995): Blood-feeding arthropods: live syringes or invertebrate pharmacologists? *Infect Agents Dis* 4, 143-52.
- Riça-Capela M.J., Cortes S., Leandro C., Peleteiro M.C., Santos-Gomes G., Campino L. (2003): Immunological and histopathological studies in a rodent model infected with *Leishmania infantum* promastigotes or amastigotes. *Parasitol Res* 89, 163-9.
- Riera, C., Valladares, J. E., Gallego, M., Aisa, M. J., Castillejo, S., Fisa, R., Ribas, N., Carrio, J., Alberola, J., and 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.
- Riera, C., Fisa, R., Udina, M., Gallego, M., and Portus, M. (2004): 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* 98, 102-10.
- Rioux, J.-A., Guilvard, E., Gállego, J., Moreno, G., Pratlong, F., Portús, M., et al. (1986): *Phlebotomus ariasi* Tonnoir, 1921 et *Phlebotomus perniciosus* Newstead, 1911 vecteurs du complexe *Leishmania infantum* dans un meme foyer. Infestations par deux zymodemes syntopiques. A propos d'une

- enquete en Catalogne (Espagne), IMEEE, *Leishmania*. Taxonomie et Phylogenese. Applications Éco-Épidémiologiques. IMEEE, Montpellier, 439-444.
- Ritmeijer, K., Melaku, Y., Mueller, M., Kipngetch, S., O'Keeffe, C., and Davidson, R. N.** (2006): Evaluation of a new recombinant K39 rapid diagnostic test for Sudanese visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* 74, 76-80.
- Rivier, D., Shah, R., Bovay, P., and Mauel, J.** (1993): Vaccine development against cutaneous leishmaniasis. Subcutaneous administration of radioattenuated parasites protects CBA mice against virulent *Leishmania major* challenge. *Parasite Immunol* 15, 75-84.
- Roberts, C. W., Walker, W., and Alexander, J.** (2001): Sex-associated hormones and immunity to protozoan parasites. *Clin Microbiol Rev* 14, 476-88.
- Rodrigues, C. A., Batista, L. F., Teixeira, M. C., Pereira, A. M., Santos, P. O., de Sa Oliveira, G. G., de Freitas, L. A., and Veras, P. S.** (2007): Peripheral blood mononuclear cell supernatants from asymptomatic dogs immunized and experimentally challenged with *Leishmania chagasi* can stimulate canine macrophages to reduce infection in vitro. *Vet Parasitol* 143, 197-205.
- Rodrigues, O. R., Marques, C., Soares-Clemente, M., Ferronha, M. H., and Santos-Gomes, G. M.** (2009): Identification of regulatory T cells during experimental *Leishmania infantum* infection. *Immunobiology* 214, 101-111.
- Rodriguez-Cortes, A., Fernandez-Bellon, H., Ramis, A., Ferrer, L., Alberola, J., and Solano-Gallego, L.** (2007a): *Leishmania*-specific isotype levels and their relationship with specific cell-mediated immunity parameters in canine leishmaniasis. *Vet Immunol Immunopathol* 116, 190-8.
- Rodriguez-Cortes, A., Ojeda, A., Lopez-Fuertes, L., Timon, M., Altet, L., Solano-Gallego, L., Sanchez-Robert, E., Francino, O., and Alberola, J.** (2007b): A long term experimental study of canine visceral leishmaniasis. *Int J Parasitol* 37, 683-93.
- Rodriguez-Cortes, A., Ojeda, A., Lopez-Fuertes, L., Timon, M., Altet, L., Solano-Gallego, L., Sanchez-Robert, E., Francino, O., and Alberola, J.** (2007c): Vaccination with plasmid DNA encoding KMP11, TRYP, LACK and GP63 does not protect dogs against *Leishmania infantum* experimental challenge. *Vaccine* 25, 7962-71.
- Rogers, M. E., Ilg, T., Nikolaev, A. V., Ferguson, M. A., and Bates, P. A.** (2004): Transmission of cutaneous leishmaniasis by sand flies is enhanced by regurgitation of fPPG. *Nature* 430, 463-7.
- Rogers, M. E., and Bates, P. A.** (2007): *Leishmania* manipulation of sand fly feeding behavior results in enhanced transmission. *PLoS Pathog* 3, e91.
- Rosario, E. Y., Genaro, O., Franca-Silva, J. C., da Costa, R. T., Mayrink, W., Reis, A. B., and Carneiro, M.** (2005): Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay using crude *Leishmania* and recombinant antigens as a diagnostic marker for canine visceral leishmaniasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 100, 197-203.
- Rosati, S., Ortoffi, M., Profiti, M., Mannelli, A., Mignone, W., Bollo, E., and Gradoni, L.** (2003): Prokaryotic expression and antigenic characterization of three recombinant *Leishmania* antigens for serological diagnosis of canine leishmaniasis. *Clin Diagn Lab Immunol* 10, 1153-6.
- Rosypal, A. C., Troy, G. C., Zajac, A. M., Frank, G., and Lindsay, D. S.** (2005): Transplacental transmission of a North American isolate of *Leishmania infantum* in an experimentally infected beagle. *J Parasitol* 91, 970-2.
- Rougier, S., Vouldoukis, I., Fournel, S., Peres, S., and Woehrle, F.** (2008): Efficacy of different treatment regimens of marbofloxacin in canine visceral leishmaniasis: a pilot study. *Vet Parasitol* 153, 244-54.
- Sacks, D., and Sher, A.** (2002): Evasion of innate immunity by parasitic protozoa. *Nat Immunol* 3, 1041-7.
- Saldarriaga, O. A., Travi, B. L., Park, W., Perez, L. E., and Melby, P. C.** (2006): Immunogenicity of a multicomponent DNA vaccine against visceral leishmaniasis in dogs. *Vaccine* 24, 1928-40.
- Sanchez-Robert, E., Altet, L., Alberola, J., Rodriguez-Cortes, A., Ojeda, A., Lopez-Fuertes, L., Timon, M., Sanchez, A., and Francino, O.** (2008a): Longitudinal analysis of cytokine gene expression and parasite load in PBMC in *Leishmania infantum* experimentally infected dogs. *Vet Immunol Immunopathol* 125, 168-75.
- Sanchez-Robert, E., Altet, L., Utzet-Sadurni, M., Giger, U., Sanchez, A., and Francino, O.** (2008b): Slc11a1 (formerly Nramp1) and susceptibility to canine visceral leishmaniasis. *Vet Res* 39, 36.
- Sanchez, M. A., Diaz, N. L., Zerpa, O., Negron, E., Convit, J., and Tapia, F. J.** (2004): Organ-specific immunity in canine visceral leishmaniasis: analysis of symptomatic and asymptomatic dogs naturally infected with *Leishmania chagasi*. *Am J Trop Med Hyg* 70, 618-24.
- Santana, C. C., Vassallo, J., de Freitas, L. A., Oliveira, G. G., Pontes-de-Carvalho, L. C., and dos-Santos, W. L.** (2008): Inflammation and structural changes of splenic lymphoid tissue in visceral leishmaniasis: a study on naturally infected dogs. *Parasite Immunol* 30, 515-24.

- Santos-Gomes, G. M., Rosa, R., Leandro, C., Cortes, S., Romao, P., and Silveira, H.** (2002): Cytokine expression during the outcome of canine experimental infection by *Leishmania infantum*. *Vet Immunol Immunopathol* 88, 21-30.
- Santos, F. N., Borja-Cabrera, G. P., Miyashiro, L. M., Grechi, J., Reis, A. B., Moreira, M. A., Martins Filho, O. A., Luvizotto, M. C., Menz, I., Pessoa, L. M., Goncalves, P. R., Palatnik, M., and Palatnik-de-Sousa, C. B.** (2007): Immunotherapy against experimental canine visceral leishmaniasis with the saponin enriched-Leishmune vaccine. *Vaccine* 25, 6176-90.
- Saraiva, E. M., de Figueiredo Barbosa, A., Santos, F. N., Borja-Cabrera, G. P., Nico, D., Souza, L. O., de Oliveira Mendes-Aguiar, C., de Souza, E. P., Fampa, P., Parra, L. E., Menz, I., Dias, J. G., Jr., de Oliveira, S. M., and Palatnik-de-Sousa, C. B.** (2006): The FML-vaccine (Leishmune) against canine visceral leishmaniasis: a transmission blocking vaccine. *Vaccine* 24, 2423-31.
- Saravia, N. G., Escorcia, B., Osorio, Y., Valderrama, L., Brooks, D., Arteaga, L., Coombs, G., Mottram, J., and Travi, B. L.** (2006): Pathogenicity and protective immunogenicity of cysteine proteinase-deficient mutants of *Leishmania mexicana* in non-murine models. *Vaccine* 24, 4247-59.
- Sato, Y., Roman, M., Tighe, H., Lee, D., Corr, M., Nguyen, M. D., Silverman, G. J., Lotz, M., Carson, D. A., and Raz, E.** (1996): Immunostimulatory DNA sequences necessary for effective intradermal gene immunization. *Science* 273, 352-4.
- Satti, I. N., Osman, H. Y., Daifalla, N. S., Younis, S. A., Khalil, E. A., Zijlstra, E. E., El Hassan, A. M., and Ghalib, H. W.** (2001): Immunogenicity and safety of autoclaved *Leishmania major* plus BCG vaccine in healthy Sudanese volunteers. *Vaccine* 19, 2100-6.
- Scalone, A., De Luna, R., Oliva, G., Baldi, L., Satta, G., Vesco, G., Mignone, W., Turilli, C., Mondesire, R. R., Simpson, D., Donoghue, A. R., Frank, G. R., and Gradoni, L.** (2002): Evaluation of the *Leishmania* recombinant K39 antigen as a diagnostic marker for canine leishmaniasis and validation of a standardized enzyme-linked immunosorbent assay. *Vet Parasitol* 104, 275-85.
- Schantz, P. M., Steurer, F. J., Duprey, Z. H., Kurpel, K. P., Barr, S. C., Jackson, J. E., Breitschwerdt, E. B., Levy, M. G., and Fox, J. C.** (2005): Autochthonous visceral leishmaniasis in dogs in North America. *J Am Vet Med Assoc* 226, 1316-22.
- Schleicher, U., Liese, J., Knippertz, I., Kurzmann, C., Hesse, A., Heit, A., Fischer, J. A., Weiss, S., Kalinke, U., Kunz, S., and Bogdan, C.** (2007): NK cell activation in visceral leishmaniasis requires TLR9, myeloid DCs, and IL-12, but is independent of plasmacytoid DCs. *J Exp Med* 204, 893-906.
- Schneider, J., Gilbert, S. C., Blanchard, T. J., Hanke, T., Robson, K. J., Hannan, C. M., Becker, M., Sinden, R., Smith, G. L., and Hill, A. V.** (1998): Enhanced immunogenicity for CD8+ T cell induction and complete protective efficacy of malaria DNA vaccination by boosting with modified vaccinia virus Ankara. *Nat Med* 4, 397-402.
- Seder, R. A., and Gurunathan, S.** (1999): DNA vaccines--designer vaccines for the 21st century. *N Engl J Med* 341, 277-8.
- Sharma, U., and Singh, S.** (2008): Insect vectors of *Leishmania*: distribution, physiology and their control. *J Vector Borne Dis* 45, 255-72.
- Shaw, J.** (2007): The leishmaniasis--survival and expansion in a changing world. A mini-review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 102, 541-7.
- Shaw, S. E., Langton, D. A., and Hillman, T. J.** (2009): Canine leishmaniasis in the United Kingdom: A zoonotic disease waiting for a vector? *Vet Parasitol.* 26, 281-5.
- Sideris, V., Papadopoulou, G., Dotsika, E., and Karagouni, E.** (1999): Asymptomatic canine leishmaniasis in Greater Athens area, Greece. *Eur J Epidemiol* 15, 271-6.
- Silva, F. L., Oliveira, R. G., Silva, T. M., Xavier, M. N., Nascimento, E. F., and Santos, R. L.** (2009): Venereal transmission of canine visceral leishmaniasis. *Vet Parasitol* 160, 55-9.
- Silvestre, R., Cordeiro-Da-Silva, A., Santarem, N., Vergnes, B., Sereno, D., and Ouaiissi, A.** (2007): SIR2-deficient *Leishmania infantum* induces a defined IFN-gamma/IL-10 pattern that correlates with protection. *J Immunol* 179, 3161-70.
- Silvestre, R., Cordeiro-da-Silva, A., and Ouaiissi, A.** (2008): Live attenuated *Leishmania* vaccines: a potential strategic alternative. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 56, 123-6.
- Sinden, R. E.** (1993): Antimalarial transmission-blocking vaccines. *Sci Prog* 77 (Pt 1-2), 1-14.
- Singh, S., Gilman-Sachs, A., Chang, K. P., and Reed, S. G.** (1995): Diagnostic and prognostic value of K39 recombinant antigen in Indian leishmaniasis. *J Parasitol* 81, 1000-3.
- Singh, N.** (2006): Drug resistance mechanisms in clinical isolates of *Leishmania donovani*. *Indian J Med Res* 123, 411-22.
- Sisto, M., Brandonisio, O., Panaro, M. A., Acquafredda, A., Leogrande, D., Fasanella, A., Trotta, T., Fumarola, L., and Mitolo, V.** (2001): Inducible nitric oxide synthase expression in *Leishmania*-infected dog macrophages. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 24, 247-54.

- Slappendel, R. J.** (1988): Canine leishmaniasis. A review based on 95 cases in The Netherlands. *Vet Q* 10, 1-16.
- Soares, M. B., Titus, R. G., Shoemaker, C. B., David, J. R., and Bozza, M.** (1998): The vasoactive peptide maxadilan from sand fly saliva inhibits TNF-alpha and induces IL-6 by mouse macrophages through interaction with the pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) receptor. *J Immunol* 160, 1811-6.
- Sobrinho, R., Ferroglio, E., Oleaga, A., Romano, A., Millan, J., Revilla, M., Arnal, M. C., Trisciuglio, A., and Gortazar, C.** (2008): Characterization of widespread canine leishmaniasis among wild carnivores from Spain. *Vet Parasitol* 155, 198-203.
- Solano-Gallego, L., Llull, J., Ramos, G., Riera, C., Arboix, M., Alberola, J., and Ferrer, L.** (2000): The Ibizaian hound presents a predominantly cellular immune response against natural *Leishmania* infection. *Vet Parasitol* 90, 37-45.
- Solano-Gallego, L., Llull, J., Arboix, M., Ferrer, L., and Alberola, J.** (2001a): Evaluation of the efficacy of two leishmanins in asymptomatic dogs. *Vet Parasitol* 102, 163-6.
- Solano-Gallego, L., Morell, P., Arboix, M., Alberola, J., and Ferrer, L.** (2001b): 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, 560-3.
- Solano-Gallego, L., Riera, C., Roura, X., Iniesta, L., Gallego, M., Valladares, J. E., Fisa, R., Castillejo, S., Alberola, J., Ferrer, L., Arboix, M., and Portus, M.** (2001c): *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, 265-76.
- Solano-Gallego, L., Fernandez-Bellon, H., Serra, R., Gallego, M., Ramis, A., Fondevila, D., and Ferrer, L.** (2003a): Cutaneous leishmaniosis in three horses in Spain. *Equine Vet J* 35, 320-3.
- Solano-Gallego, L., Rodriguez, A., Iniesta, L., Arboix, M., Portus, M., and Alberola, J.** (2003b): Detection of anti-*Leishmania* immunoglobulin G antibodies in urine specimens of dogs with leishmaniasis. *Clin Diagn Lab Immunol* 10, 849-55.
- Solano-Gallego, L., Fernandez-Bellon, H., Morell, P., Fondevila, D., Alberola, J., Ramis, A., and Ferrer, L.** (2004): Histological and immunohistochemical study of clinically normal skin of *Leishmania infantum*-infected dogs. *J Comp Pathol* 130, 7-12.
- Solano-Gallego, L., Llull, J., Osso, M., Hegarty, B., and Breitschwerdt, E.** (2006): A serological study of exposure to arthropod-borne pathogens in dogs from northeastern Spain. *Vet Res* 37, 231-44.
- Solano-Gallego, L., Koutinas, A., Miro, G., Cardoso, L., Pennisi, M. G., Ferrer, L., Bourdeau, P., Oliva, G., and Baneth, G.** (2009): Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniosis. *Vet Parasitol*. doi:10.1016/j.vetpar.2009.05.022.
- Soto, M., Requena, J. M., Quijada, L., Angel, S. O., Gomez, L. C., Guzman, F., Patarroyo, M. E., and Alonso, C.** (1995a): During active viscerocutaneous leishmaniasis the anti-P2 humoral response is specifically triggered by the parasite P proteins. *Clin Exp Immunol* 100, 246-52.
- Soto, M., Requena, J. M., Quijada, L., Garcia, M., Guzman, F., Patarroyo, M. E., and Alonso, C.** (1995b): Mapping of the linear antigenic determinants from the *Leishmania infantum* histone H2A recognized by sera from dogs with leishmaniasis. *Immunol Lett* 48, 209-14.
- Soto, M., Requena, J. M., Quijada, L., Guzman, F., Patarroyo, M. E., and Alonso, C.** (1995c): Identification of the *Leishmania infantum* P0 ribosomal protein epitope in canine visceral leishmaniasis. *Immunol Lett* 48, 23-8.
- Soto, M., Requena, J. M., Quijada, L., Gomez, L. C., Guzman, F., Patarroyo, M. E., and Alonso, C.** (1996): Characterization of the antigenic determinants of the *Leishmania infantum* histone H3 recognized by antibodies elicited during canine visceral leishmaniasis. *Clin Exp Immunol* 106, 454-61.
- Soto, M., Requena, J. M., Quijada, L., and Alonso, C.** (1998): Multicomponent chimeric antigen for serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. *J Clin Microbiol* 36, 58-63.
- Soto, M., Requena, J. M., Quijada, L., Perez, M. J., Nieto, C. G., Guzman, F., Patarroyo, M. E., and Alonso, C.** (1999): Antigenicity of the *Leishmania infantum* histones H2B and H4 during canine viscerocutaneous leishmaniasis. *Clin Exp Immunol* 115, 342-9.
- Stager, S., Smith, D. F., and Kaye, P. M.** (2000): Immunization with a recombinant stage-regulated surface protein from *Leishmania donovani* induces protection against visceral leishmaniasis. *J Immunol* 165, 7064-71.
- Stager, S., Alexander, J., Carter, K. C., Brombacher, F., and Kaye, P. M.** (2003): Both interleukin-4 (IL-4) and IL-4 receptor alpha signaling contribute to the development of hepatic granulomas with optimal antileishmanial activity. *Infect Immun* 71, 4804-7.
- Stetson, D. B., Mohrs, M., Mallet-Designe, V., Teyton, L., and Locksley, R. M.** (2002): Rapid expansion and IL-4 expression by *Leishmania*-specific naive helper T cells in vivo. *Immunity* 17, 191-200.

- Strauss-Ayali, D., Jaffe, C. L., Burshtain, O., Gonen, L., and Baneth, G.** (2004): Polymerase chain reaction using noninvasively obtained samples, for the detection of *Leishmania infantum* DNA in dogs. *J Infect Dis* 189, 1729-33.
- Strauss-Ayali, D., Baneth, G., Shor, S., Okano, F., and Jaffe, C. L.** (2005): Interleukin-12 augments a Th1-type immune response manifested as lymphocyte proliferation and interferon gamma production in *Leishmania infantum*-infected dogs. *Int J Parasitol* 35, 63-73.
- Strauss-Ayali, D., Baneth, G., and Jaffe, C. L.** (2007): Splenic immune responses during canine visceral leishmaniasis. *Vet Res* 38, 547-64.
- Streit, J. A., Recker, T. J., Donelson, J. E., and Wilson, M. E.** (2000): BCG expressing LCR1 of *Leishmania chagasi* induces protective immunity in susceptible mice. *Exp Parasitol* 94, 33-41.
- Stuart, K., Brun, R., Croft, S., Fairlamb, A., Gurtler, R. E., McKerrow, J., Reed, S., and Tarleton, R.** (2008): Kinetoplastids: related protozoan pathogens, different diseases. *J Clin Invest* 118, 1301-10.
- Suffia, I., Ferrua, B., Stien, X., Mograbi, B., Marty, P., Rousseau, D., Fragaki, K., and Kubar, J.** (2000): A novel *Leishmania infantum* recombinant antigen which elicits interleukin 10 production by peripheral blood mononuclear cells of patients with visceral leishmaniasis. *Infect Immun* 68, 630-6.
- Sundar, S., Singh, R. K., Maurya, R., Kumar, B., Chhabra, A., Singh, V., and Rai, M.** (2006): Serological diagnosis of Indian visceral leishmaniasis: direct agglutination test versus rK39 strip test. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 100, 533-7.
- Tabar, M. D., Roura, X., Francino, O., Altet, L., and Ruiz de Gopegui, R.** (2008): Detection of *Leishmania infantum* by real-time PCR in a canine blood bank. *J Small Anim Pract* 49, 325-8.
- Tafuri, W. L., de Oliveira, M. R., Melo, M. N., and Tafuri, W. L.** (2001): Canine visceral leishmaniasis: a remarkable histopathological picture of one case reported from Brazil. *Vet Parasitol* 96, 203-12.
- Tanner, C. E.** (1996): Immunobiology of visceral leishmaniasis. *Clin Immunol Immunopathol* 78, 105-11.
- Teixeira, C. R., Teixeira, M. J., Gomes, R. B., Santos, C. S., Andrade, B. B., Raffaele-Netto, I., Silva, J. S., Guglielmotti, A., Miranda, J. C., Barral, A., Brodskyn, C., and Barral-Netto, M.** (2005): Saliva from *Lutzomyia longipalpis* induces CC chemokine ligand 2/monocyte chemoattractant protein-1 expression and macrophage recruitment. *J Immunol* 175, 8346-53.
- Teixeira, M. J., Teixeira, C. R., Andrade, B. B., Barral-Netto, M., and Barral, A.** (2006): Chemokines in host-parasite interactions in leishmaniasis. *Trends Parasitol* 22, 32-40.
- Tesh, R. B.** (1995): Control of zoonotic visceral leishmaniasis: is it time to change strategies? *Am J Trop Med Hyg* 52, 287-92.
- Tewary, P., Jain, M., Sahani, M. H., Saxena, S., and Madhubala, R.** (2005): A heterologous prime-boost vaccination regimen using ORFF DNA and recombinant ORFF protein confers protective immunity against experimental visceral leishmaniasis. *J Infect Dis* 191, 2130-7.
- Tewary, P., Saxena, S., and Madhubala, R.** (2006): Co-administration of IL-12 DNA with rORFF antigen confers long-term protective immunity against experimental visceral leishmaniasis. *Vaccine* 24, 2409-16.
- Thakur, C. P.** (2000): Socio-economics of visceral leishmaniasis in Bihar (India). *Trans R Soc Trop Med Hyg* 94, 156-7.
- Theodos, C. M., and Titus, R. G.** (1993): Salivary gland material from the sand fly *Lutzomyia longipalpis* has an inhibitory effect on macrophage function in vitro. *Parasite Immunol* 15, 481-7.
- Thomas, M. C., Garcia-Perez, J. L., Alonso, C., and Lopez, M. C.** (2000): Molecular characterization of KMP11 from *Trypanosoma cruzi*: a cytoskeleton-associated protein regulated at the translational level. *DNA Cell Biol* 19, 47-57.
- Titus, R. G., and Ribeiro, J. M.** (1988): Salivary gland lysates from the sand fly *Lutzomyia longipalpis* enhance *Leishmania* infectivity. *Science* 239, 1306-8.
- Titus, R. G., Gueiros-Filho, F. J., de Freitas, L. A., and Beverley, S. M.** (1995): Development of a safe live *Leishmania* vaccine line by gene replacement. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 10267-71.
- Todoli, F., Solano-Gallego, L., Ojeda, A., Quintana, J., Lloret, A., Roura, X., Alberola, J., and Rodriguez-Cortes, A.** (2009): Anti-*Leishmania* IgA in urine samples from dogs with clinical leishmaniasis. *Vet Parasitol* 159, 17-23.
- Tolezano, J. E., Uliana, S. R., Taniguchi, H. H., Araujo, M. F., Barbosa, J. A., Barbosa, J. E., Floeter-Winter, L. M., and Shaw, J. J.** (2007): The first records of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in dogs (*Canis familiaris*) diagnosed clinically as having canine visceral leishmaniasis from Aracatuba County, Sao Paulo State, Brazil. *Vet Parasitol* 149, 280-4.
- Tolson, D. L., Jardim, A., Schnur, L. F., Stebeck, C., Tuckey, C., Beecroft, R. P., Teh, H. S., Olafson, R. W., and Pearson, T. W.** (1994): The kinetoplastid membrane protein 11 of *Leishmania donovani* and African trypanosomes is a potent stimulator of T-lymphocyte proliferation. *Infect Immun* 62, 4893-9.
- Toz, S. O., Chang, K. P., Ozbel, Y., and Alkan, M. Z.** (2004): Diagnostic value of rK39 dipstick in zoonotic visceral leishmaniasis in Turkey. *J Parasitol* 90, 1484-6.

- Travi, B. L., Tabares, C. J., Cadena, H., Ferro, C., and Osorio, Y.** (2001): Canine visceral leishmaniasis in Colombia: relationship between clinical and parasitologic status and infectivity for sand flies. *Am J Trop Med Hyg* 64, 119-24.
- Trinvuthipong, C.** (2004): Thailand's Prime-Boost HIV Vaccine Phase III. *Science* 303, 954-5.
- Trujillo, C., Ramirez, R., Velez, I. D., and Berberich, C.** (1999): The humoral immune response to the kinetoplastid membrane protein-11 in patients with American leishmaniasis and Chagas disease: prevalence of IgG subclasses and mapping of epitopes. *Immunol Lett* 70, 203-9.
- Tuon, F. F., Amato, V. S., Bacha, H. A., Almusawi, T., Duarte, M. I., and Amato Neto, V.** (2008): Toll-like receptors and leishmaniasis. *Infect Immun* 76, 866-72.
- Valenzuela, J. G., Belkaid, Y., Garfield, M. K., Mendez, S., Kamhawi, S., Rowton, E. D., Sacks, D. L., and Ribeiro, J. M.** (2001): Toward a defined anti-*Leishmania* vaccine targeting vector antigens: characterization of a protective salivary protein. *J Exp Med* 194, 331-42.
- Valladares, J. E., Alberola, J., Esteban, M., and Arboix, M.** (1996): Disposition of antimony after the administration of N-methylglucamine antimoniate to dogs. *Vet Rec* 138, 181-3.
- van Zandbergen, G., Klinger, M., Mueller, A., Dannenberg, S., Gebert, A., Solbach, W., and Laskay, T.** (2004): Cutting edge: neutrophil granulocyte serves as a vector for *Leishmania* entry into macrophages. *J Immunol* 173, 6521-5.
- Velez, I. D., Gilchrist, K., Arbelaez, M. P., Rojas, C. A., Puerta, J. A., Antunes, C. M., Zicker, F., and Modabber, F.** (2005): Failure of a killed *Leishmania amazonensis* vaccine against American cutaneous leishmaniasis in Colombia. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 99, 593-8.
- Vercosa, B. L., Lemos, C. M., Mendonca, I. L., Silva, S. M., de Carvalho, S. M., Goto, H., and Costa, F. A.** (2008): Transmission potential, skin inflammatory response, and parasitism of symptomatic and asymptomatic dogs with visceral leishmaniasis. *BMC Vet Res* 4, 45.
- Verma, N. K., and Dey, C. S.** (2004): Possible mechanism of miltefosine-mediated death of *Leishmania donovani*. *Antimicrob Agents Chemother* 48, 3010-5.
- Volf, P., Hostomska, J., and Rohousova, I.** (2008): Molecular crosstalks in *Leishmania*-sandfly-host relationships. *Parasite* 15, 237-43.
- Volfova, V., Hostomska, J., Cerny, M., Votypka, J., and Volf, P.** (2008): Hyaluronidase of bloodsucking insects and its enhancing effect on *Leishmania* infection in mice. *PLoS Negl Trop Dis* 2, e294.
- Vouldoukis, I., Drapier, J. C., Nussler, A. K., Tselentis, Y., Da Silva, O. A., Gentilini, M., Mossalayi, D. M., Monjour, L., and Dugas, B.** (1996): Canine visceral leishmaniasis: successful chemotherapy induces macrophage antileishmanial activity via the L-arginine nitric oxide pathway. *Antimicrob Agents Chemother* 40, 253-6.
- Webb, J. R., Campos-Neto, A., Ovendale, P. J., Martin, T. I., Stromberg, E. J., Badaro, R., and Reed, S. G.** (1998): Human and murine immune responses to a novel *Leishmania major* recombinant protein encoded by members of a multicopy gene family. *Infect Immun* 66, 3279-89.
- Wilson, M. E., Young, B. M., Andersen, K. P., Weinstock, J. V., Metwali, A., Ali, K. M., and Donelson, J. E.** (1995): A recombinant *Leishmania chagasi* antigen that stimulates cellular immune responses in infected mice. *Infect Immun* 63, 2062-9.
- Woerly, V., Maynard, L., Sanquer, A., and Eun, H. M.** (2009): Clinical efficacy and tolerance of miltefosine in the treatment of canine leishmaniosis. *Parasitol Res.* 105, 463-9.
- Wolff, J. A., Malone, R. W., Williams, P., Chong, W., Acsadi, G., Jani, A., and Felgner, P. L.** (1990): Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. *Science* 247, 1465-8.
- Woodland, D. L.** (2004): Jump-starting the immune system: prime-boosting comes of age. *Trends Immunol* 25, 98-104.
- Wyllie, S., Vickers, T. J., and Fairlamb, A. H.** (2008): Roles of trypanothione S-transferase and tryparedoxin peroxidase in resistance to antimonials. *Antimicrob Agents Chemother* 52, 1359-65.
- Xavier, S. C., de Andrade, H. M., Monte, S. J., Chiarelli, I. M., Lima, W. G., Michalick, M. S., Tafuri, W. L., and Tafuri, W. L.** (2006): Comparison of paraffin-embedded skin biopsies from different anatomical regions as sampling methods for detection of *Leishmania* infection in dogs using histological, immunohistochemical and PCR methods. *BMC Vet Res* 2, 17.
- Zaffaroni, E., Rubaudo, L., Lanfranchi, P., and Mignone, W.** (1999): Epidemiological patterns of canine leishmaniasis [correction of leishmaniosis] in Western Liguria (Italy). *Vet Parasitol* 81, 11-9.
- Zafra, R., Jaber, J. R., Perez-Ecija, R. A., Barragan, A., Martinez-Moreno, A., and Perez, J.** (2008): High iNOS expression in macrophages in canine leishmaniasis is associated with low intracellular parasite burden. *Vet Immunol Immunopathol* 123, 353-9.
- Zanin, F. H., Coelho, E. A., Tavares, C. A., Marques-da-Silva, E. A., Silva Costa, M. M., Rezende, S. A., Gazzinelli, R. T., and Fernandes, A. P.** (2007): Evaluation of immune responses and protection induced by A2 and nucleoside hydrolase (NH) DNA vaccines against *Leishmania chagasi* and *Leishmania amazonensis* experimental infections. *Microbes Infect* 9, 1070-7.

- Zatelli, A., Borgarelli, M., Santilli, R., Bonfanti, U., Nigrisoli, E., Zanatta, R., Tarducci, A., and Guarraci, A.** (2003): Glomerular lesions in dogs infected with *Leishmania* organisms. *Am J Vet Res* 64, 558-61.
- Zer, R., Yaroslavski, I., Rosen, L., and Warburg, A.** (2001): Effect of sand fly saliva on *Leishmania* uptake by murine macrophages. *Int J Parasitol* 31, 810-4.
- Zhang, X., Laubach, V. E., Alley, E. W., Edwards, K. A., Sherman, P. A., Russell, S. W., and Murphy, W. J.** (1996): Transcriptional basis for hyporesponsiveness of the human inducible nitric oxide synthase gene to lipopolysaccharide/interferon-gamma. *J Leukoc Biol* 59, 575-85.

Objetivos

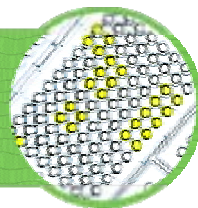


El objetivo general de esta tesis ha sido evaluar la utilidad de cuatro antígenos recombinantes de *L. infantum* —rKMPII, rTRYP, rLACK y rpapLe22— en el control de la ZVL mediante su utilización en técnicas de diagnóstico inmunológico humoral y celular en perros y en diferentes estrategias de vacunación en hámsters.

Los objetivos concretos fueron:

1. Producir las proteínas rKMPII, rTRYP, rLACK y rpapLe22 de *L. infantum* en larvas de *T. ni* manteniendo su integridad e inmunogenicidad con la finalidad de poder utilizarlas en los diferentes estudios.
2. Analizar la serorreactividad frente a las cuatro proteínas recombinantes de *L. infantum* en perros para determinar su papel como inmunógenos de la respuesta humoral durante la infección por este parásito.
3. Evaluar la sensibilidad y especificidad del diagnóstico serológico en perros mediante los ELISA basados en las proteínas recombinantes, utilizados de forma aislada y en paralelo, en relación al ELISA basado en CTLA.
4. Analizar la respuesta celular *in vivo* de perros residentes en zona endémica frente a las cuatro proteínas recombinantes de *L. infantum* para determinar su papel como inmunógenos de células T durante la infección por este parásito.
5. Evaluar la sensibilidad y especificidad del diagnóstico en perros mediante la reacción DTH desarrollada frente a las proteínas recombinantes, utilizadas de forma aislada y en paralelo, en relación al LST.
6. Evaluar y comparar la seguridad, inmunogenicidad y eficacia de diferentes estrategias de vacunación —DNA desnudo, proteína y *prime-boost* heterólogo con DNA-proteína— utilizando KMPII, TRYP, LACK y papLe22 contra la infección por *L. infantum* en hámsters.

Estudio 1



SEROREACTIVITY AGAINST THE RAW INSECT-DERIVED RECOMBINANT KMPII, TRYP, AND LACK *LEISHMANIA INFANTUM* PROTEINS IN INFECTED DOGS

1. ABSTRACT

The recombinant proteins KMPII, TRYP, and LACK of *Leishmania infantum* were produced in baculovirus-infected *Trichoplusia ni* larvae and used to analyze the seroreactivity of 165 dog serum samples by the multiple-well ELISA technique (57 infected dogs with clinical signs, 46 naturally infected and 11 experimentally infected; and 108 non-infected dogs, 76 from non-endemic areas and 32 from endemic areas). Recombinant (r) KMPII was the most recognized antigen, as the majority of infected dogs seroreacted against it (0.75). This is the first report of seroreactivity against rTRYP (0.51) and rLACK (0.42) in *L. infantum*-infected dogs. All non-infected dogs were negative for rTRYP and rLACK, and only one of the 32 from endemic areas seroreacted against rKMPII. The results demonstrate that *L. infantum*-infected dogs develop humoral immunity against KMPII, TRYP, and LACK antigens. There was substantial agreement between crude total *L. infantum* antigen (CTLA)-based ELISA and rKMPII ELISA ($\kappa = 0.664$), higher than that found between the CTLA-based ELISA and rTRYP ($\kappa = 0.427$) or rLACK ($\kappa = 0.343$) ELISA, which can be interpreted as fair and moderate agreement, respectively. Ninety-three percent of the infected dogs analyzed developed specific antibodies against at least one of these three recombinant antigens. When the three recombinant antigen-based ELISA techniques were evaluated in parallel, almost perfect agreement ($\kappa = 0.880$) with CTLA-based ELISA was observed, with a specificity of 0.97 and a sensitivity of 0.93 in relation to CTLA-based ELISA. Further studies using purified recombinant antigens in a single-well test or individually, depending on the objective of the study, are warranted.

2. INTRODUCTION

Zoonotic visceral leishmaniasis (ZVL) is a parasitic disease caused by *Leishmania infantum* (= *Leishmania chagasi* (Mauricio *et al.*, 2000)) in the Palearctic and the Neotropical ecozones. Dogs are both a natural host and the main peridomestic reservoir of the parasite (Moreno and Alvar, 2002; Dantas-Torres, 2007). ZVL is endemic in the Mediterranean basin, where the prevalence of canine infection reaches 67%–80% in highly endemic areas (Berrahal *et al.*, 1996; Solano-Gallego *et al.*, 2001). Because of their epidemiological significance, dogs constitute an important target in controlling transmission of *L. infantum*.

The immune response against *L. infantum* in infected dogs is based on a complex combination of humoral and cellular responses (Barbieri, 2006). Asymptomatic infection is related to the production of T_h1 and T_h2 cytokines, but protective immunity is cell-mediated and depends on the preferential expression of T_h1 cytokines (Chamizo *et al.*, 2005). In contrast, symptomatic infection is associated with development of a predominantly humoral immune response. A marked increase in *L. infantum*-specific IgG, IgA, IgE, and IgM concentrations has been observed in dogs with active disease (Almeida *et al.*, 2005; Iniesta *et al.*, 2005; Rodriguez *et al.*, 2006). In this regard, serology has been established as a good marker not only of infection (Quinnell *et al.*, 2001), but also of infectivity (Courtenay *et al.*, 2002).

The humoral response to *L. infantum* in dogs has mainly been analyzed using crude total parasite antigen, of unknown composition and difficult to be standardized. Recombinant proteins enable identification of the specific *L. infantum* antigens implicated in the humoral response, allowing the identification of specific B-cell immunogens for developing more standardizable, reproducible and accurate diagnostic and prognostic tools (Maia and Campino, 2008). Moreover, discrimination between potentially protective and potentially aggravating antigens which only stimulate humoral immune response would allow a more rational development of experimental vaccines (Kubar and Fragaki, 2005).

Baculovirus-insect larvae expression has proven to be a valuable system for the production of recombinant proteins (Van Oers, 2006). It is based on a eukaryotic system and generally allows the obtention of high quality proteins processed with most of the post-translational modifications. However, some processing protein pathways of insect cells are not necessarily equivalent to those of higher eukaryotes, such as the protein N-glycosylation pathway. Recent efforts have been driven to improve their protein processing capabilities and enhance their ability to produce properly folded and modified recombinant proteins (Kost *et al.*, 2005). Whereas the production of recombinant proteins by insect-cell culture requires access to specialized facilities and expensive cell culture media, the production by baculovirus-infected insect larvae is inexpensive and requires relatively simple technology, obtaining large amounts of recombinant protein. A wide variety of recombinant proteins have been expressed in insect larvae (Medin *et al.*, 1990; Barderas *et al.*, 2001; Rabah *et al.*, 2004; O'Connell *et al.*, 2007; Perez-Filgueira *et al.*, 2007; Gomez-Sebastian *et al.*, 2008; Na *et al.*, 2008; Perez-Martin *et al.*, 2008).

Ours is the first approach to use recombinant baculovirus-infected *Trichoplusia ni* larvae to produce three evolutionarily conserved antigens of *L. infantum*: KMP11 (kinetoplastid membrane protein-11, formerly known as KMP-11), TRYP (tryparedoxin peroxidase, previously known as TSA), and LACK (*Leishmania* homologue of receptors for activated C kinase). KMP11 is a protein

linked to the lipophosphoglycan (LPG) which represents one of the major components of the *Leishmania* sp. cell surface (Jardim *et al.*, 1995). T cell responses elicited by LPG complex firstly attributed to the glycolipid were really due to KMPII (Russo *et al.*, 1992). It has been reported that the majority of the sera from mucocutaneous, cutaneous, and visceral leishmaniasis (VL) patients contain detectable antibodies against KMPII (Ramirez *et al.*, 1998; Trujillo *et al.*, 1999), and also that a decline in anti-KMPII levels after therapy may serve as a marker of response (Passos *et al.*, 2005). In dogs, recombinant KMPII was recognized by 24 of 25 of sera from *L. infantum* naturally infected dogs (Berberich *et al.*, 1997) and by 4 of 4 sera from experimentally infected dogs (Nieto *et al.*, 1999). TRYP catabolises hydrogen peroxide allowing the parasite to protect itself against oxidative damage (Levick *et al.*, 1998) and confers resistance to antimonials (Wyllie *et al.*, 2008). Fifty percent of patients suffering clinical cutaneous and VL produce specific antibodies against this antigen (Webb *et al.*, 1998). LACK is a protein localized in the cell cytoplasm near the kinetoplast (Gonzalez-Aseguinolaza *et al.*, 1999) and necessary for the virulence of the parasite (Kelly *et al.*, 2003). LACK has been described as the immunodominant focus for the aberrant T_H2-mediated response of BALB/c mice to *L. major* (Julia and Glaichenhaus, 1999). Interestingly, during CanL an association between seroreactivity against a specific band of 34-35.4 kDa of *L. infantum* antigen — the molecular weight of rLACK— and advanced disease has been suggested (Carrera *et al.*, 1996).

The objective of the present study was twofold: to evaluate the prevalence of antibodies against the insect-derived KMPII, TRYP, and LACK proteins in dogs with leishmaniasis and second, to assess their potential value for obtaining a reproducible and low-cost easily produced diagnostic tool for the serodiagnosis of *L. infantum* infection.

3. MATERIAL AND METHODS

3.1. Gene cloning

Genes were cloned as previously described (Rodriguez-Cortes *et al.*, 2007). Briefly, total RNA was extracted from a culture containing 5×10^6 *L. infantum* promastigotes (kindly provided by Dr. Portús, Universitat de Barcelona, Spain) using Trizol reagent (Gibco®, Gaithersburg, Maryland, USA). One microgram of total RNA was used for the synthesis of cDNA using the cDNA Cycle Kit® (Invitrogen™, Carlsbad, California, USA) according to the manufacturer's instructions. A specific reverse primer was used for the reverse transcription of each *L. infantum* gene (*KMPII*, *TRYP*, and *LACK*). Table 1 shows the Genbank accession number of sequences used for primer design and the nucleotide sequences for forward and reverse primers for each *L. infantum* gene. Specific

cDNAs corresponding to open reading frames of each *L. infantum* genes were amplified and cloned separately into a TOPO TA Cloning® vector (Invitrogen™). Plasmid constructions containing each gene were sequenced using the ABI PRISM™ BigDye® Terminator v3.1 Ready Reaction Cycle sequencing kit in an ABI PRISM™ 3730 DNA Analyzer (Applied Biosystems™, Foster City, California, USA).

Table 1. GenBank accession number of sequences used for primer design and the nucleotide sequences for forward and reverse primers for each *L. infantum* gene

Gene (accession number)	Primer	
<i>KMP11</i> (X95627)	Forward	5'-ATGGCCACCACGTACGAGGAGTTTTTCG-3'
	Reverse	5'-TTACTTGGATGGGTACTGCGCAGC-3'
<i>TRYP</i> (AF044679)	Forward	5'-CCAGCCATGTCCTGCGGTAACGCCAAG-3'
	Reverse	5'-AGGTTTACTGCTTGCTGAAGTATCCTTC-3'
<i>LACK</i> (U49695)	Forward	5'-ACCATGAACTACGAGGGTCACC-3'
	Reverse	5'-TTACTCGGCGTCGGAGATGGACC-3'

3.2. Recombinant baculovirus

The recombinant baculoviruses expressing the *L. infantum* sequences of *KMP11*, *TRYP*, and *LACK* were produced using the Bac-To-Bac® system (Invitrogen™) following the manufacturer's instructions. The engineered recombinant pFastBac™1 vectors were transformed into competent *E. coli* (MAX Efficiency® DH10Bac™ Competent Cells, Invitrogen™) to obtain the recombinant bacmids. *Spodoptera frugiperda* Sf21 cells were transfected with the recombinant bacmids. The infected cells were cultured at 27 °C and collected when a cytopathic effect was evident, at about 72 h post-infection. The recombinant baculoviruses containing the *KMP11*, *TRYP*, and *LACK* genes were named Bac-KMP11, Bac-TRYP, and Bac-LACK, respectively. Additionally, a pFastBac™1 vector without an insert was used to produce the control or wild-type baculovirus (Bac-Ni), following the same protocol. Recombinant baculovirus stocks were titrated by viral plaque assay (O'Reilly, 1997) and yielded 6.4×10^7 pfu · mL⁻¹ for Bac-KMP11, 4.4×10^7 pfu · mL⁻¹ for Bac-TRYP, and 2.4×10^7 pfu · mL⁻¹ for Bac-LACK.

3.3. Insect growth conditions and inoculation

T. ni larvae were reared under level 2 biosafety conditions as previously described (Perez-Filgueira *et al.*, 2006). Fifth-instar larvae were sedated by incubation on ice for 15 min and then intracoelemically injected near the proleg, forward along the body cavity, with 10 µL of the above-

mentioned recombinant baculovirus preparations. Each larva received only one type of the recombinant baculovirus. Larvae injected with Bac-Ni were produced as a negative control. Inoculated larvae were kept in growth chambers at 28 °C for 96 h and then frozen immediately at -20 °C until processing.

3.4. Preparation of protein extracts

Production of recombinant proteins was verified in sf21 cells prior to infecting the larvae; therefore, protein extracts were prepared for both infected cells and larvae.

Proteins were obtained from infected cells ($\sim 2 \times 10^6$) by resuspension in extraction buffer (30 μ L) containing 150 mM NaCl, 1 % NP-40, 0.1 % SDS, 50 mM Tris pH 8, protease inhibitor cocktail (Complete™, Roche, Basel, Switzerland), and 10mM 2-mercaptoethanol. Preparations were kept on ice for 30 min and clarified by centrifuging at $2000 \times g$ for 5 min at 4 °C to remove cellular debris.

Proteins were solubilized from frozen larvae by homogenizing on ice with a tissue disrupter in the presence of 2 mL per larva of extraction buffer (phosphate buffered saline [PBS], pH 7.2, 0.01 % Triton® X-100, 2.5 mM dithiothreitol, and a protease inhibitor cocktail [Complete]). The resulting suspension was clarified by centrifuging at $6000 \times g$ for 15 min. The supernatant was filtered through Whatman paper and recentrifuged. Aliquots (1 mL) of the crude extracts were lyophilized overnight in a Telstar® Cryodos Freeze-Dryer (Telstar®, Terrassa, Spain), and stored at 4 °C until used.

3.5. Analysis and quantification of recombinant protein production

Twenty micrograms of each protein extract and a molecular weight standard (Protein Molecular Weight Marker, Takara, Otsu, Japan) were electrophoretically separated by 15 % SDS-PAGE. The gel was stained with Coomassie brilliant blue (Bio-Rad, Laboratories Inc., Hercules, California, USA). Band intensity corresponding to recombinant proteins was calculated using a Tina 2.0 image analyzer software package (Raytest, Straubenhardt, Germany) and the concentration was inferred in relation to a curve of a known protein concentration (bovine serum albumin [BSA]). If there was a band of the same size than the recombinant protein appearing in the Ni antigen, as occurred when we evaluated the rTRYP, the quantity of both bands was first inferred using the curve of BSA. Then, the quantity obtained for the background larvae protein was subtracted to the quantity obtained for the recombinant protein. Afterwards, the percentage of expression of the protein in the crude extract was calculated.

Western blotting was performed to detect recombinant proteins in protein larva extracts without further purification. Briefly, proteins and the molecular weight standard (BenchMark™ Prestained, Invitrogen™) were electrophoretically transferred onto an Immobilon® PVDF transfer membrane (Millipore®, MA). The membrane was blocked overnight with PBS-0.05 % Tween® 20 (PBST)-4 % dried skimmed milk and subsequently incubated at room temperature with a pool of six sera that were highly positive to crude total *L. infantum* antigen (CTLA)-based ELISA for 1 hour. After washing with PBST (once 15 min and then twice 5 min), Protein A-HRP (Pierce™, Rockford, Illinois, USA) was used as secondary antibody and incubated for 1 h at room temperature, and the membrane was thoroughly washed as described above. Color was developed using 4-chloro-1-naftol (Calbiochem®, San Diego, California, USA) and H₂O₂ as substrate, and the reaction was stopped with bidistilled water.

3.6. Canine serum samples

Seroreactivity against recombinant proteins was evaluated by screening 165 retrospective sera from dogs infected and not infected by *L. infantum*.

Fifty-seven sera from naturally infected and experimentally infected dogs were analyzed. The naturally infected group consisted of 46 dogs of different breeds (30 males and 16 females, aged from 6 months to 11 years with a mean \pm standard deviation of 4.7 ± 2.7 years), which were brought to the Veterinary Teaching Hospital of the Universitat Autònoma de Barcelona with clinical manifestations compatible with CanL. The diagnosis of leishmaniasis was confirmed by visualization of *L. infantum* organisms on bone marrow smears and by detection of specific antibodies using CTLA-based ELISA performed as previously described (Riera *et al.*, 1999). The experimentally infected group consisted of 11 intact female beagles that had been challenged at the age 6 months by intravenous injection of 2×10^8 amastigotes of *L. infantum*. Sera were collected at 12 months post-infection, when dogs showed signs of patent leishmaniasis.

Clinical signs of dogs from both groups were obtained from clinical records. All dogs from the naturally infected and experimentally infected groups showed clinical signs that were compatible with leishmaniasis (3 ± 2 clinical signs expressed as mean \pm standard deviation). The most frequent alterations were skin involvement, enlarged lymph nodes, and weight loss. The percentage and type of clinical signs recorded are shown in Table 2.

Additionally, 76 sera from dogs living in a non-endemic area and 32 sera from healthy dogs living in Spain and proven to be parasitologically and serologically *L. infantum*-negative by the above-

mentioned techniques were included to establish the cut-off value and to evaluate the specificity of the recombinant antigen-based ELISA, respectively.

Table 2. Clinical signs recorded in naturally and experimentally infected dogs with CanL

Clinical sign	Percentage of dogs
Skin involvement	63 %
Lymphadenomegalia	61 %
Weight loss	49 %
Asthenia	33 %
Abnormal locomotion	23 %
Eye disease	18 %
Renal disease	18 %
Hyperthermia	12 %
Vomiting or diarrhea	12 %
Epistaxis	9 %
Pale mucoses	9 %
Other signs	16 %

3.7. Recombinant antigen-based ELISA

Lyophilized extracts from larvae containing recombinant proteins and control antigen Ni were reconstituted in bidistilled water, and total solubilized protein was measured by the Bradford assay using a commercial kit (Bio-Rad Laboratories Inc). Concentrations of protein larva extract, serum, and Protein A-HRP were optimized for each recombinant antigen-based ELISA to obtain maximum differences in absorbance between positive and negative pools of sera (data not shown). The conditions in which maximum differences were detected were chosen as working conditions (Table 3). Protein A-HRP was used to detect dog IgG, IgA, IgM, and IgE (Peng *et al.*, 1991).

Table 3. Conditions used for each recombinant antigen-based ELISA

rProtein	Protein extract per well (μg)	Serum dilution	Protein A-HRP dilution
rKMPII	1.3	1:200	1:5000
rTRYP	5.0	1:800	1:2500
rLACK	24.4	1:400	1:7500

Microtiter plates were coated with protein larva extracts containing each recombinant protein and control antigen Ni in 50 mM carbonate-bicarbonate buffer, pH 9.6, and incubated overnight at 4 °C. Plates were washed three times with PBST and used immediately. They were sequentially incubated with blocking buffer (PBST-3 % dried skimmed milk) and dog serum samples diluted in PBST-1 % dried skimmed milk for 1 h at 37 °C, before being washed as above. Protein A-HRP was added. Plates were incubated for 1 h at 37 °C and, after five washes with PBST, the color was developed by addition of *o*-phenylenediamine, 0.4 µg·mL⁻¹ (Sigma-Aldrich®, St. Louis, Missouri, USA) and H₂O₂ (0.4 µg·mL⁻¹) in 0.1 M phosphate citrate buffer, pH 5.0. The reaction was stopped by the addition of 3 M H₂SO₄ and the absorbance values were read at 492 nm in an automatic microELISA reader (Anthos 2001, Anthos Labtec Instruments, Eugendorf, Austria). Sera were tested under equal conditions against both protein larva extracts containing each recombinant antigen and control antigen Ni on the same plate. Therefore, each serum sample was tested against protein larva extracts containing rKMPII, rTRYP, rLACK and the corresponding control antigen Ni prepared at the same concentration (Ni_{KMPII}, Ni_{TRYP}, and Ni_{LACK}).

Results were expressed as optical densities (OD). For ELISA using recombinant antigens, results were expressed as corrected OD and calculated by subtracting the absorbance achieved by the serum on the control antigen Ni from that achieved on the protein larva extract containing recombinant antigen. A pool of known positive sera to CTLA, a pool of known negative sera, and a known positive serum were included in all plates as a positive control, negative control, and calibrator, respectively. Plates with an interassay calibrator variation ≥ 10 % were discarded. The cut-off values (mean + 3SD for 76 dogs from non-endemic areas) were established at 0.100 OD for rKMPII ELISA, 0.082 OD for rTRYP ELISA, and 0.005 OD for rLACK ELISA.

3.8. Data analysis

All statistical tests were performed using SPSS v.15 (SPSS Inc, Chicago, Illinois, USA). A *P* value < 0.05 was considered significant.

Sensitivity, specificity, and concordance with CTLA-based ELISA were evaluated for rKMPII, rTRYP, and rLACK ELISA, and also for the combination of the three recombinant antigen-based ELISA tests used in parallel. In this case, when a serum sample was positive to at least one of the recombinant antigen-based ELISA tests, it was considered positive; otherwise, it was considered negative. The sensitivity of recombinant antigen-based ELISA was estimated on the basis of the results of CTLA-based ELISA. The specificity of ELISA tests was estimated on the basis of the results of sera from dogs living in Spain and proven to be parasitologically and serologically

negative. Concordance between the ELISA tests was evaluated using the Cohen kappa coefficient (κ) and interpreted as described in the literature (Landis and Koch, 1977a; Landis and Koch, 1977b).

4. RESULTS

4.1. Detection and quantification of recombinant proteins

Specific bands corresponding to recombinant proteins from Sf21 cell extracts were visible using Coomassie brilliant blue staining (Fig. 1A). The recombinant KMPII, TRYP, and LACK proteins were also successfully produced in the inoculated *T. ni* larvae (Fig. 1B and 1C). rKMPII, rTRYP, and rLACK were identified as the expected single band with an electrophoretic mobility of around 11 kDa, 22 kDa, and 34 kDa, respectively, in Coomassie blue-stained gels and Western blotting.

Concentrations of recombinant proteins obtained from larvae accounted for 5.0% of the total protein extract for rLACK, 1.0% for rKMPII, and 0.5% for rTRYP. The total amount of protein obtained from a single larva was estimated to be around 13.4 mg (data not shown), so approximately 225 μ g of rLACK, 45 μ g of rKMPII, and 23 μ g of rTRYP can be produced in a single larva. Using the above-mentioned conditions, a single infected larva provides enough antigen to coat 10 308, 2 393, and 549 wells in rKMPII, rTRYP, and rLACK recombinant antigen-based ELISA, respectively.

4.2. Serorecognition of rKMPII, rTRYP, and rLACK by infected and non-infected dogs

Recombinant antigen-based ELISA results showed that the three recombinant proteins were serorecognised by *L. infantum*-infected dogs, although in different proportions.

The number of positive serum samples for each recombinant antigen-based ELISA is shown in Table 4. The most frequently recognized antigen was rKMPII, since most of the serum samples from infected dogs seroreacted against this protein. Serorecognition of rTRYP and rLACK proteins was lower, but approximately half of the dogs had antibodies binding to these antigens. Interestingly, almost all of the serum samples (93%) from dogs with CanL seroreacted with at least one of the recombinant antigens. The concentrations of antibodies against rKMPII, rTRYP, rLACK, and CTLA found in positive serum samples from *L. infantum*-infected dogs are represented in Fig. 2. All sera from the 32 non-infected dogs in endemic zones were negative for both rTRYP and rLACK, and only one of these sera was positive to rKMPII.

Figure 1. Detection of the recombinant proteins rKMPII, rTRYP, and rLACK produced in *Spodoptera frugiperda* Sf21 cells (A) and in *T. ni* larvae (B and C). Protein extracts containing recombinant proteins were analyzed by Coomassie brilliant blue staining of SDS-PAGE gels (A and B) and by Western-blot (C). Arrows indicate the position of the recombinant proteins. Protein extracts from cells and larvae infected with the wild-type baculovirus without an insert (Bac-Ni) were included as negative controls.

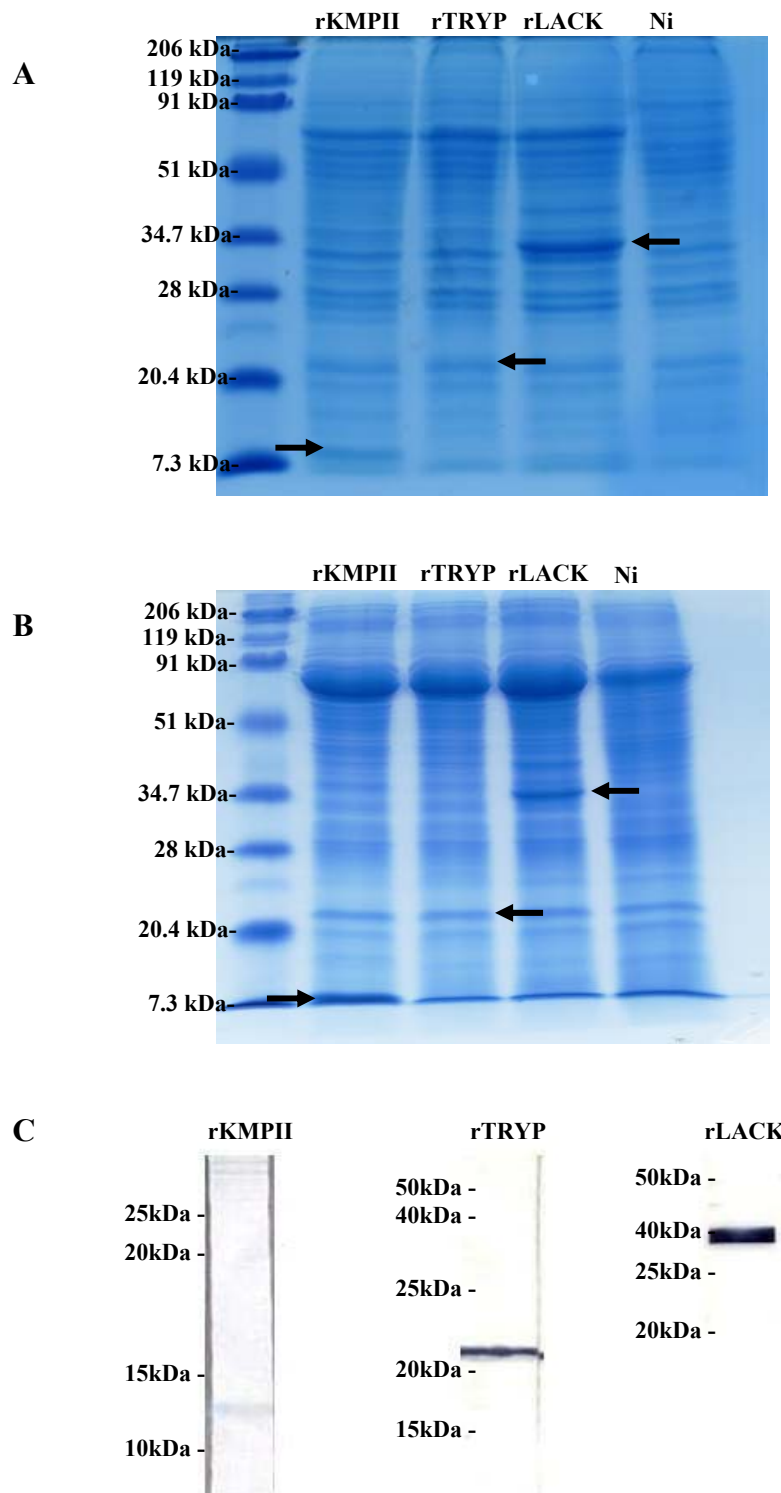
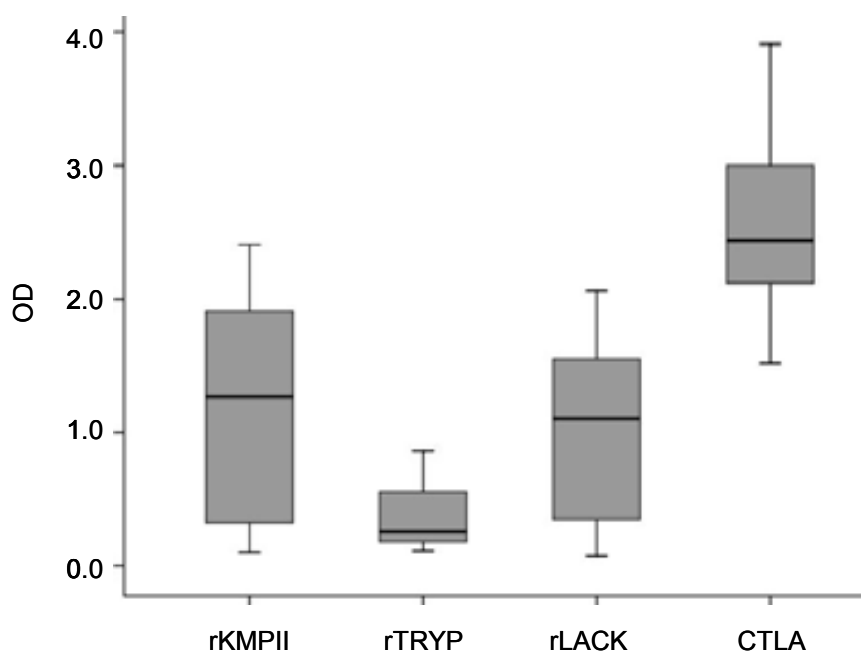


Figure 2. Antibody concentrations against raw insect-derived recombinant proteins (rKMPII, rTRYP, and rLACK) and crude total *L. infantum* antigen in positive sera from *L. infantum*-infected dogs.



Specific antibody levels (y-axis) are represented as optical densities (OD). For the recombinant antigen-based ELISA, specific antibody levels were defined as corrected optical densities [optical density against protein extract containing recombinant antigen – optical density against control antigen Ni].

Table 4. Number and percentage of sera from infected and non-infected dogs positive to each recombinant antigen-based ELISA, evaluated separately and in parallel.

Group of dogs	rKMPII		rTRYP		rLACK		In parallel	
	n	%	n	%	n	%	n	%
All infected dogs (n = 57)	43	75.4 %	29	50.9 %	24	42.1 %	53	93.0 %
Naturally infected (n = 46)	33	71.7 %	26	56.5 %	18	39.1 %	42	91.3 %
Experimentally infected (n = 11)	10	90.9 %	3	27.3 %	6	54.5 %	11	100 %
Non infected dogs (n = 32)	1	3.1 %	0	0.0 %	0	0.0 %	1	3.1 %

4.3. Sensitivity and specificity of recombinant antigen-based ELISA

The sensitivities of rKMPII, rTRYP, and rLACK ELISA in relation to CTLA-based ELISA were 0.75 (confidence interval (CI): 0.63 to 0.85), 0.51 (CI: 0.38 to 0.63), and 0.42 (CI: 0.30 to 0.55), respectively. When rKMPII, rTRYP, and rLACK were tested in parallel, sensitivity yielded a value of 0.93 (CI: 0.86 to 0.99). The specificity of the recombinant antigen-based ELISA in relation to CTLA-based ELISA was 1.00 (CI: 0.89 to 1.00) for rTRYP and rLACK ELISA, and 0.97 (CI: 0.84 to 1.00) for both rKMPII ELISA and the combination of the three ELISAs used in parallel.

Sensitivity differed significantly between recombinant antigen-based ELISA and CTLA-based ELISA (Cochran's Q; $P < 0.001$), while there were no differences regarding specificity (Cochran's Q; $P = 0.392$). Planned pairwise comparisons showed that the sensitivity of rKMPII ELISA was significantly lower than that of CTLA-based ELISA (Cochran's Q; $P < 0.001$), but significantly higher than that of rTRYP ELISA (Cochran's Q; $P = 0.003$) and rLACK ELISA (Cochran's Q; $P = 0.001$). Sensitivities from both rTRYP ELISA and rLACK ELISA were significantly lower than that of CTLA-based ELISA (Cochran's Q; both $P < 0.001$). When rKMPII, rTRYP, and rLACK were tested in parallel sensitivity did not differ from that of CTLA-based ELISA (Cochran's Q; $P = 0.083$)

4.4. Agreement between rKMPII, rTRYP, and rLACK ELISA and CTLA-based ELISA

Substantial agreement was found between CTLA-based ELISA and rKMPII ELISA ($\kappa = 0.664$), higher than the moderate agreement found for rTRYP ELISA ($\kappa = 0.427$) or the fair agreement found for rLACK ELISA ($\kappa = 0.343$). The agreement between CTLA-based ELISA and the three recombinant antigen-based ELISAs used in parallel was almost perfect ($\kappa = 0.880$).

5. DISCUSSION

In this study, we describe seroreactivity against rKMPII antigen and, for the first time, against rTRYP and rLACK antigens from *L. infantum* in naturally infected and experimentally infected dogs. The *L. infantum* proteins were successfully produced in baculovirus-infected *T. ni* larvae, and their seroreactivity was preserved, as shown in ELISA and Western blotting. Although this system has been widely used to express other proteins, this is the first time that proteins from *L. infantum* have been produced using this platform.

The most antigenic recombinant protein was rKMPII, which was recognized by 75.4 % of the infected dogs. The high serorecognition rate found in both naturally infected and experimentally

infected dogs suggests that KMP11 plays a significant role in the humoral immune response. These results agree with the high seroprevalence previously reported in 25 naturally infected dogs in Spain (Berberich *et al.*, 1997) and in 4 experimentally infected dogs (Nieto *et al.*, 1999). Seroreactivity against rKMP11 has also been detected in two studies performed with experimentally infected dogs, but levels of specific antibodies against this protein were low (Nieto *et al.*, 1999; Carrillo *et al.*, 2008). In humans with visceral leishmaniasis, KMP11 is an important target of the humoral immune response during infection (Ramirez *et al.*, 1998; de Carvalho *et al.*, 2003). Seroreactivity against rKMP11 has also been described in *L. infantum*-infected hamsters (Requena *et al.*, 2000). This molecule is a major component of the *L. infantum* promastigote membrane and has been detected in several species of kinetoplastids, suggesting that it may play a significant role in the biology of this parasite (Tolson *et al.*, 1994; Stebeck *et al.*, 1995). Our results support the idea that rKMP11 is an important B-cell stimulatory antigen in *L. infantum*-infected dogs, as described for humans.

Although rKMP11 ELISA showed the highest sensitivity (0.75; CI: 0.63 to 0.85) among the recombinant antigen-based ELISA, it was significantly lower than that of the CTLA-based ELISA. On the contrary, the specificity of rKMP11 ELISA was very good (0.97; CI: 0.84 to 1.00) and was not statistically different from that of CTLA-based ELISA. Consequently, rKMP11 might be considered a good candidate for serodiagnosis of CanL, and, when used in combination with the other two recombinant antigens, sensitivity does not differ from that of CTLA-based ELISA.

There are no studies evaluating the seroprevalence against TRYP and LACK antigens in *L. infantum*-infected dogs. The present study is the first report of seroreactivity against these two antigens, both in experimentally infected and in naturally infected dogs, with a seroprevalence of 50.9 % for rTRYP, and of 42.1 % for rLACK. Similar results have been described in humans, where approximately 50 % of visceral leishmaniasis patients recognized rTRYP (Webb *et al.*, 1998). In the case of rLACK, a higher degree of seroreactivity has been found. In sera from patients with confirmed visceral leishmaniasis, antibodies against LACK were detected in 97 % of cases (Maalej *et al.*, 2003). Our results demonstrate that a humoral response against TRYP and LACK is developed in *L. infantum*-infected dogs, although it is less frequent than that observed against KMP11, as is the case of TRYP in humans (Ramirez *et al.*, 1998; Webb *et al.*, 1998; de Carvalho *et al.*, 2003). Further studies would be needed to explain why the humoral response against TRYP and LACK appears to be restricted to certain individuals. Different populations of infected dogs defined on the basis of seroreactivity against rTRYP and rLACK might be analyzed to investigate the prognostic potential or immunological implications of the development of these specific antibodies.

Two vaccine studies have been unable to detect seroreactivity against rTRYP or rLACK in experimentally infected unvaccinated dogs (Ramiro *et al.*, 2003; Fujiwara *et al.*, 2005) using proteins produced in bacteria. It is possible that the rTRYP and rLACK produced in prokaryotic systems lack certain epitopes when compared with the native protein, thus this may explain the inability to detect them. These results highlight the importance of producing recombinant proteins that mimic the tertiary structure of the native protein for the development of accurate immunological techniques. This premise must also be taken into account for successful vaccine design.

Serological reactivity against these three recombinant proteins was independent and complementary, suggesting that each has its own B-cell immunostimulatory epitopes. Interestingly, most infected dogs serorecognized at least one of the three recombinant antigens evaluated. Thus, the combination of rKMPII, rTRYP, and rLACK produced in *T. ni* larvae might be used to develop a low-cost immunological technique for the serodiagnosis of CanL. In this regard, the specificity (0.97; CI: 0.84 to 1.00) and sensitivity (0.93; CI: 0.86 to 0.99) of the three ELISAs used in parallel was excellent and not different from that of CTLA-based ELISA, with the advantage of using protein extracts directly from larva containing recombinant antigens with no further purification. In addition, almost perfect agreement was found with the CTLA-based ELISA ($\kappa = 0.880$). Further studies are warranted with purified recombinant antigens, either combined in a single-well test or individually, depending on the objective of the study.

In conclusion, our results demonstrate that rKMPII, rTRYP, and rLACK produced in *T. ni* and used without further purification, are serorecognized by *L. infantum*-infected dogs. The most seroreactive protein was rKMPII, recognized by most of the dogs analyzed. As for rTRYP and rLACK, this is the first report of seroreactivity against them in *L. infantum*-infected dogs. When the three recombinant antigen-based ELISAs were evaluated in parallel, no differences in sensitivity or specificity were found compared with CTLA-based ELISA. These results suggest that the combination of the three recombinant antigens could be useful for the serodiagnosis of CanL, offering an inexpensive and reproducible diagnostic tool with raw *L. infantum* insect-derived proteins of known concentration without the need of highly specialized laboratory facilities.

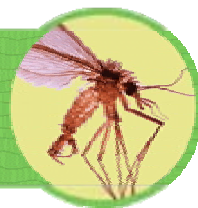
REFERENCES

- Almeida, M. A., Jesus, E. E., Sousa-Atta, M. L., Alves, L. C., Berne, M. E., and Atta, A. M. (2005): Antileishmanial antibody profile in dogs naturally infected with *Leishmania chagasi*. *Vet Immunol Immunopathol* 106, 151-8.
- Barbieri, C. L. (2006): Immunology of canine leishmaniasis. *Parasite Immunol* 28, 329-37.
- Barderas, M. G., Rodriguez, F., Gomez-Puertas, P., Aviles, M., Beitia, F., Alonso, C., and Escribano, J. M. (2001): Antigenic and immunogenic properties of a chimera of two immunodominant African swine fever virus proteins. *Arch Virol* 146, 1681-91.
- Berberich, C., Requena, J. M., and Alonso, C. (1997): Cloning of genes and expression and antigenicity analysis of the *Leishmania infantum* KMP-11 protein. *Exp Parasitol* 85, 105-8.
- Berrahal, F., Mary, C., Roze, M., Berenger, A., Escoffier, K., Lamouroux, D., and Dunan, S. (1996): Canine leishmaniasis: identification of asymptomatic carriers by polymerase chain reaction and immunoblotting. *Am J Trop Med Hyg* 55, 273-7.
- Carrera, L., Fermin, M. L., Tesouro, M., Garcia, P., Rollan, E., Gonzalez, J. L., Mendez, S., Cuquerella, M., and Alunda, J. M. (1996): Antibody response in dogs experimentally infected with *Leishmania infantum*: infection course antigen markers. *Exp Parasitol* 82, 139-46.
- Carrillo, E., Crusat, M., Nieto, J., Chicharro, C., Thomas Mdel, C., Martinez, E., Valladares, B., Canavate, C., Requena, J. M., Lopez, M. C., Alvar, J., and Moreno, J. (2008): Immunogenicity of HSP-70, KMP-11 and PFR-2 leishmanial antigens in the experimental model of canine visceral leishmaniasis. *Vaccine* 26, 1902-11.
- Courtenay, O., Quinnell, R. J., Garcez, L. M., Shaw, J. J., and Dye, C. (2002): Infectiousness in a cohort of brazilian dogs: why culling fails to control visceral leishmaniasis in areas of high transmission. *J Infect Dis* 186, 1314-20.
- Chamizo, C., Moreno, J., and Alvar, J. (2005): Semi-quantitative analysis of cytokine expression in asymptomatic canine leishmaniasis. *Vet Immunol Immunopathol* 103, 67-75.
- Dantas-Torres, F. (2007): The role of dogs as reservoirs of *Leishmania* parasites, with emphasis on *Leishmania (Leishmania) infantum* and *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Vet Parasitol* 149, 139-46.
- de Carvalho, L. P., Soto, M., Jeronimo, S., Dondji, B., Bacellar, O., Luz, V., Orge Orge, G., Alonso, C., Jesus, A. R., and Carvalho, E. M. (2003): Characterization of the immune response to *Leishmania infantum* recombinant antigens. *Microbes Infect* 5, 7-12.
- Fujiwara, R. T., Vale, A. M., Franca da Silva, J. C., da Costa, R. T., Quetz Jda, S., Martins Filho, O. A., Reis, A. B., Correa Oliveira, R., Machado-Coelho, G. L., Bueno, L. L., Bethony, J. M., Frank, G., Nascimento, E., Genaro, O., Mayrink, W., Reed, S., and Campos-Neto, A. (2005): Immunogenicity in dogs of three recombinant antigens (TSA, LeIF and LmST11) potential vaccine candidates for canine visceral leishmaniasis. *Vet Res* 36, 827-38.
- Gomez-Sebastian, S., Perez-Filgueira, D. M., Gomez-Casado, E., Nunez, M. C., Sanchez-Ramos, I., Tabares, E., and Escribano, J. M. (2008): DIVA diagnostic of Aujeszky's disease using an insect-derived virus glycoprotein E. *J Virol Methods*.
- Gonzalez-Aseguinolaza, G., Taladriz, S., Marquet, A., and Larraga, V. (1999): Molecular cloning, cell localization and binding affinity to DNA replication proteins of the p36/LACK protective antigen from *Leishmania infantum*. *Eur J Biochem* 259, 909-16.
- Iniesta, L., Gallego, M., and Portus, M. (2005): Immunoglobulin G and E responses in various stages of canine leishmaniasis. *Vet Immunol Immunopathol* 103, 77-81.
- Jardim, A., Funk, V., Caprioli, R. M., and Olafson, R. W. (1995): Isolation and structural characterization of the *Leishmania donovani* kinetoplastid membrane protein-11, a major immunoreactive membrane glycoprotein. *Biochem J* 305 (Pt 1), 307-13.
- Julia, V., and Glaichenhaus, N. (1999): CD4(+) T cells which react to the *Leishmania major* LACK antigen rapidly secrete interleukin-4 and are detrimental to the host in resistant B10.D2 mice. *Infect Immun* 67, 3641-4.
- Kelly, B. L., Stetson, D. B., and Locksley, R. M. (2003): *Leishmania major* LACK antigen is required for efficient vertebrate parasitization. *J Exp Med* 198, 1689-98.
- Kost, T. A., Condreay, J. P., and Jarvis, D. L. (2005): Baculovirus as versatile vectors for protein expression in insect and mammalian cells. *Nat Biotechnol* 23, 567-75.
- Kubar, J., and Fragaki, K. (2005): Recombinant DNA-derived leishmania proteins: from the laboratory to the field. *Lancet Infect Dis* 5, 107-14.
- Landis, J. R., and Koch, G. G. (1977a): The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics* 33, 159-74.

- Landis, J. R., and Koch, G. G. (1977b): An application of hierarchical kappa-type statistics in the assessment of majority agreement among multiple observers. *Biometrics* 33, 363-74.
- Levick, M. P., Tetaud, E., Fairlamb, A. H., and Blackwell, J. M. (1998): Identification and characterisation of a functional peroxidoxin from *Leishmania major*. *Mol Biochem Parasitol* 96, 125-37.
- Maalej, I. A., Chenik, M., Louzir, H., Ben Salah, A., Bahloul, C., Amri, F., and Dellagi, K. (2003): Comparative evaluation of ELISAs based on ten recombinant or purified *Leishmania* antigens for the serodiagnosis of Mediterranean visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* 68, 312-20.
- Maia, C., and Campino, L. (2008): Methods for diagnosis of canine leishmaniasis and immune response to infection. *Vet Parasitol* 158, 274-87.
- Mauricio, I. L., Stothard, J. R., and Miles, M. A. (2000): The strange case of *Leishmania chagasi*. *Parasitol Today* 16, 188-9.
- Medin, J. A., Hunt, L., Gathy, K., Evans, R. K., and Coleman, M. S. (1990): Efficient, low-cost protein factories: expression of human adenosine deaminase in baculovirus-infected insect larvae. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 2760-4.
- Moreno, J., and Alvar, J. (2002): Canine leishmaniasis: epidemiological risk and the experimental model. *Trends Parasitol* 18, 399-405.
- Na, Z., Huipeng, Y., Lipan, L., Cuiping, C., Umashankar, M. L., Xingmeng, L., Xiaofeng, W., Bing, W., Weizheng, C., and Cen, J. L. (2008): Efficient production of canine interferon-alpha in silkworm *Bombyx mori* by use of a BmNPV/Bac-to-Bac expression system. *Appl Microbiol Biotechnol* 78, 221-6.
- Nieto, C. G., Garcia-Alonso, M., Requena, J. M., Miron, C., Soto, M., Alonso, C., and Navarrete, I. (1999): Analysis of the humoral immune response against total and recombinant antigens of *Leishmania infantum*: correlation with disease progression in canine experimental leishmaniasis. *Vet Immunol Immunopathol* 67, 117-30.
- O'Connell, K. P., Kovaleva, E., Campbell, J. H., Anderson, P. E., Brown, S. G., Davis, D. C., Valdes, J. J., Welch, R. W., Bentley, W. E., and van Beek, N. A. (2007): Production of a recombinant antibody fragment in whole insect larvae. *Mol Biotechnol* 36, 44-51.
- O'Reilly, D. R. (1997): Use of baculovirus expression vectors. *Methods Mol Biol* 62, 235-46.
- Passos, S., Carvalho, L. P., Orge, G., Jeronimo, S. M., Bezerra, G., Soto, M., Alonso, C., and Carvalho, E. M. (2005): Recombinant leishmania antigens for serodiagnosis of visceral leishmaniasis. *Clin Diagn Lab Immunol* 12, 1164-7.
- Peng, Z. K., Simons, F. E., and Becker, A. B. (1991): Differential binding properties of protein A and protein G for dog immunoglobulins. *J Immunol Methods* 145, 255-8.
- Perez-Filgueira, D. M., Gonzalez-Camacho, F., Gallardo, C., Resino-Talavan, P., Blanco, E., Gomez-Casado, E., Alonso, C., and Escribano, J. M. (2006): Optimization and validation of recombinant serological tests for African Swine Fever diagnosis based on detection of the p30 protein produced in *Trichoplusia ni* larvae. *J Clin Microbiol* 44, 3114-21.
- Perez-Filgueira, D. M., Resino-Talavan, P., Cubillos, C., Angulo, I., Barderas, M. G., Barcena, J., and Escribano, J. M. (2007): Development of a low-cost, insect larvae-derived recombinant subunit vaccine against RHDV. *Virology* 364, 422-30.
- Perez-Martin, E., Grau-Roma, L., Argilaguuet, J. M., Nofrarias, M., Escribano, J. M., Gomez-Sebastian, S., Segales, J., and Rodriguez, F. (2008): Development of two *Trichoplusia ni* larvae-derived ELISAs for the detection of antibodies against replicase and capsid proteins of porcine circovirus type 2 in domestic pigs. *J Virol Methods* 154, 167-74.
- Quinnell, R. J., Courtenay, O., Davidson, S., Garcez, L., Lambson, B., Ramos, P., Shaw, J. J., Shaw, M. A., and Dye, C. (2001): Detection of *Leishmania infantum* by PCR, serology and cellular immune response in a cohort study of Brazilian dogs. *Parasitology* 122, 253-61.
- Rabah, N., Gauthier, D. J., Gauthier, D., and Lazure, C. (2004): Improved PC1/3 production through recombinant expression in insect cells and larvae. *Protein Expr Purif* 37, 377-84.
- Ramirez, J. R., Berberich, C., Jaramillo, A., Alonso, C., and Velez, I. V. (1998): Molecular and antigenic characterization of the *Leishmania (Viannia) panamensis* kinetoplastid membrane protein-11. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 93, 247-54.
- Ramiro, M. J., Zarate, J. J., Hanke, T., Rodriguez, D., Rodriguez, J. R., Esteban, M., Lucientes, J., Castillo, J. A., and Larraga, V. (2003): Protection in dogs against visceral leishmaniasis caused by *Leishmania infantum* is achieved by immunization with a heterologous prime-boost regime using DNA and vaccinia recombinant vectors expressing LACK. *Vaccine* 21, 2474-84.
- Requena, J. M., Soto, M., Doria, M. D., and Alonso, C. (2000): Immune and clinical parameters associated with *Leishmania infantum* infection in the golden hamster model. *Vet Immunol Immunopathol* 76, 269-81.

- Riera, C., Valladares, J. E., Gallego, M., Aisa, M. J., Castillejo, S., Fisa, R., Ribas, N., Carrio, J., Alberola, J., and 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.
- Rodriguez-Cortes, A., Ojeda, A., Lopez-Fuertes, L., Timon, M., Altet, L., Solano-Gallego, L., Sanchez-Robert, E., Francino, O., and Alberola, J. (2007): Vaccination with plasmid DNA encoding KMP11, TRYP, LACK and GP63 does not protect dogs against *Leishmania infantum* experimental challenge. *Vaccine* 25, 7962-71.
- Rodriguez, A., Solano-Gallego, L., Ojeda, A., Quintana, J., Riera, C., Gallego, M., Portus, M., and Alberola, J. (2006): Dynamics of *Leishmania*-specific immunoglobulin isotypes in dogs with clinical leishmaniasis before and after treatment. *J Vet Intern Med* 20, 495-8.
- Russo, D. M., Turco, S. J., Burns, J. M., Jr., and Reed, S. G. (1992): Stimulation of human T lymphocytes by *Leishmania* lipophosphoglycan-associated proteins. *J Immunol* 148, 202-7.
- Solano-Gallego, L., Morell, P., Arboix, M., Alberola, J., and 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, 560-3.
- Stebeck, C. E., Beecroft, R. P., Singh, B. N., Jardim, A., Olafson, R. W., Tuckey, C., Prenevost, K. D., and Pearson, T. W. (1995): Kinetoplastid membrane protein-11 (KMP-11) is differentially expressed during the life cycle of African trypanosomes and is found in a wide variety of kinetoplastid parasites. *Mol Biochem Parasitol* 71, 1-13.
- Tolson, D. L., Jardim, A., Schnur, L. F., Stebeck, C., Tuckey, C., Beecroft, R. P., Teh, H. S., Olafson, R. W., and Pearson, T. W. (1994): The kinetoplastid membrane protein 11 of *Leishmania donovani* and African trypanosomes is a potent stimulator of T-lymphocyte proliferation. *Infect Immun* 62, 4893-9.
- Trujillo, C., Ramirez, R., Velez, I. D., and Berberich, C. (1999): The humoral immune response to the kinetoplastid membrane protein-11 in patients with American leishmaniasis and Chagas disease: prevalence of IgG subclasses and mapping of epitopes. *Immunol Lett* 70, 203-9.
- Van Oers, M. (2006): Vaccines for viral and parasitic diseases produced with baculovirus vectors. *Adv Virus Res* 68, 193-253.
- Webb, J. R., Campos-Neto, A., Ovendale, P. J., Martin, T. I., Stromberg, E. J., Badaro, R., and Reed, S. G. (1998): Human and murine immune responses to a novel *Leishmania major* recombinant protein encoded by members of a multicopy gene family. *Infect Immun* 66, 3279-89.
- Wyllie, S., Vickers, T. J., and Fairlamb, A. H. (2008): Roles of trypanothione S-transferase and trypanredoxin peroxidase in resistance to antimonials. *Antimicrob Agents Chemother* 52, 1359-65.

Estudio 2



HUMORAL AND *IN VIVO* CELLULAR IMMUNITY AGAINST THE RAW INSECT-DERIVED RECOMBINANT *LEISHMANIA INFANTUM* ANTIGENS KMPII, TRYP, LACK AND PABLE22 IN DOGS FROM AN ENDEMIC AREA

1. ABSTRACT

Identification of the antigens involved in *Leishmania*-specific protective immune response is a research priority for the development of effective control measures against this parasitic disease. For this purpose, we evaluated specific antibodies by ELISA and delayed-type hypersensitivity (DTH) skin test reaction against total *Leishmania infantum* antigen and the raw *Trichoplusia ni* insect-derived recombinant antigens KMPII, TRYP, LACK and papLe22 from this parasite in 27 dogs in Palma de Mallorca, Spain. The rate of *L. infantum* infection in the studied dogs resulted in 82 % (22/27) when combining the detection of anti-*Leishmania* specific humoral (crude total *Leishmania* antigen [CTLA] ELISA) and cellular (leishmanin skin test [LST] reaction) immune responses with parasitaemia measured by real-time PCR (qPCR). LST (64 %) was more sensitive than qPCR in blood (50 %) and serology for the detection of the infected dogs without clinical signs in the present study. The rate of patent canine leishmaniasis (CanL) was only 18 % [5/27]. Only animals suffering clinical CanL presented antibodies reacting against CTLA, and two of them also against rKMPII and rpapLe22. rTRYP induced the highest number of positive DTH responses (56 % of LST-positive dogs), suggesting its role as a T-cell immunogen during natural infection. In contrast, rKMPII (33 %), rLACK (22 %), and rpapLe22 (17 %) induced a lower number of reactions, thus proving to be weak T-cell immunogens. When TRYP-DTH and KMPII-DTH tests were evaluated in parallel, 78 % of LST-positive dogs were detected, not differing significantly from LST sensitivity. Our results suggest that TRYP antigen could be a promising vaccine candidate against CanL, and that both rTRYP and rKMPII could be considered as components of a standardized DTH immunodiagnostic tool for infected dogs without clinical signs.

2. INTRODUCTION

Visceral leishmaniasis (VL), a severe parasitic disease that is usually fatal if left untreated (<http://www.who.int/leishmaniasis/en/>) has an incidence of more than 500 000 new human cases each year. Zoonotic VL (ZVL) is caused by *Leishmania infantum* (syn. *Leishmania chagasi* (Mauricio *et al.*, 2000)) in both the Palearctic and the Neotropical ecozones. Dogs are the natural hosts and the main peridomestic reservoirs of the parasite (Moreno and Alvar, 2002). In ecoregions around the Mediterranean basin the prevalence of canine infection reaches 67 %–80 % in highly endemic areas (Berrahal *et al.*, 1996; Solano-Gallego *et al.*, 2001) with at least 2.5 million

dogs infected on the northern shore (Moreno and Alvar, 2002). Control of parasite burden in dogs by vaccination or treatment reduces the infectivity to the vector and the incidence of the disease in humans (Gradoni *et al.*, 1987; Borja-Cabrera *et al.*, 2002). Identification of the mechanisms and components involved in *Leishmania*-specific immune responses to improve diagnosis, prognosis, and vaccination is a research priority.

L. infantum-infected humans and dogs can develop several immune responses, ranging from predominantly specific cell-mediated immunity (CMI) to a predominantly humoral immune response, which has been associated with active disease (Badaro *et al.*, 1986; Cabral *et al.*, 1992; Carvalho *et al.*, 1992; Pinelli *et al.*, 1994). The cellular mechanisms underlying the protective immune response against *L. infantum* appear to involve a T_h1-like response, including production of IFN- γ by sensitized T cells to induce macrophage activation (Meller-Melloul *et al.*, 1991; Strauss-Ayali *et al.*, 2005; Holzmüller *et al.*, 2006). Measurement of IFN- γ production using cultured peripheral blood cells in response to *Leishmania* antigens is expensive, time-consuming, and cumbersome. Delayed-type hypersensitivity (DTH) reaction or type IV hypersensitivity reaction to an intradermal injection of a suspension of inactivated promastigotes (leishmanin skin test, LST) is an easy and semiquantitative test to measure *Leishmania*-specific CMI *in vivo* (Manson-Bahr *et al.*, 1959; Pinelli *et al.*, 1994). This test has been extensively used in large-scale immunoepidemiological studies in southwestern Europe as a marker of exposure to *Leishmania* in humans (Gramiccia *et al.*, 1990; Marty *et al.*, 1992; Acedo-Sánchez *et al.*, 1996; Moral *et al.*, 2002; Riera *et al.*, 2008) and much less in dogs (Cardoso *et al.*, 1998; Solano-Gallego *et al.*, 2000; Cardoso *et al.*, 2007). The LST result is usually negative during clinical VL and canine leishmaniasis (CanL) (Carvalho *et al.*, 1992; Pinelli *et al.*, 1994; Molano *et al.*, 2003; Poot *et al.*, 2005; Dos-Santos *et al.*, 2008), whereas a positive LST result is detected during subclinical infection (Cardoso *et al.*, 1998; Solano-Gallego *et al.*, 2000; Borja-Cabrera *et al.*, 2002; Molano *et al.*, 2003), early stages of VL and CanL (Kurkjian *et al.*, 2006; Rodríguez-Cortés *et al.*, 2007b), or after successful treatment (Kemp *et al.*, 1993; Ferrer *et al.*, 2002; Caldas *et al.*, 2005; Borja-Cabrera *et al.*, 2008; Gomez-Ochoa *et al.*, 2009). Several vaccination studies conducted in dogs have shown that animals that converted to a positive LST result were protected against the disease (Mohebbi *et al.*, 1998; Borja-Cabrera *et al.*, 2002; Molano *et al.*, 2003; Rafati *et al.*, 2005), as in human beings (Khalil *et al.*, 2000; Khalil *et al.*, 2006). Unfortunately, the development of this immunodiagnostic method has been hampered by the lack of a standardized product, and a test to evaluate *Leishmania*-specific CMI *in vivo* in humans or dogs is currently not available in clinical practice.

Recombinant *Leishmania* proteins have been intensively tested as diagnostic reagents, vaccine candidates, and drug targets over the past 20 years (Kubar and Fragaki, 2005). Recombinant

proteins make it possible to identify specific B-cell and T-cell immunogens so that more accurate diagnostic and prognostic tools can be developed (Maia and Campino, 2008). Moreover, discrimination between potentially protective and potentially aggravating antigens would allow a more rational development of experimental vaccines. Baculovirus-insect larvae expression system has proven to be a valuable system for the production of large amounts of high-quality yet inexpensive recombinant proteins (Medin *et al.*, 1995; Van Oers, 2006). This eukaryote-based system makes it possible to obtain high-quality proteins processed with most of the post-translational modifications of higher eukaryotes (Kost *et al.*, 2005). A wide variety of recombinant proteins have been expressed in insect larvae to be used for serodiagnosis (Barderas *et al.*, 2000; Gomez-Sebastian *et al.*, 2008; Perez-Martin *et al.*, 2008), vaccination strategies (Barderas *et al.*, 2001; Perez-Filgueira *et al.*, 2007), or production of reagents (Medin *et al.*, 1990; O'Connell *et al.*, 2007; Na *et al.*, 2008).

In the present study, we evaluated and compared the serological and DTH response to crude total *L. infantum* antigen (CTLA) and four recombinant evolutionarily conserved antigens from this parasite: KMPII (kinetoplastid membrane protein-11, formerly known as KMP-11), TRYP (tryparedoxin peroxidase, previously known as TSA), LACK (*Leishmania* homologue of receptors for activated C kinase) and papLe22 (22-kDa potentially aggravating protein of *Leishmania*). The four antigens were produced in recombinant baculovirus-infected *Trichoplusia ni* larvae and tested in a group of dogs living in a highly *Leishmania*-endemic area (Mallorca, Spain). These antigens have been used elsewhere as targets for vaccines (Fragaki *et al.*, 2001; Ramiro *et al.*, 2003; Rodriguez-Cortes *et al.*, 2007c; Carson *et al.*, 2009) and for serodiagnosis of CanL (Berberich *et al.*, 1997; Todoli *et al.*, 2009); however, their role in *L. infantum*-specific CMI in naturally infected dogs has not been evaluated. The main objective of this work was to determine whether these antigens are T-cell immunogens in dogs naturally infected with *Leishmania* and to assess their usefulness as a standardized low-cost DTH-based immunodiagnostic tool or as possible vaccine candidates in the canine model.

3. MATERIAL AND METHODS

3.1. Obtention of recombinant KMPII, TRYP, LACK, and papLe22 proteins

Recombinant proteins were obtained as previously described (Todoli *et al.*, 2009). Briefly, *KMPII*, *TRYP*, *LACK*, and *papLe22* genes were cloned into plasmid TOPO® TA Cloning® vector (Invitrogen™, Carlsbad, California, USA). Table 1 shows the Genbank accession numbers of the sequences used for primer design and the nucleotide sequences of forward and reverse primers

for each *L. infantum* gene cloned. Recombinant bacmids carrying *KMP11*, *TRYP*, *LACK* and *papLe22* genes produced by the Bac-to-Bac® system (Invitrogen™) were used to transfect *Spodoptera frugiperda* Sf21 cells and to obtain the recombinant baculoviruses. Additionally, a pFastBac™1 vector with noninsert clones was used to produce the wild-type baculovirus to obtain the control raw protein extract for both ELISA and the DTH skin test (Ni extract). *T. ni* larvae were reared under non-sterile level 2 biosafety conditions (Perez-Filgueira *et al.*, 2006). Fifth instar larvae were sedated by incubation on ice for 15 min and then intracoelemically injected near the proleg, towards the front of the body cavity, with 10 µL of the above-mentioned recombinant baculovirus preparations ($\sim 4 \times 10^7$ pfu·mL⁻¹). Inoculated larvae were kept in growth chambers at 28 °C for 96 h and then frozen immediately at -20 °C until processed. Total protein was solubilized from frozen larvae by homogenizing on ice using extraction buffer: phosphate buffered saline [PBS], pH 7.2, 0.01% Triton® X-100, 25 mM dithiothreitol, and a protease inhibitor cocktail (Complete™, Roche, Basel, Switzerland). After centrifugation, the supernatant was filtered, recentrifuged, and lyophilized overnight. Samples were stored at 4 °C until used. Specific recombinant proteins were detected in a 15% SDS-PAGE stained with Coomassie brilliant blue (Bio-Rad®, Laboratories Inc., Hercules, California, USA). The 4 recombinant proteins were observed as bands of the expected molecular weight: 11, 14, 22 and 34kDa for rKMP11, rpapLe22, rTRYP and rLACK, respectively (Fragaki *et al.*, 2001, Todoli *et al.*, 2009). Band intensity corresponding to recombinant proteins was calculated using a Tina 2.0 image analyzer software package (Raytest, Straubenhardt, Germany) and the concentration inferred in relation to a curve of a known protein concentration (bovine serum albumin). Concentrations of specific recombinant proteins in extracts were 1% for rKMP11, 0.5% for rTRYP, 2% for rpapLe22, and 5% for rLACK.

Table 1. GenBank accession number and primer sequences of *L. infantum* recombinant antigens

Gene (accession number)	Primer	
<i>KMP11</i> (X95627)	Forward	5'-ATGGCCACCACGTACGAGGAGTTTTTCG-3'
	Reverse	5'-TTACTTGGATGGGTACTGCGCAGC-3'
<i>TRYP</i> (AF044679)	Forward	5'-CCAGCCATGTCCTGCGGTAACGCCAAG-3'
	Reverse	5'-AGGTTTACTGCTTGCTGAAGTATCCTTC-3'
<i>LACK</i> (U49695)	Forward	5'-ACCATGAACTACGAGGGTCACC-3'
	Reverse	5'-TTACTCGGCGTCGGAGATGGACC-3'
<i>papLe22</i> (X95627)	Forward	5'-GGCCAATTCTCTCTTCTCCA -3'
	Reverse	5'-CTTGCCACATACACCAATCG-3'

3.2. Dogs

The study was conducted in June 2008 in Mallorca, Spain, a highly endemic area for *L. infantum* (Solano-Gallego *et al.*, 2001). Twenty-seven dogs of different breeds (14 females and 13 males) from the Animal Pound of Palma de Mallorca were included in the study. Their ages ranged from 6 months to 7.5 years with a mean \pm standard deviation of 3 ± 1.8 years. Prior to sampling, all dogs were examined to detect clinical signs compatible with CanL. The dogs were then sedated using $10 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ of medetomidine (Domtor®, Pfizer, New York, USA) intramuscularly to take blood samples and perform DTH tests. Dogs were considered infected by *Leishmania* when they had a positive result to serology testing with CTLA and/or LST and/or real-time PCR (qPCR) in blood samples (Solano-Gallego *et al.*, 2000; Silveira *et al.*, 2009). All the procedures were performed with the approval of the Animal Pound of Palma de Mallorca Ethics Committee.

3.3. Blood samples

Blood was collected by jugular venipuncture before DTH tests were performed. Sera were obtained after centrifugation of blood samples at $2000 \times g$ for 20 min. Serum and blood clot samples were stored at $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ until use.

3.4. Real-time PCR amplification of *L. infantum* DNA in blood samples

L. infantum DNA was specifically detected and quantified by Taqman® qPCR (Applied Biosystems, Foster City, California, USA) performed by the Servei Veterinari de Genètica Molecular, Universitat Autònoma de Barcelona, as described elsewhere (Francino *et al.*, 2006). Briefly, DNA was extracted from blood clots and qPCR was performed targeting conserved DNA regions of the kinetoplast minicircle DNA from *L. infantum*. The eukaryotic 18S rRNA Pre-Development TaqMan Assay reagents (Applied Biosystems) were used as an internal reference. *L. infantum* DNA load in each sample was determined by relative quantification using the $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ method (Livak and Schmittgen, 2001). Results were expressed as x-fold more DNA copies than the calibrator sample (dog M7).

3.5. Recombinant and crude total *L. infantum* antigen-based ELISA

ELISA to detect serum antibodies against rKMPII, rTRYP, rpapLe22, and rLACK antigens, and against CTLA was performed as previously described (Riera *et al.*, 1999, Todoli *et al.*, 2009). Briefly, microtiter plates were coated with raw protein larva extracts containing the recombinant proteins ($1.3 \mu\text{g}$ per well for rKMPII, $5.0 \mu\text{g}$ for rTRYP, $24.4 \mu\text{g}$ for rLACK, and $10.0 \mu\text{g}$ for

rpapLe22), with the control Ni extract at the same concentrations, or with CTLA (2 µg per well). After a blocking step, plates were sequentially incubated with sera and Protein A conjugated to horseradish peroxidase (Pierce, Rockford, Illinois, USA). Working dilutions (sera dilution:protein A-HRP dilution) were 1/200:1/5000 for rKMPII, 1/800:1/2500 for rTRYP, 1/400:1/7500 for rLACK, 1/100:1/5000 for rpapLe22, and 1/400:1/15000 for CTLA. Absorbance values were read at 492 nm in an automatic microELISA reader (Anthos 2001, Anthos Labtec Instruments, Eugendorf, Austria). Each serum sample was tested under equal conditions against both protein larva extracts containing each recombinant antigen and control Ni extract in the same plate.

Results were expressed as optical densities (OD). A pool of known positive sera to crude total *L. infantum* antigen and a pool of negative sera from non-endemic areas were included in all plates as a positive control and a negative control, respectively. A known positive serum used as calibrator was included in all plates, and plates with interassay variations $\geq 10\%$ were ruled out. For ELISAs using recombinant antigens, absorbances were corrected by subtracting the absorbance achieved by the serum on the control antigen Ni extract from that achieved on the protein larva extract containing specific recombinant antigen. The ELISA cut-off values (mean + 3SD for 76 dogs from non-endemic areas) were 0.180 OD for CTLA, 0.100 OD for rKMPII, 0.082 OD for rTRYP, 0.060 OD for rpapLe22, and 0.005 OD for rLACK.

3.6. DTH tests using leishmanin and recombinant *L. infantum* proteins

In vivo CMI was determined in each dog by measuring the DTH response against leishmanin reagent, against raw *L. infantum* recombinant protein extracts containing rKMPII, rTRYP, rpapLe22, and rLACK, and against raw antigen Ni as a negative control. Leishmanin reagent consisted of a suspension of 3×10^8 inactivated *L. infantum* (MHOM/FR/78/LEM75) promastigotes per mL in 0.4 % phenol-saline solution (kindly provided by Instituto de Salud Carlos III). Working concentrations of recombinant protein extracts for use in DTH reactions were set up in a pilot study (data not shown). rKMPII, rTRYP, rpapLe22, and rLACK DTH test reagents were set at $4 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ of specific *Leishmania* antigen diluted in pyrogen-free saline solution. The negative control for recombinant antigens, Ni reagent, was set at $730 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ of raw larva extract in pyrogen-free saline solution, equivalent to the maximum concentration of raw larva extract used in specific *Leishmania* antigen preparations (rTRYP reagent). A volume of 0.1 mL of each reagent was intradermally inoculated. The six injections were distributed 1.5–2 cm apart on both sides of the groin skin. The DTH response was assessed by measuring the size of the induration and erythematous area (mean of two perpendicular diameters) produced against each reagent at 48 h and 72 h postinjection. A DTH response against leishmanin reagent > 5 mm was considered positive (Cardoso *et al.*, 1998; Solano-Gallego *et al.*, 2000). The DTH response against each of the

recombinant antigens was corrected by subtracting the DTH response to Ni, thus a corrected DTH response > 5 mm was considered positive.

3.7. Data analysis

All statistical tests were performed using SPSS version 15.0 (SPSS Inc, Chicago, Illinois, USA). Data were analyzed by means of nonparametric tests. A *P*-value < 0.05 was considered significant.

4. RESULTS

Clinical signs compatible with CanL, parasite load, specific antibody reactivity and DTH test results against CTLA and the recombinant proteins in the 27 dogs from Mallorca are listed in Table 2.

4.1. Clinical status and *L. infantum* infection rates

Five of the 27 dogs (18 %) included in the study presented clinical signs compatible with CanL. Two showed generalized lymphadenomegaly, 2 presented periauricular cutaneous lesions, and 1 showed classic clinical signs of CanL, namely, severe emaciation and generalized exfoliative dermatitis.

The 5 dogs with clinical signs compatible with leishmaniosis were the only ones that demonstrated specific antibodies against CTLA. In addition, the dog that manifested more severe clinical signs (M19) was the one with the highest *L. infantum*-specific antibody levels (3.0 OD). The remaining dogs (82 %) showed neither clinical signs compatible with CanL nor specific antibodies against CTLA.

Eighteen dogs (67 %) including all but 1 CTLA-positive dogs developed a positive LST reaction at 48 h and/or 72 h post-injection. The intensity of the reaction recorded in dogs with a positive LST response (median mm [interquartile range]) was 8 mm (6.5–9.8).

L. infantum DNA was detected in the blood samples of 13 dogs (48 %). The amount of *Leishmania* DNA was generally low with a median 7.0-fold increase over M7 (range, 1.00-131.2). Although only 2 of these 13 dogs showed antibodies against CTLA, 10 of them developed a positive LST reaction.

Combining the results of the 3 techniques (CTLA serology, LST, and qPCR) revealed the rate of *L. infantum* infection in this group of dogs to be 82 % (22/27).

4.2. Specific humoral response against recombinant *L. infantum* antigens

Two dogs (M16 and M19) showed positive anti-rpapLe22 antibody levels. One of these dogs (M19) also showed antibodies against rKMPII. Positive anti-rTRYP or anti-rLACK antibody levels were not detected in any dog.

4.3. DTH response against recombinant *L. infantum* antigens

The highest percentage of DTH responses in the group of 27 dogs was detected against rTRYP antigen (44 % of all dogs studied [12/27], 56 % of the LST-positive dogs [10/18], and 50 % of dogs considered infected [11/22]). Lower percentages of positive DTH reactions were detected against rKMPII antigen (22 % of all studied dogs [6/27], 33 % of the LST-positive dogs [6/18], and 27 % of dogs considered as infected [6/22]). Finally, few dogs showed a DTH-positive response against rLACK antigen (19 % of all studied dogs [5/27], 22 % of LST-positive dogs [4/18], and 18 % of dogs considered as infected [4/22]) and against rpapLe22 antigen (19 % of all studied dogs [5/27], 17 % of LST-positive dogs [3/18], and 18 % of dogs considered infected [4/22]).

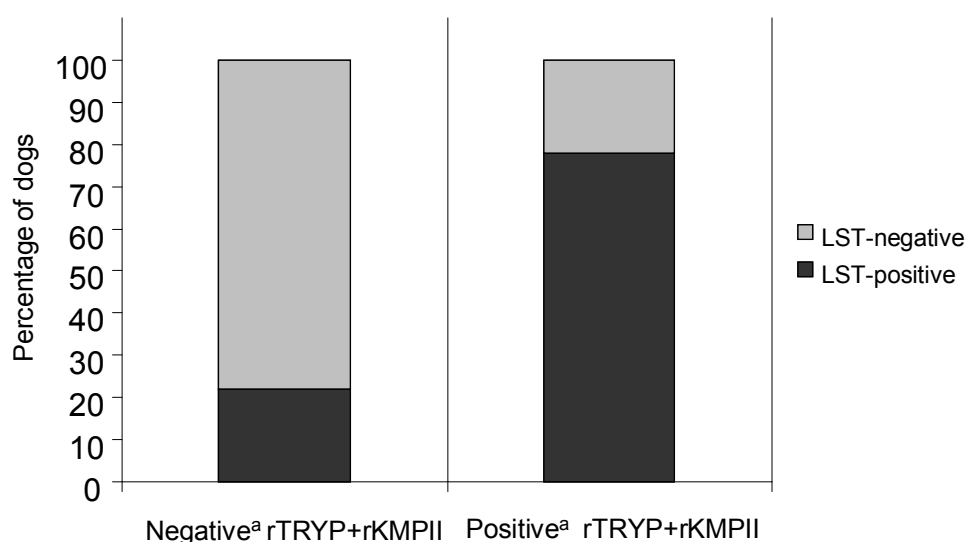
The intensity of reaction recorded in dogs with a positive DTH response (median mm [interquartile range]) was 7.0 mm (5.6–11.0) against rKMPII, 7.5 mm (5.9–10.0) against rTRYP, 6.0 mm (5.5–6.5) against rLACK, and 7.5 mm (7.0–7.5) against rpapLe22.

We compared the number and intensity of DTH reactions induced by the recombinant antigens in relation to those induced by leishmanin reagent. The 5 DTH tests produced a different number and intensity of reactions (Cochran's Q test; $P < 0.001$ for both comparisons), although *post hoc* multiple pairwise comparisons (False Discovery Rate (Benjamini and Hochberg, 1995) corrected $\alpha = 0.0275$) showed that the results of the LST and rTRYP-DTH test did not differ significantly, and that they produced a higher number ($P = 0.109$) and intensity of reactions ($P = 0.044$) than the other DTH tests.

We also evaluated the potential of the recombinant antigens for detecting dogs with a positive LST reaction. rTRYP produced the highest number of DTH-positive reactions among dogs with positive LST [10/18], but its sensitivity in relation to LST was very low (0.56 [confidence interval (CI): 0.28–0.80]). Thus, we combined the results of rTRYP with the results obtained with the other recombinant DTH tests to investigate a combination with a sensitivity and specificity similar to that

of leishmanin reagent. The combination of the rTRYP and rKMPII DTH results revealed a sensitivity of 0.78 [CI, 0.52–0.92], a specificity of 0.78 [CI, 0.41–0.95], and an accuracy of 0.78 [0.62–0.93] in relation to LST. The results are shown in Figure 1. Combination of the DTH results of the 4 recombinant antigens in parallel improved the sensitivity (0.83 [CI, 0.58–0.95]), but decreased the specificity (0.67 [CI, 0.30–0.90]), finally achieving the same accuracy as the combination of rTRYP and rKMPII DTH in parallel (0.78 [CI, 0.62–0.93]). Both combinations showed a significant relationship with the LST test (Fisher exact test, $P = 0.011$ for rKMPII and rTRYP DTH results in parallel and $P = 0.026$ for the 4 recombinant antigens DTH results in parallel).

Figure 1. Comparison of sensitivity and specificity between rTRYP-DTH and rKMPII-DTH test results evaluated in parallel and LST result in 27 dogs in Mallorca, Spain.



^a A dog was considered positive for the combination of rTRYP and rKMPII DTH tests evaluated in parallel if it showed a positive DTH reaction against rTRYP and/or rKMPII; otherwise it was considered negative.

5. DISCUSSION

In the present study, we used DTH tests to investigate the role of four evolutionarily conserved *L. infantum* proteins—KMPII, TRYP, LACK and papLe22—as T-cell immunogens in dogs living in an endemic area. To our knowledge, only one recently published study has used a recombinant *Leishmania* protein as a DTH test reagent (the recombinant cysteine proteinase rLdcccys1) to detect CMI *in vivo* in naturally infected dogs, with very promising results (Pinheiro *et al.*, 2009). Our study is the first to use recombinant proteins expressed in insect larvae for DTH testing. The

recombinant *L. infantum* proteins were successfully produced in baculovirus-infected *Trichoplusia ni* larvae. This is an easy and inexpensive system that can be applied in endemic countries.

The dogs included in the study were from Mallorca, a highly *L. infantum*-endemic area (Solano-Gallego *et al.*, 2000). By combining the detection of anti-*Leishmania*-specific humoral (CTLA ELISA) and cellular (LST reaction) immune responses with the detection of parasites in blood by qPCR, we found the rate of *L. infantum* infection in the study dogs to be 82 % (22/27). This high rate of infection is similar to that of previous reports in this area (77 % around the village of Felanitx) (Solano-Gallego *et al.*, 2000). Only 18 % of dogs presented patent clinical leishmaniasis, whereas 67 % developed a positive reaction to LST. A positive LST result indicates previous *Leishmania* exposure (Gomes *et al.*, 2002) and is generally thought to reflect durable and protective CMI (Pinelli *et al.*, 1994; Cardoso *et al.*, 1998; Borja-Cabrera *et al.*, 2002; Molano *et al.*, 2003). In agreement with previous studies, our results show that most dogs living in a *Leishmania*-endemic area display a resistant immunological profile against *L. infantum* infection (Cardoso *et al.*, 1998; Solano-Gallego *et al.*, 2000) and that clinical disease represents only a small part of the real infection by the *Leishmania* parasite (Baneth *et al.*, 2008).

rTRYP induced the highest percentage of positive DTH responses, and was detected in 56 % of dogs with a positive LST reaction. These results indicate that TRYP could be a potent T-cell immunogen in the canine model, and that it might be involved in protective *L. infantum*-specific CMI, at least in half of naturally infected dogs. Of the four recombinant DTH reagents tested in the present study, only TRYP-DTH did not differ significantly from LST with regard to the percentage of positivity and intensity of reaction, thus indicating that TRYP could be used as a component of a standardized DTH test. This antigen has been shown to stimulate T-cell proliferation in patients who have recovered from VL (Webb *et al.*, 1998), and it is a component of the trifusion Leish-111f vaccine, which has demonstrated immunogenicity in dogs (Fujiwara *et al.*, 2005) and protection against cutaneous or mucosal leishmaniasis in mice and nonhuman primates (Campos-Neto *et al.*, 2001), now being assayed in humans (<http://clinicaltrials.gov/show/NCT00121862>). Supporting its value as a vaccine candidate, TRYP has proved highly immunogenic in a DNA/MVA vaccine strategy against CanL (Carson *et al.*, 2009). Furthermore, the DTH response against this antigen in vaccinated dogs correlated with high production of *Leishmania*-specific IFN- γ .

The present results show that only 33 % of the LST-positive dogs developed a positive DTH skin reaction against rKMPII, indicating that, compared with rTRYP, this antigen is a weak inducer of CMI in naturally *L. infantum*-infected dogs. Accordingly, the antigenic and T-cell immunogenic potential of KMPII studied during experimental canine *L. infantum* infection showed that, although this antigen induced a T_h1 cytokine expression pattern, the production of IFN- γ was only moderate

(Carrillo *et al.*, 2008). In humans, KMPII has been shown to stimulate T cells from patients who have recovered from *L. donovani* infection (Kemp *et al.*, 1993; Jensen *et al.*, 1998) and to induce production of both IFN- γ and IL-4 (Kemp, 1993; Kurtzhals, 1994; Jensen, 1998) or IL-10 (de Carvalho *et al.*, 2003; Basu *et al.*, 2007). Thus, KMPII does not induce a T_h1 reaction but a mixed T_h1/T_h2 reaction in these individuals.

Few LST-positive dogs showed a DTH-positive response against rLACK (22 %) or rpapLe22 (17 %) in the present study. These results indicate that a specific CMI against LACK or papLe22 is not common in clinically healthy naturally *L. infantum*-infected dogs. In this sense, LACK does not induce lymphoproliferation in patients cured of VL (Maasho *et al.*, 2001), and papLe22 elicits production of IL-10 but not of IFN- γ (Suffia *et al.*, 2000). Both antigens play a prominent role in the pathogenesis of *Leishmania* infection in patients with different clinical presentations (Suffia *et al.*, 2000; Carvalho *et al.*, 2005). However, vaccine strategies, such as DNA or *prime-boost* vaccines, which are able to induce a strong T_h1 immune response, have proven able to obtain protection against VL, probably by promoting a redirection of their T_h2 immune response towards a T_h1 profile (Fragaki *et al.*, 2001; Dondji *et al.*, 2005; Ramos *et al.*, 2008).

LST was the most sensitive tool for the diagnosis of subclinical canine *L. infantum* infection, and detected 64 % of infections in dogs with no clinical signs. LST has been reported elsewhere to be a sensitive technique for the detection of subclinically infected dogs, as CMI plays a key role in these animals (Fernandez-Bellon *et al.*, 2005). Only 50 % of the dogs with no clinical signs of CanL showed parasitaemia detected by qPCR, and none of them presented anti-*Leishmania* antibodies by ELISA. The presence of seronegative dogs with parasitaemia and an LST-positive response suggests that specific CMI against the parasite might develop earlier than a humoral response. In fact, parasitaemia is not always necessarily linked to clinically patent CanL, and can be controlled in clinically healthy *L. infantum*-infected dogs (Solano-Gallego *et al.*, 2009). Other studies have suggested that detection of parasites by PCR techniques in blood is not a method of choice for diagnosing subclinically infected dogs (Manna *et al.*, 2004; Rodriguez-Cortes *et al.*, 2007b). Although more invasive, samples such as lymph node, bone marrow, or skin would have made PCR more sensitive (Solano-Gallego *et al.*, 2001; Moreira *et al.*, 2007; Maia *et al.*, 2009).

The lack of a standardized antigen is the main drawback of the LST. Leishmanin reagent is an amalgam of antigens, some of which activate a strong T_h1 immune response, such as TRYP, and others that induce a T_h2 or weak T_h1 immune response, such as KMPII, LACK, and papLe22. Screening *Leishmania* antigens using DTH tests makes it possible to identify the antigens that may be related to host protection against the parasite. The selected antigens could be used in the future as a standardized tool for diagnosis of subclinically *L. infantum*-infected dogs, in clinical trials with

vaccines, and even to predict the outcome of disease and treatment. This approach has been applied in the diagnosis of bovine tuberculosis (Pollock *et al.*, 2003) and to evaluate clinical trials with vaccine against malaria (Kublin *et al.*, 2002) or hepatitis B (Vandepapeliere *et al.*, 2008) in humans. In the present study, a high percentage of dogs reacting to leishmanin reagent also showed a positive DTH response against rTRYP and/or rKMPII (78 % of LST-positive dogs). Due to the different MHC-II repertory in dogs (Kennedy *et al.*, 2000), a cocktail of different antigens would provide better coverage for diagnosis of *L. infantum*. The estimated sensitivity, specificity, and accuracy of the combination of these two antigens used in parallel compared with LST was 78 %. Our results suggest that a multiantigenic DTH test including rTRYP and rKMPII could constitute a useful diagnostic tool for the detection of dogs subclinically infected with *L. infantum*.

Only dogs showing clinical signs (18 % of dogs included in the study) demonstrated specific antibodies against CTLA. In two of them, seroreactivity was found against rKMPII and/or rpapLe22. KMPII, TRYP, LACK, and papLe22 antigens have proven to be B-cell immunogens in humans and dogs with clinical leishmaniasis (Berberich *et al.*, 1997; Webb *et al.*, 1998; Fragaki *et al.*, 2001; Maalej *et al.*, 2003; Todoli *et al.*, 2009), but their seroprevalence in the study group was very low. It is important to highlight that most of the dogs in the present study did not manifest clinical signs compatible with leishmaniasis, and that overall CTLA seroprevalence was low. These findings are consistent with the association between negative to medium levels of specific antibodies and subclinical *L. infantum* infection in dogs (Solano-Gallego *et al.*, 2009).

Interestingly, four of the five dogs with clinical leishmaniasis developed a positive LST reaction. This result raises the question of the existence of a defined polarized dichotomy between LST(+) protection and LST(-) susceptibility in CanL. A broad spectrum of immunological profiles coexist in clinically healthy canine populations living in *Leishmania*-endemic areas (Cardoso *et al.*, 1998; Solano-Gallego *et al.*, 2000; Rodriguez-Cortes *et al.*, 2007a). Our results support the fact that such a wide range also exists in dogs with clinical leishmaniosis (Solano-Gallego *et al.*, 2009): from dogs with self-limiting disease (Ordeix *et al.*, 2005), or even dogs at the early stages of disease that develop specific CMI (Rodriguez-Cortes *et al.*, 2007b), to dogs with severe disease, a suppressed T-cell response, and an exaggerated humoral response (Pinelli *et al.*, 1994; Martinez-Moreno *et al.*, 1995). A positive LST result in a clinically healthy or sick *Leishmania*-infected dog probably reflects control of parasites, even in the presence of clinical signs, although several factors can break the balance and severe disease can develop (Baneth *et al.*, 2008).

In conclusion, our results indicate that the raw insect-derived recombinant antigens KMPII, TRYP, LACK, and papLe22 present T-cell epitopes responsible for the induction of a DTH response in dogs living in an *L. infantum*-endemic area. Whereas TRYP showed the highest DTH-positive

percentage in clinically healthy dogs, KMPII, LACK, and papLe22 proved to be weak T-cell immunogens. Our results suggest that TRYP could be a promising vaccine candidate or a component of a standardized DTH test, particularly when combined with KMPII. Further studies are needed to exploit the diagnostic and prognostic potential of this approach.

Table 2. Clinical signs, specific antibody reactivity, DTH test results against total *L. infantum* antigen and against recombinant *Leishmania* proteins rKMPII, rTRYP, rLACK, and rpapLe22 and qPCR in the blood of 27 dogs in Mallorca, Spain.

ID	Signs	ELISA										DTH						qPCR			
		CTLA		KMPII		TRYYP		LACK		papLe22		LST	KMPII		TRYYP		LACK		papLe22	Blood	
		EU	Res.	EU	Res.	EU	Res.	EU	Res.	EU	Res.	mm	Res.	mm	Res.	mm	Res.	mm	Res.	x-fold	
M1	-	0.000	-	0.000	-	0.000	-	0.000	-	0.000	-	5.0	+	0.0	-	5.0	+	0.0	-	0.0	131.2
M2	-	0.000	-	0.000	-	0.000	-	0.000	-	0.000	-	0.0	-	0.0	-	0.0	-	0.0	-	0.0	0.0
M3	-	0.000	-	0.000	-	0.000	-	0.000	-	0.000	-	0.0	-	0.0	-	0.0	-	0.0	-	0.0	34.7
M4	-	0.000	-	0.000	-	0.000	-	0.000	-	0.000	-	13.0	+	0.0	-	5.0	+	0.0	-	0.0	1.0
M5	-	0.000	-	0.000	-	0.000	-	0.000	-	0.000	-	8.0	+	5.5	+	0.0	-	0.0	-	0.0	0.0
M6	-	0.000	-	0.000	-	0.000	-	0.000	-	0.000	-	7.5	+	1.0	-	10.5	+	6.5	+	7.5	1.0
M7	+	0.260	+	0.000	-	0.000	-	0.000	-	0.000	-	10.5	+	0.0	-	0.0	-	0.0	-	0.0	1.0
M8	-	0.000	-	0.000	-	0.000	-	0.000	-	0.000	-	8.5	+	0.0	-	10.0	+	0.0	-	0.0	22.8
M9	-	0.000	-	0.000	-	0.000	-	0.000	-	0.000	-	0.0	-	0.0	-	0.0	-	0.0	-	0.0	3.5
M10	-	0.000	-	0.000	-	0.000	-	0.000	-	0.000	-	0.0	-	0.0	-	5.5	+	0.0	-	0.0	0.0
M11	-	0.000	-	0.000	-	0.000	-	0.000	-	0.000	-	0.0	-	0.0	-	0.0	-	0.0	-	0.0	0.0
M12	+	0.330	+	0.000	-	0.000	-	0.000	-	0.000	-	0.0	-	0.0	-	0.0	-	0.0	-	0.0	0.0
M13	-	0.000	-	0.000	-	0.000	-	0.000	-	0.000	-	0.0	-	0.0	-	6.0	+	0.0	-	6.0	14.0
M14	-	0.000	-	0.000	-	0.000	-	0.000	-	0.000	-	6.5	+	12.0	+	0.0	-	0.0	-	7.0	1.9
M15	-	0.000	-	0.000	-	0.000	-	0.000	-	0.000	-	14.0	+	0.0	-	12.5	+	6.0	+	0.0	2.2
M16	+	1.860	+	0.000	-	0.000	-	0.000	-	0.369	+	6.5	+	6.0	+	0.0	-	0.0	-	0.0	0.0
M17	-	0.000	-	0.000	-	0.000	-	0.000	-	0.000	-	8.0	+	0.0	-	11.0	+	5.5	+	0.0	7.0
M18	-	0.000	-	0.000	-	0.000	-	0.000	-	0.000	-	0.0	-	0.0	-	0.0	-	5.5	+	7.5	0.0
M19	+	3.000	+	1.737	+	0.000	-	0.000	-	0.255	+	5.0	+	0.0	-	0.0	-	0.0	-	0.0	45.7
M20	-	0.000	-	0.000	-	0.000	-	0.000	-	0.000	-	5.5	+	8.0	+	0.0	-	0.0	-	0.0	0.0
M21	-	0.000	-	0.000	-	0.000	-	0.000	-	0.000	-	8.0	+	0.0	-	0.0	-	0.0	-	8.0	0.0
M22	-	0.000	-	0.000	-	0.000	-	0.000	-	0.000	-	9.0	+	0.0	-	8.0	+	10.0	+	0.0	0.0
M23	-	0.000	-	0.000	-	0.000	-	0.000	-	0.000	-	16.5	+	0.0	-	0.0	-	0.0	-	0.0	0.0
M24	+	0.330	+	0.000	-	0.000	-	0.000	-	0.000	-	8.0	+	0.0	-	8.5	+	0.0	-	0.0	0.0
M25	-	0.000	-	0.000	-	0.000	-	0.000	-	0.000	-	0.0	-	0.0	-	0.0	-	0.0	-	0.0	0.0
M26	-	0.000	-	0.000	-	0.000	-	0.000	-	0.000	-	5.0	+	0.0	-	7.0	+	0.0	-	0.0	0.0
M27	-	0.000	-	0.000	-	0.000	-	0.000	-	0.000	-	10.0	+	15.0	+	6.0	+	0.0	-	0.0	13.7
n	5	5	5	1	0	0	0	2	18	5	12	5	5	12	5	5	5	5	13		
Percentage of positive dogs in relation to:																					
All dogs											LST+	KMPII+	TRYYP+	LACK	papLe22+	qPCR+					
Infected dogs											67	22	44	19	19	48					
Dogs without clinical signs											82	27	50	18	18	59					
Infected dogs without clinical signs											64	23	50	23	23	50					
LST+ dogs											82	29	59	24	24	65					
LST+ dogs											100	33	56	22	22	56					

REFERENCES

- Acedo-Sánchez, C., Martín-Sánchez, J., Vélez-Bernal, I. D., Sanchís-Marín, M. C., Louassini, M., Maldonado, J. A., and Morillas-Márquez, F. (1996): Leishmaniasis eco-epidemiology in the Alpujarra Region (Granada province, sothern Spain). *Int J Parasitol* 25, 303-310.
- Badaro, R., Jones, T. C., Carvalho, E. M., Sampaio, D., Reed, S. G., Barral, A., Teixeira, R., and Johnson, W. D., Jr. (1986): New perspectives on a subclinical form of visceral leishmaniasis. *J Infect Dis* 154, 1003-11.
- Baneth, G., Koutinas, A. F., Solano-Gallego, L., Bourdeau, P., and Ferrer, L. (2008): Canine leishmaniosis - new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. *Trends Parasitol* 24, 324-30.
- Barderas, M. G., Wigdorovitz, A., Merelo, F., Beitia, F., Alonso, C., Borca, M. V., and Escribano, J. M. (2000): Serodiagnosis of African swine fever using the recombinant protein p30 expressed in insect larvae. *J Virol Methods* 89, 129-36.
- Barderas, M. G., Rodriguez, F., Gomez-Puertas, P., Aviles, M., Beitia, F., Alonso, C., and Escribano, J. M. (2001): Antigenic and immunogenic properties of a chimera of two immunodominant African swine fever virus proteins. *Arch Virol* 146, 1681-91.
- Basu, R., Roy, S., and Walden, P. (2007): HLA class I-restricted T cell epitopes of the kinetoplastid membrane protein-11 presented by *Leishmania donovani*-infected human macrophages. *J Infect Dis* 195, 1373-80.
- Benjamini, Y., and Hochberg, Y. (1995): Controlling the False Discovery Rate - a Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *J Roy Stat Soc B Met* 57, 289-300.
- Berberich, C., Requena, M., and Alonso, C. (1997): Cloning of genes and expression and antigenicity analysis of the *Leishmania infantum* KMP-11 protein. *Experimental Parasitology* 85, 105-8.
- Berrahal, F., Mary, C., Roze, M., Berenger, A., Escoffier, K., Lamouroux, D., and Dunan, S. (1996): Canine leishmaniasis: identification of asymptomatic carriers by polymerase chain reaction and immunoblotting. *Am J Trop Med Hyg* 55, 273-7.
- Borja-Cabrera, G. P., Correia Pontes, N. N., da Silva, V. O., Paraguai de Souza, E., Santos, W. R., Gomes, E. M., Luz, K. G., Palatnik, M., and Palatnik de Sousa, C. B. (2002): Long lasting protection against canine kala-azar using the FML-QuilA saponin vaccine in an endemic area of Brazil (Sao Goncalo do Amarante, RN). *Vaccine* 20, 3277-84.
- Borja-Cabrera, G. P., Santos, F. N., Bauer, F. S., Parra, L. E., Menz, I., Morgado, A. A., Soares, I. S., Batista, L. M., and Palatnik-de-Sousa, C. B. (2008): Immunogenicity assay of the Leishmune vaccine against canine visceral leishmaniasis in Brazil. *Vaccine* 26, 4991-7.
- Cabral, M., O Grady, J., and Alexander, J. (1992): Demonstration of *Leishmania* specific cell mediated and humoral immunity in asymptomatic dogs. *Parasite Immunol* 14, 531-9.
- Caldas, A., Favali, C., Aquino, D., Vinhas, V., van Weyenbergh, J., Brodskyn, C., Costa, J., Barral-Netto, M., and Barral, A. (2005): Balance of IL-10 and interferon-gamma plasma levels in human visceral leishmaniasis: implications in the pathogenesis. *BMC Infect Dis* 5, 113.
- Campos-Neto, A., Porrozzi, R., Greeson, K., Coler, R. N., Webb, J. R., Seiky, Y. A., Reed, S. G., and Grimaldi, G., Jr. (2001): Protection against cutaneous leishmaniasis induced by recombinant antigens in murine and nonhuman primate models of the human disease. *Infect Immun* 69, 4103-8.
- Cardoso, L., Neto, F., Sousa, J. C., Rodrigues, M., and Cabral, M. (1998): Use of a leishmanin skin test in the detection of canine *Leishmania*-specific cellular immunity. *Vet Parasitol* 79, 213-20.
- Cardoso, L., Schallig, H. D., Cordeiro-da-Silva, A., Cabral, M., Alunda, J. M., and Rodrigues, M. (2007): Anti-*Leishmania* humoral and cellular immune responses in naturally infected symptomatic and asymptomatic dogs. *Vet Immunol Immunopathol* 117, 35-41.
- Carrillo, E., Crusat, M., Nieto, J., Chicharro, C., Thomas Mdel, C., Martinez, E., Valladares, B., Canavate, C., Requena, J. M., Lopez, M. C., Alvar, J., and Moreno, J. (2008): Immunogenicity of HSP-70, KMP-11 and PFR-2 leishmanial antigens in the experimental model of canine visceral leishmaniasis. *Vaccine* 26, 1902-11.
- Carson, C., Antoniou, M., Ruiz-Arguello, M. B., Alcami, A., Christodoulou, V., Messaritakis, I., Blackwell, J. M., and Courtenay, O. (2009): A prime/boost DNA/Modified vaccinia virus Ankara vaccine expressing recombinant *Leishmania* DNA encoding TRYP is safe and immunogenic in outbred dogs, the reservoir of zoonotic visceral leishmaniasis. *Vaccine* 27, 1080-6.
- Carvalho, E. M., Barral, A., Pedral-Sampaio, D., Barral-Netto, M., Badaro, R., Rocha, H., and Johnson, W. D., Jr. (1992): Immunologic markers of clinical evolution in children recently infected with *Leishmania donovani chagasi*. *J Infect Dis* 165, 535-40.

- Carvalho, L. P., Passos, S., Dutra, W. O., Soto, M., Alonso, C., Gollob, K. J., Carvalho, E. M., and Ribeiro de Jesus, A. (2005): Effect of LACK and KMP11 on IFN-gamma production by peripheral blood mononuclear cells from cutaneous and mucosal leishmaniasis patients. *Scand J Immunol* 61, 337-42.
- de Carvalho, L. P., Soto, M., Jeronimo, S., Dondji, B., Bacellar, O., Luz, V., Orge Orge, G., Alonso, C., Jesus, A. R., and Carvalho, E. M. (2003): Characterization of the immune response to *Leishmania infantum* recombinant antigens. *Microbes Infect* 5, 7-12.
- Dondji, B., Perez-Jimenez, E., Goldsmith-Pestana, K., Esteban, M., and McMahon-Pratt, D. (2005): Heterologous prime-boost vaccination with the LACK antigen protects against murine visceral leishmaniasis. *Infect Immun* 73, 5286-9.
- Dos-Santos, W. L., Jesus, E. E., Paranhos-Silva, M., Pereira, A. M., Santos, J. C., Baleeiro, C. O., Nascimento, E. G., Moreira, E. D., Oliveira, G. G., and Pontes-de-Carvalho, L. C. (2008): Associations among immunological, parasitological and clinical parameters in canine visceral leishmaniasis: Emaciation, spleen parasitism, specific antibodies and leishmanin skin test reaction. *Vet Immunol Immunopathol* 123, 251-9.
- Fernandez-Bellon, H., Solano-Gallego, L., Rodriguez, A., Rutten, V. P., Hoek, A., Ramis, A., Alberola, J., and Ferrer, L. (2005): Comparison of three assays for the evaluation of specific cellular immunity to *Leishmania infantum* in dogs. *Vet Immunol Immunopathol* 107, 163-9.
- Ferrer, L., Solano-Gallego, L., Arboix, M., and Alberola, J. (2002): Evaluation of the specific immune responses in dogs infected by *Leishmania infantum*. In C. S. F. a. R. B. K.L. Thoday (Ed.): *Advances in Veterinary Dermatology*, Blackwell Science, Oxford
- Fragaki, K., Suffia, I., Ferrua, B., Rousseau, D., Le Fichoux, Y., and Kubar, J. (2001): Immunization with DNA encoding *Leishmania infantum* protein papLe22 decreases the frequency of parasitemic episodes in infected hamsters. *Vaccine* 19, 1701-9.
- Francino, O., Altet, L., Sanchez-Robert, E., Rodriguez, A., Solano-Gallego, L., Alberola, J., Ferrer, L., Sanchez, A., and Roura, X. (2006): Advantages of real-time PCR assay for diagnosis and monitoring of canine leishmaniosis. *Vet Parasitol* 137, 214-21.
- Fujiwara, R. T., Vale, A. M., Franca da Silva, J. C., da Costa, R. T., Quetz Jda, S., Martins Filho, O. A., Reis, A. B., Correa Oliveira, R., Machado-Coelho, G. L., Bueno, L. L., Bethony, J. M., Frank, G., Nascimento, E., Genaro, O., Mayrink, W., Reed, S., and Campos-Neto, A. (2005): Immunogenicity in dogs of three recombinant antigens (TSA, LeIF and LmSTI1) potential vaccine candidates for canine visceral leishmaniasis. *Vet Res* 36, 827-38.
- Gomes, R., Brodskyn, C., de Oliveira, C., Costa, J., Miranda, J., Caldas, A., Valenzuela, J., Barral-Netto, M., and Barral, A. (2002): Seroconversion against *Lutzomyia longipalpis* saliva concurrent with the development of anti-*Leishmania chagasi* delayed-type hypersensitivity. *J Infect Dis* 186, 1530-4.
- Gomez-Ochoa, P., Castillo, J. A., Gascon, M., Zarate, J. J., Alvarez, F., and Couto, C. G. (2009): Use of domperidone in the treatment of canine visceral leishmaniasis: a clinical trial. *Vet J* 179, 259-63.
- Gomez-Sebastian, S., Perez-Filgueira, D. M., Gomez-Casado, E., Nunez, M. C., Sanchez-Ramos, I., Tabares, E., and Escribano, J. M. (2008): DIVA diagnostic of Aujeszky's disease using an insect-derived virus glycoprotein E. *J Virol Methods*.
- Gradoni, L., Maroli, M., Gramiccia, M., and Mancianti, F. (1987): *Leishmania infantum* infection rates in *Phlebotomus perniciosus* fed on naturally infected dogs under antimonial treatment. *Med Vet Entomol* 1, 339-342.
- Gramiccia, M., Bettini, S., Gradoni, L., Ciarmoli, P., Verrilli, M. L., Loddo, S., and Cicalo, C. (1990): Leishmaniasis in Sardinia. 5. Leishmanin reaction in the human population of a focus of low endemicity of canine leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 84, 371-4.
- Holzmuller, P., Bras-Goncalves, R., and Lemesre, J. L. (2006): Phenotypical characteristics, biochemical pathways, molecular targets and putative role of nitric oxide-mediated programmed cell death in *Leishmania*. *Parasitology* 132 Suppl, S19-32.
- Jensen, A. T., Gasim, S., Ismail, A., Gaafar, A., Kurtzhals, J. A., Kemp, M., El Hassan, A. M., Kharazmi, A., and Theander, T. G. (1998): Humoral and cellular immune responses to synthetic peptides of the *Leishmania donovani* kinetoplastid membrane protein-11. *Scand J Immunol* 48, 103-9.
- Kemp, M., Kurtzhals, J., Bendtzen, K., Poulsen, L., Hansen, M., Koech, D., Kharazmi, A., and Theander, T. (1993): *Leishmania donovani*-reactive Th1- and Th2-like T-cell clones from individuals who have recovered from visceral leishmaniasis. *Infect Immun*, 1069-1073.
- Kennedy, L. J., Altet, L., Angles, J. M., Barnes, A., Carter, S. D., Francino, O., Gerlach, J. A., Happ, G. M., Ollier, W. E., Polvi, A., Thomson, W., and Wagner, J. L. (2000): Nomenclature for factors of the dog major histocompatibility system (DLA), 1998: first report of the ISAG DLA Nomenclature Committee. *Anim Genet* 31, 52-61.

- Khalil, E. A., El Hassan, A. M., Zijlstra, E. E., Mukhtar, M. M., Ghalib, H. W., Musa, B., Ibrahim, M. E., Kamil, A. A., Elsheikh, M., Babiker, A., and Modabber, F. (2000): Autoclaved *Leishmania major* vaccine for prevention of visceral leishmaniasis: a randomised, double-blind, BCG-controlled trial in Sudan. *Lancet* 356, 1565-9.
- Khalil, E. A., Musa, A. M., Modabber, F., and El-Hassan, A. M. (2006): Safety and immunogenicity of a candidate vaccine for visceral leishmaniasis (Alum-precipitated autoclaved *Leishmania major* + BCG) in children: an extended phase II study. *Ann Trop Paediatr* 26, 357-61.
- Kost, T. A., Condreay, J. P., and Jarvis, D. L. (2005): Baculovirus as versatile vectors for protein expression in insect and mammalian cells. *Nat Biotechnol* 23, 567-75.
- Kubar, J., and Fragaki, K. (2005): Recombinant DNA-derived leishmania proteins: from the laboratory to the field. *Lancet Infect Dis* 5, 107-14.
- Kublin, J. G., Lowitt, M. H., Hamilton, R. G., Oliveira, G. A., Nardin, E. H., Nussenzweig, R. S., Schmeckpeper, B. J., Diggs, C. L., Bodison, S. A., and Edelman, R. (2002): Delayed-type hypersensitivity in volunteers immunized with a synthetic multi-antigen peptide vaccine (PfCS-MAP1NYU) against *Plasmodium falciparum* sporozoites. *Vaccine* 20, 1853-61.
- Kurkjian, K. M., Mahmutovic, A. J., Kellar, K. L., Haque, R., Bern, C., and Secor, W. E. (2006): Multiplex analysis of circulating cytokines in the sera of patients with different clinical forms of visceral leishmaniasis. *Cytometry A* 69, 353-8.
- Livak, K. J., and Schmittgen, T. D. (2001): Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25, 402-8.
- Maalej, I. A., Chenik, M., Louzir, H., Ben Salah, A., Bahloul, C., Amri, F., and Dellagi, K. (2003): Comparative evaluation of ELISAs based on ten recombinant or purified *Leishmania* antigens for the serodiagnosis of Mediterranean visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* 68, 312-20.
- Maasho, K., Wolday, D., Edjigu, M., Soderstrom, K., Britton, S., and Akuffo, H. (2001): Induction and abrogation of LACK reactive cells in the evolution of human leishmaniasis. *Clin Exp Immunol* 124, 255-61.
- Maia, C., and Campino, L. (2008): Methods for diagnosis of canine leishmaniasis and immune response to infection. *Vet Parasitol* 158, 274-87.
- Maia, C., Ramada, J., Cristovao, J. M., Goncalves, L., and Campino, L. (2009): Diagnosis of canine leishmaniasis: conventional and molecular techniques using different tissues. *Vet J* 179, 142-4.
- Manna, L., Vitale, F., Reale, S., Caracappa, S., Pavone, L. M., Morte, R. D., Cringoli, G., Staiano, N., and Gravino, A. E. (2004): Comparison of different tissue sampling for PCR-based diagnosis and follow-up of canine visceral leishmaniosis. *Vet Parasitol* 125, 251-62.
- Manson-Bahr, P. E., Heisch, R. B., and Garnham, P. C. (1959): Studies in leishmaniasis in East Africa. IV. The Montenegro test in kala-azar in Kenya. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 53, 380-3.
- Martinez-Moreno, A., Moreno, T., Martinez-Moreno, F. J., Acosta, I., and Hernandez, S. (1995): Humoral and cell-mediated immunity in natural and experimental canine leishmaniasis. *Vet Immunol Immunopathol* 48, 209-20.
- Marty, P., Le Fichoux, Y., Giordana, D., and Brugnetti, A. (1992): Leishmanin reaction in the human population of a highly endemic focus of canine leishmaniasis in Alpes-Maritimes, France. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 86, 249-250.
- Mauricio, I. L., Stothard, J. R., and Miles, M. A. (2000): The strange case of *Leishmania chagasi*. *Parasitol Today* 16, 188-189.
- Medin, J. A., Hunt, L., Gathy, K., Evans, R. K., and Coleman, M. S. (1990): Efficient, low-cost protein factories: expression of human adenosine deaminase in baculovirus-infected insect larvae. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 2760-4.
- Medin, J. A., Gathy, K., and Coleman, M. S. (1995): Expression of foreign proteins in *Trichoplusia ni* larvae. *Methods Mol Biol* 39, 265-75.
- Meller-Melloul, C., Farnarier, C., Dunan, S., Faugere, B., Franck, J., Mary, C., Bongrand, P., Quilici, M., and Kaplanski, S. (1991): Evidence of subjects sensitized to *Leishmania infantum* on the French Mediterranean coast: differences in gamma interferon production between this population and visceral leishmaniasis patients. *Parasite Immunol* 13, 531-6.
- Mohebbali, M., Fallah, E., and Jamshidi, S. (1998): Vaccine trial against canine leishmaniasis in the Islamic Republic of Iran. *East Mediterr Health J* 4, 234-238.
- Molano, I., Alonso, M. G., Miron, C., Redondo, E., Requena, J. M., Soto, M., Nieto, C. G., and Alonso, C. (2003): A *Leishmania infantum* multi-component antigenic protein mixed with live BCG confers protection to dogs experimentally infected with *L. infantum*. *Vet Immunol Immunopathol* 92, 1-13.
- Moral, L., Rubio, E. M., and Moya, M. (2002): A leishmanin skin test survey in the human population of l'Alacanti region (Spain): implications for the epidemiology of *Leishmania infantum* infection in southern Europe. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 96, 129-32.

- Moreira, M. A., Luvizotto, M. C., Garcia, J. F., Corbett, C. E., and Laurenti, M. D.** (2007): Comparison of parasitological, immunological and molecular methods for the diagnosis of leishmaniasis in dogs with different clinical signs. *Vet Parasitol* 145, 245-52.
- Moreno, J., and Alvar, J.** (2002): Canine leishmaniasis: epidemiological risk and the experimental model. *Trends Parasitol* 18, 399-405.
- Na, Z., Huipeng, Y., Lipan, L., Cuiping, C., Umashankar, M. L., Xingmeng, L., Xiaofeng, W., Bing, W., Weizheng, C., and Cenis, J. L.** (2008): Efficient production of canine interferon-alpha in silkworm *Bombyx mori* by use of a BmNPV/Bac-to-Bac expression system. *Appl Microbiol Biotechnol* 78, 221-6.
- O'Connell, K. P., Kovaleva, E., Campbell, J. H., Anderson, P. E., Brown, S. G., Davis, D. C., Valdes, J. J., Welch, R. W., Bentley, W. E., and van Beek, N. A.** (2007): Production of a recombinant antibody fragment in whole insect larvae. *Mol Biotechnol* 36, 44-51.
- Ordeix, L., Solano-Gallego, L., Fondevila, D., Ferrer, L., and Fondati, A.** (2005): Papular dermatitis due to *Leishmania* spp. infection in dogs with parasite-specific cellular immune responses. *Vet Dermatol* 16, 187-91.
- Perez-Filgueira, D. M., Gonzalez-Camacho, F., Gallardo, C., Resino-Talavan, P., Blanco, E., Gomez-Casado, E., Alonso, C., and Escribano, J. M.** (2006): Optimization and validation of recombinant serological tests for African Swine Fever diagnosis based on detection of the p30 protein produced in *Trichoplusia ni* larvae. *J Clin Microbiol* 44, 3114-21.
- Perez-Filgueira, D. M., Resino-Talavan, P., Cubillos, C., Angulo, I., Barderas, M. G., Barcena, J., and Escribano, J. M.** (2007): Development of a low-cost, insect larvae-derived recombinant subunit vaccine against RHDV. *Virology* 364, 422-30.
- Perez-Martin, E., Grau-Roma, L., Argilagué, J. M., Nofrarias, M., Escribano, J. M., Gomez-Sebastian, S., Segales, J., and Rodriguez, F.** (2008): Development of two *Trichoplusia ni* larvae-derived ELISAs for the detection of antibodies against replicase and capsid proteins of porcine circovirus type 2 in domestic pigs. *J Virol Methods* 154, 167-74.
- Pinelli, E., Killick-Kendrick, R., Wagenaar, J., Bernadina, W., del Real, G., and Ruitenbergh, J.** (1994): Cellular and humoral immune responses in dogs experimentally and naturally infected with *Leishmania infantum*. *Infect Immun* 62, 229-35.
- Pinheiro, P. H., Pinheiro, A. N., Ferreira, J. H., Costa, F. A., Katz, S., and Barbieri, C. L.** (2009): A recombinant cysteine proteinase from *Leishmania (Leishmania) chagasi* as an antigen for delayed-type hypersensitivity assays and serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. *Vet Parasitol* 162, 32-9.
- Pollock, J. M., McNair, J., Bassett, H., Cassidy, J. P., Costello, E., Aggerbeck, H., Rosenkrands, I., and Andersen, P.** (2003): Specific delayed-type hypersensitivity responses to ESAT-6 identify tuberculosis-infected cattle. *J Clin Microbiol* 41, 1856-60.
- Poot, J., Rogers, M. E., Bates, P. A., and Vermeulen, A.** (2005): Detailed analysis of an experimental challenge model for *Leishmania infantum* (JPC strain) in dogs. *Vet Parasitol* 130, 41-53.
- Rafati, S., Nakhaee, A., Taheri, T., Taslimi, Y., Darabi, H., Eravani, D., Sanos, S., Kaye, P., Taghikhani, M., Jamshidi, S., and Rad, M. A.** (2005): Protective vaccination against experimental canine visceral leishmaniasis using a combination of DNA and protein immunization with cysteine proteinases type I and II of *L. infantum*. *Vaccine* 23, 3716-25.
- Ramiro, M. J., Zarate, J. J., Hanke, T., Rodriguez, D., Rodriguez, J. R., Esteban, M., Lucientes, J., Castillo, J. A., and Larraga, V.** (2003): Protection in dogs against visceral leishmaniasis caused by *Leishmania infantum* is achieved by immunization with a heterologous prime-boost regime using DNA and vaccinia recombinant vectors expressing LACK. *Vaccine* 21, 2474-84.
- Ramos, I., Alonso, A., Marcen, J. M., Peris, A., Castillo, J. A., Colmenares, M., and Larraga, V.** (2008): Heterologous prime-boost vaccination with a non-replicative vaccinia recombinant vector expressing LACK confers protection against canine visceral leishmaniasis with a predominant Th1-specific immune response. *Vaccine* 26, 333-44.
- Riera, C., Valladares, J.-E., Gállego, M., Aisa, M. J., Castillejo, S., Fisa, R., Ribas, N., Carrió, J., Alberola, J., and 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.
- Riera, C., Fisa, R., Lopez-Chejade, P., Serra, T., Girona, E., Jimenez, M., Muncunill, J., Sedeno, M., Mascaró, M., Udina, M., Gallego, M., Carrió, J., Forteza, A., and Portus, M.** (2008): Asymptomatic infection by *Leishmania infantum* in blood donors from the Balearic Islands (Spain). *Transfusion* 48, 1383-9.

- Rodriguez-Cortes, A., Fernandez-Bellon, H., Ramis, A., Ferrer, L., Alberola, J., and Solano-Gallego, L. (2007a): *Leishmania*-specific isotype levels and their relationship with specific cell-mediated immunity parameters in canine leishmaniasis. *Vet Immunol Immunopathol* 116, 190-8.
- Rodriguez-Cortes, A., Ojeda, A., Lopez-Fuertes, L., Timon, M., Altet, L., Solano-Gallego, L., Sanchez-Robert, E., Francino, O., and Alberola, J. (2007b): A long term experimental study of canine visceral leishmaniasis. *Int J Parasitol* 37, 683-93.
- Rodriguez-Cortes, A., Ojeda, A., Lopez-Fuertes, L., Timon, M., Altet, L., Solano-Gallego, L., Sanchez-Robert, E., Francino, O., and Alberola, J. (2007c): Vaccination with plasmid DNA encoding KMP11, TRYP, LACK and GP63 does not protect dogs against *Leishmania infantum* experimental challenge. *Vaccine* 25, 7962-71.
- Silveira, F. T., Lainson, R., Pereira, E. A., de Souza, A. A., Campos, M. B., Chagas, E. J., Gomes, C. M., Laurenti, M. D., and Corbett, C. E. (2009): A longitudinal study on the transmission dynamics of human *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* infection in Amazonian Brazil, with special reference to its prevalence and incidence. *Parasitol Res* 104, 559-67.
- Solano-Gallego, L., Llull, J., Ramos, G., Riera, C., Arboix, M., Alberola, J., and Ferrer, L. (2000): The Ibizian hound presents a predominantly cellular immune response against natural *Leishmania* infection. *Vet Parasitol* 90, 37-45.
- Solano-Gallego, L., Morell, P., Arboix, M., Alberola, J., and 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, 560-3.
- Solano-Gallego, L., Koutinas, A., Miro, G., Cardoso, L., Pennisi, M. G., Ferrer, L., Bourdeau, P., Oliva, G., and Baneth, G. (2009): Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniasis. *Vet Parasitol*, doi:10.1016/j.vetpar.2009.05.022.
- Strauss-Ayali, D., Baneth, G., Shor, S., Okano, F., and Jaffe, C. (2005): Interleukin-12 augments a Th1-type immune response manifested as lymphocyte proliferation and interferon gamma production in *Leishmania infantum*-infected dogs. *Int J Parasitol* 35, 63-73.
- Suffia, I., Ferrua, B., Stien, X., Mograbi, B., Marty, P., Rousseau, D., Fragaki, K., and Kubar, J. (2000): A novel *Leishmania infantum* recombinant antigen which elicits interleukin 10 production by peripheral blood mononuclear cells of patients with visceral leishmaniasis. *Infect Immun* 68, 630-6.
- Todolí, F., Pérez-Filgueira, M., Galindo, I., Gómez-Sebastián, S., Escribano, J., Rodríguez-Cortés, A., and Alberola, J. (2009): Seroreactivity against raw insect-derived recombinant KMP11, TRYP, and LACK *Leishmania infantum* proteins in infected dogs. *Vet Parasitol* 164, 154-61.
- Van Oers, M. (2006): Vaccines for viral and parasitic diseases produced with baculovirus vectors. *Adv Virus Res* 68, 193-253.
- Vandepapeliere, P., Horsmans, Y., Moris, P., Van Mechelen, M., Janssens, M., Koutsoukos, M., Van Belle, P., Clement, F., Hanon, E., Wettendorff, M., Garcon, N., and Leroux-Roels, G. (2008): Vaccine adjuvant systems containing monophosphoryl lipid A and QS21 induce strong and persistent humoral and T cell responses against hepatitis B surface antigen in healthy adult volunteers. *Vaccine* 26, 1375-86.
- Webb, J. R., Campos-Neto, A., Owendale, P. J., Martin, T. I., Stromberg, E. J., Badaro, R., and Reed, S. G. (1998): Human and murine immune responses to a novel *Leishmania major* recombinant protein encoded by members of a multicopy gene family. *Infect Immun* 66, 3279-89.

Estudio 3



MULTI-ANTIGENIC HETEROLOGOUS PRIME-BOOST IS MORE EFFECTIVE THAN NAKED DNA AND INSECT-DERIVED RECOMBINANT PROTEIN VACCINATION AGAINST EXPERIMENTAL VISCERAL LEISHMANIASIS IN HAMSTERS

1. ABSTRACT

Leishmaniasis, a neglected disease affecting 12 million people in the world, lacks an effective vaccine. The most severe and potentially fatal form of the disease is visceral leishmaniasis (VL), which is caused by *Leishmania donovani* or *Leishmania infantum* and in which the dog is the main reservoir. In this study, we assayed three vaccination strategies using the *L. infantum* antigens KMPII, TRYP, LACK and papLe22 in golden hamsters, the best experimental animal model for human and canine VL. Four groups of 10 golden hamsters each were immunized using the following approaches: 1) crude baculovirus–infected *Trichoplusia ni* larvae extracts expressing the four recombinant proteins (Prot); 2) naked pVAX1™ plasmids carrying the four genes individually (DNA); 3) a prime-boost strategy involving DNA vaccination followed by Prot inoculation (DNA-Prot); or 4) a prime-boost strategy using empty pVAX1™ plasmid and crude wild-type baculovirus-infected *T. ni* larvae extract as a control for the assay. Only DNA-Prot vaccination stimulated significant production of NO by macrophages infected *in vitro* before challenge and showed a decrease in the specific humoral response against the parasite upon *in vivo* challenge with 1×10^7 *L. infantum* promastigotes. In this group, a significant reduction in parasite loads was observed at 20 weeks post-infection, both in spleen (86 % reduction; $P = 0.030$) and in blood (99 % reduction; $P < 0.001$) when compared with controls. DNA-Prot vaccination enhanced the immunogenicity and protection achieved by the DNA vaccine, which could neither stimulate NO production nor reduce parasitaemia, although it significantly reduced the spleen parasite load by 90 % when compared with controls ($P = 0.015$). Prot vaccine was not protective. The results suggest that a prime-boost strategy with DNA and *T. ni*–derived KMPII, TRYP, LACK, and papLe22 recombinant proteins from *L. infantum* could be a safe, stable, low-cost, and effective measure for the control of VL, better than strategies based on DNA or protein alone with the same antigens.

2. INTRODUCTION

The leishmaniasis are a neglected group of parasitic diseases caused by different species of protozoa of the genus *Leishmania* and transmitted by hematophagous sandflies. Morbidity and mortality due to leishmaniasis are on the increase and, among the parasitic diseases, are surpassed only by malaria and lymphatic filariasis (Bern *et al.*, 2008; WHO, 2002). Over 350 million

people are at risk of this infection, with a global prevalence of 12 million and an annual incidence estimated at 500 000 for visceral leishmaniasis (VL) (Desjeux, 2004). The incidence of leishmaniasis has increased in recent years due to the overlap with areas of HIV transmission (Alvar *et al.*, 2008) and, although co-infection has been controlled in some ecoregions with highly active antiretroviral therapy (Cruz *et al.*, 2006), it continues to grow in others where the prevalence of HIV infection is increasing dramatically (WHO, 2002). VL is the most serious form of the disease, with a 90 % mortality rate if left untreated (Bora, 1999). It causes more than 59 000 deaths per year (Desjeux, 2004). In the Indomalaya and Afrotropic ecozones, *Leishmania donovani* causes an anthroponotic form of VL, whereas in the Palearctic and Neotropical ecozones *Leishmania infantum* (syn. *L. chagasi*) is the causative agent of the zoonotic form of VL, in which the dog is the main peridomestic reservoir.

Resistance to human VL and canine leishmaniosis (CanL) has been associated with the induction of a T_h1-like immune response with production of IFN- γ by an antigen-specific CD4+ T-cell population. This response promotes the activation of macrophages to produce NO, the main mechanism used by these target cells to kill intracellular amastigotes (Holzmuller *et al.*, 2006). However, the role of the T_h2-like immune response in VL outcome has not been established (Alexander and Bryson, 2005). The existence of a significant number of individuals who remain asymptomatic in *L. infantum*-endemic areas and the acquisition of immunity after successful treatment suggest that vaccination is a feasible strategy to prevent this disease.

Although vaccines have been proposed as major tools for control of leishmaniasis (Dye, 1996) and have been established as a high priority by the World Health Organization (WHO), no vaccine against human VL has been obtained to date. Recently, the vaccines Leishmune® and Leish-Tec® (Borja-Cabrera *et al.*, 2002; Fernandes *et al.*, 2008) were granted marketing authorization against CanL by the Brazilian Ministry of Agriculture and Fisheries (Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento), although on May 3, 2009, the Brazilian Ministry of Health (Ministério da Saúde) recommended they should not be used in the governmental control program until phase III studies have finished.

Several experimental vaccination strategies against VL have been tested, ranging from killed *Leishmania* parasites to DNA vaccination. Vaccines composed of killed parasites have generally been immunogenic (Kamil *et al.*, 2003; Khalil *et al.*, 2006) yet ineffective against VL (Khalil *et al.*, 2000), although one study obtained relevant protection rates in dogs (Mohebbi *et al.*, 2004). Recombinant proteins have been applied in the search for more immunogenic and protective vaccines against VL, and these have generally achieved partial protection in murine (Wilson *et al.*, 1995; Stager *et al.*, 2000; Ghosh *et al.*, 2001b; Aguilar-Be *et al.*, 2005; Tewary *et al.*, 2006; Coler *et*

al., 2007; Goto *et al.*, 2007; Ferreira *et al.*, 2008) and in canine models (Molano *et al.*, 2003; Gradoni *et al.*, 2005; Moreno *et al.*, 2007; Fernandes *et al.*, 2008). However, most protein vaccine prototypes needed to be formulated with an adjuvant in order to confer protection. Furthermore, some antigens, such as the fusion protein Leish-111f, proved to be protective in rodents but not in dogs (Gradoni *et al.*, 2005; Coler *et al.*, 2007), even though immunogenicity was demonstrated in both species (Fujiwara *et al.*, 2005; Moreno *et al.*, 2007). This vaccine is currently being assayed in human clinical trials against cutaneous leishmaniasis (Coler *et al.*, 2007).

Vaccines consisting of naked plasmids carrying genes of *Leishmania* have proved to be capable of inducing a T_H1-like immune response against the parasite, although this is frequently insufficient to afford protection in models other than murine models (Ulmer *et al.*, 2006). Several DNA vaccine candidates have been assayed against VL, and have achieved different degrees of protection in mice. They include A2 (Ghosh *et al.*, 2001a), *ORFF* (Sukumaran *et al.*, 2003; Tewary *et al.*, 2005), and *KMP11* (Bhaumik *et al.*, 2009) genes. Occasionally, vaccination with the same antigen in mice produced conflicting results, as with *LACK* (Melby *et al.*, 2001b; Gomes *et al.*, 2007) and *NH* genes (Aguilar-Be *et al.*, 2005; Zanin *et al.*, 2007). In hamsters, DNA vaccination with *papLe22* was partially protective against *L. infantum* (Fragaki *et al.*, 2001), whereas the *KMP11* gene achieved complete protection against *L. donovani* (Basu *et al.*, 2005). In contrast, the only DNA vaccination assayed against VL in dogs—with the genes *KMP11*, *TRYP*, *LACK*, and *GP63*—proved to be immunogenic (Rodriguez-Cortes, 2002; Rodriguez-Cortes *et al.*, 2007b) but not protective in experimentally infected dogs (Rodriguez-Cortes *et al.*, 2007b). Unfortunately, the efficacy of a DNA vaccine encoding 10 different antigens that stimulated a specific T_H1-like immune response in dogs was not evaluated (Saldarriaga *et al.*, 2006).

Third-generation vaccines have been improved by heterologous prime-boost strategies, which potentially allow for higher degrees of protection (Ramshaw and Ramsay, 2000). This strategy selectively amplifies memory T cells that are specific for the antigen elicited by DNA vaccines, thus obtaining greater levels of immunity (Woodland, 2004). Prime-boost assays have been carried out against *Leishmania*, mainly with DNA-recombinant viruses using the *LACK* antigen, and have achieved protection both in mice (Dondji *et al.*, 2005) and dogs (Ramiro *et al.*, 2003; Ramos *et al.*, 2008). Recently, a similar prime-boost strategy based on the *TRYP* gene has been shown to be more immunogenic in dogs than one based on *LACK* (Carson *et al.*, 2009); however, once again, protection was not evaluated. Finally, many other antigens have been evaluated in rodents only, and they have generally provided high levels of protection (Tewary *et al.*, 2005; Ferreira *et al.*, 2008; Khoshgoo *et al.*, 2008).

In this study, we compared the immunogenicity and protection induced by these three vaccination strategies—recombinant protein, naked plasmid DNA, and heterologous prime-boost with naked plasmid DNA and protein—against *L. infantum* infection in the golden hamster model using a low-cost protein production platform based on the *Trichoplusia ni* caterpillar (Medin *et al.*, 1995). The hamster model is the one that best mimics the outcomes of VL in humans and dogs, with parasite visceralization, splenomegaly, cachexia, and a progressive increase in specific antibody titers associated with active disease (Requena *et al.*, 2000; Melby *et al.*, 2001a; Garg and Dube, 2006). Moreover, susceptibility of the hamster to VL is attributed to an impaired macrophage effector function, as iNOS transcription is relatively unresponsive to IFN- γ (Perez *et al.*, 2006), a finding also reported in humans (Zhang *et al.*, 1996). We used four evolutionarily conserved antigens extensively proposed as vaccine candidates in the literature and previously proven to be B-cell and T-cell immunogens in canine VL (Todoli *et al.*, 2009; Todoli *et al.*, unpublished results). These were KMPII (kinetoplastid membrane protein-11, formerly known as KMP-11), TRYP (tryparedoxin peroxidase, previously known as TSA), LACK (*L. infantum* homologue of receptors for activated C kinase), and papLe22 (potentially aggravating protein of *L. infantum*).

3. MATERIALS AND METHODS

3.1. Gene cloning and DNA vaccine construction

Gene cloning was performed as previously described (Rodriguez-Cortes *et al.*, 2007b). Briefly, total RNA was extracted from a culture of 5×10^6 *L. infantum* promastigotes (kindly provided by Dr. Portús, Universitat de Barcelona, Spain) using Trizol® reagent (Gibco®, Gaithersburg, Maryland, USA). One microgram of total RNA was used for the synthesis of cDNA with the cDNA Cycle® Kit (Invitrogen™, Carlsbad, California, USA) according to the manufacturer's instructions. Primers used to amplify the coding sequences of the *KMPII*, *TRYP*, and *LACK* genes have been described elsewhere (Rodriguez-Cortes *et al.*, 2007b) and the coding region of *papLe22* (GenBank accession number AF123892) was amplified using forward 5'-GGCCACTTCTCTCTTCTCCA-3' and reverse 5'-CTTGCCACATACACCAATCG-3' primers. Each specific cDNA was amplified and cloned separately into a TOPO® TA Cloning® vector (Invitrogen™). The coding sequences of each gene were then digested from the TOPO® TA vector and subcloned separately into the pVAX1™ vector (Invitrogen™) to construct the DNA vaccine. Large-scale plasmid preparations were performed using an EndoFree® Plasmid Giga Kit (Qiagen®, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions. The quantity and quality of plasmids were assessed by measuring optical density at 260 nm and 280 nm.

3.2. Recombinant proteins and protein vaccine production

Recombinant baculoviruses and protein extracts were obtained as described elsewhere (Todoli *et al.*, 2009). Briefly, the coding sequences of each gene were digested from the TOPO® TA vector and subcloned separately into the pFastBac™1 vector under the control of the Polyhedrin promoter (Bac-To-Bac® system, Invitrogen™). The recombinant pFastBac™1 vectors were transformed into competent *Escherichia coli* (MAX Efficiency® DH10Bac™ Competent Cells, Invitrogen™) to obtain the recombinant baculovirus bacmids. Bacmids were used to transfect *Spodoptera frugiperda* Sf21 insect cells (Invitrogen™) to obtain the recombinant baculoviruses. A pFastBac™1 vector with noninsert (Ni vector) was used to produce the wild-type baculovirus from which the control crude protein extract was obtained for ELISA and vaccination (Ni antigen).

T. ni (Cabbage looper) caterpillars were intracoelemically injected near the proleg with 10 µL of the specific recombinant baculovirus ($\sim 4 \times 10^7$ pfu·mL⁻¹). Inoculated larvae were kept in growth chambers at 28°C and finally collected at 96 h postinfection and frozen immediately at -20°C until processed. Larvae were homogenized in protein extraction buffer (phosphate buffered saline [PBS], pH 7.2, 0.01 % Triton® X-100, 2.5 mM dithiothreitol and a protease inhibitor cocktail [Complete™, Roche, Basel, Switzerland]), and the resulting suspension was clarified at 10 000 × g for 10 min. The supernatant was filtered and centrifuged, and the amount of total soluble protein was quantified by a commercial Bradford assay (Bio-Rad® Laboratories, Inc., Hercules, California, USA). Bulk extracts were aliquoted and freeze-dried overnight in a Telstar® CryoDos Freeze-Dryer (Telstar, Terrassa, Spain), and fractions were stored at 4°C until used. The *L. infantum* recombinant protein concentration in the crude extract was quantified by 15 % SDS-PAGE and Coomassie blue staining (Bio-Rad® Laboratories Inc.). The band intensity corresponding to each recombinant protein was calculated using a Tina 2.0 image analyzer software package (Raytest, Straubenhardt, Germany) and the concentration was inferred using a curve of known protein concentrations (bovine serum albumin [BSA]). The concentrations of specific recombinant proteins in extracts were 1.0 % for rKMPII, 0.5 %, rTRYP, 5.0 % for rLACK, and 2.0 % for rpapLe22.

3.3. Animals and immunizations

Forty-four ten-week-old male golden hamsters (*Mesocricetus auratus*, outbreed strain Han:AURA) purchased from a commercial source (Centre d'Elevage René Janvier, Le Genest-Saint-Isle, France) were used for this study. The animals were housed in pairs in micro-filter cages under animal biosafety level 2 facilities at Servei d'Estabulari of Universitat Autònoma de Barcelona (Barcelona, Spain). Animals were kept and handled under veterinary care, and all procedures were performed under the auspices of the Universitat Autònoma de Barcelona Animal Care Committee

following the recommendations of the Federation of European Laboratory Animal Science Associations.

Hamsters were randomly assigned to four experimental groups: protein vaccine (Prot), naked DNA vaccine (DNA), prime-boost vaccine (DNA-Prot), and control vaccine (C). All groups were composed of 10 individuals. One hamster from the prime-boost group died during the acclimatizing period and was not substituted. Four hamsters were not vaccinated or infected (NN), and were used as negative controls.

The Prot group received 2 intraperitoneal doses of a mixture of crude larvae extracts containing 5 µg of each recombinant protein resuspended in sterile saline solution in a final volume of 200 µL. The DNA group received 3 intramuscular doses of 100 µg of each plasmid construction resuspended in a final volume of 100 µL of sterile saline solution (50 µL into each *tibialis cranialis* muscle). The DNA-Prot group received 3 doses of DNA vaccine, followed by 2 doses of protein vaccine using the same protocols as for the DNA and Prot groups. Finally, the C group received 3 doses of pVAX1™ without insert (400 µg) in a final volume of 100 µL of sterile saline solution, followed by 2 doses of Ni antigen, using the equivalent amount of total protein as the former group. The interval between all immunizations was 2 weeks. The safety of our vaccine prototypes was assessed after each vaccination (1 h and 4 h post-vaccination) by close daily observation and clinical examination of the animals for 3 consecutive days to detect potential adverse events caused by the vaccination.

3.4. Parasites and challenge

Two weeks after the last immunization was completed, four hamsters from each vaccine group and from the control group (C) were euthanized to evaluate the immunogenicity of each vaccination regime. The remaining six hamsters from each experimental group were infected with *L. infantum*.

Parasites were kindly provided by Dr. Portús, Universitat de Barcelona, Spain. Briefly, *L. infantum* (strain MCAN/ES/92/BCN-83/MON-1) obtained from a naturally infected dog that had not received any treatment was passaged through hamsters in order to retain its full virulence. Parasites were then grown in Schneider's insect medium (Sigma-Aldrich®, St. Louis, Missouri, USA), supplemented with 20 % (v/v) Gibco® fetal calf serum (FCS) (Invitrogen™) and 25 µg mL⁻¹ gentamicin (Sigma-Aldrich®) at 26°C. Stationary promastigotes were washed and resuspended in PBS. Infection was by intraperitoneal injection of 1×10^7 promastigotes in 1 mL of PBS.

The infected hamsters were clinically evaluated once a week for the presence of signs compatible

with leishmaniasis (fever, weight loss, cutaneous lesions). Hamsters were euthanized 20 weeks after experimental infection.

3.5. Necropsy and tissue sampling

Hamsters were anesthetized by a 100- μ L intramuscular injection containing 42.5 mg·mL⁻¹ ketamine, 9.5 mg·mL⁻¹ xylazine, and 1.5 mg·mL⁻¹ acepromazine, and a 5 mL sample of intracardiac blood was collected. The hamsters were then euthanized using CO₂ and the necropsy was performed.

Peritoneal macrophages were collected only from hamsters euthanized after vaccination by intraperitoneal injection of cold Gibco® Dulbecco's Modified Eagle Medium (Invitrogen™) supplemented with 5 % (v/v) Gibco® FCS (Invitrogen™) and 1 % (w/v) EDTA (Sigma-Aldrich®).

Spleen size was measured at necropsy. The length and width (cm) were recorded using a calibrated rule, and size was roughly estimated as length × width (cm²). Normal spleen size range was estimated on the basis of the results from hamsters in the NN group and calculated as the mean area ± 3 SD. Splens larger than 2.7 cm² were considered to be abnormally enlarged.

A sample of spleen tissue was collected and snap-frozen in liquid nitrogen. Samples of liver, spleen, and kidney were collected and fixed in buffered 10 % formaldehyde solution. Samples obtained from the NN group were collected to be used as negative controls for the different techniques.

3.6. Crude total antigen and recombinant antigen-based ELISA

The specific humoral immune response against crude total *L. infantum* antigen (CTLA) and recombinant *L. infantum* antigens (rKMPII, rTRYP, rLACK, and rpapLe22) was measured by ELISA.

The CTLA-based ELISA was performed as described elsewhere (Riera *et al.*, 1999) with some modifications. Microtiter plates were coated with 2 μ g of crude *L. infantum* antigen per well. Hamster serum samples were diluted 1:400 in PBS-0.1 % Tween® 20 (PBST)-1 % skimmed dry milk (1 % PBSTM) and incubated at 37°C for 1 h. Anti-hamster IgG antibody (Sigma-Aldrich®) diluted 1:1000 in 1 % PBSTM was used as secondary antibody. Finally, the plate was revealed using *o*-phenylenediamine as a chromogen and stopped by the addition of 3 M H₂SO₄. The absorbance was read at 492 nm and the results were expressed as optical densities (OD).

The recombinant antigen–based ELISA was performed as previously described (Todoli *et al.*, 2009) with some modifications. Each serum sample was tested against protein larva extracts containing rKMPII, rTRYP, rLACK, rpapLe22, and the corresponding control Ni antigen (Ni_{KMPII} , Ni_{TRYP} , Ni_{LACK} , and $Ni_{papLe22}$) prepared at the same concentration in the same plate. Crude extracts were used at 100 μ g per well for rKMPII ELISA and at 200 μ g per well for rTRYP, rLACK, and rpapLe22 ELISAs. Working dilutions were 1:10 for sera and 1:1000 for anti-hamster IgG. Corrected absorbance was expressed as the OD obtained against the recombinant protein once the absorbance achieved by the serum on the control Ni antigen was subtracted.

A known positive serum used as calibrator was included in all plates, and plates with interassay variations $\geq 10\%$ were ruled out. The cut-off values for both types of ELISAs were established on the basis of optical densities obtained from the NN group and calculated as the mean + 3 SD. The cut-off values were as follows: 0.122 for CTLA ELISA, 0.266 for rKMPII ELISA, 0.050 for rTRYP ELISA, 0.284 for rLACK ELISA, and 0.376 for rpapLe22 ELISA.

3.7. Quantification of NO production and parasite killing by macrophages infected *in vitro*

Peritoneal macrophages were harvested at 2×10^5 per well in a 16-well glass Lab-Tek™ Chamber Slide™ System (Nunc™, Rochester, New York, USA). Infection was performed with stationary-phase promastigotes of *L. infantum* (MCAN/ES/92/BCN-83/MON-1) at a parasite:macrophage ratio of 7:1 for 4 h at 37 °C in 5% CO₂. Non-internalized parasites were removed by gentle washing with pre-warmed PBS, and infected macrophages were then cultured in Gibco® Dulbecco's Modified Eagle Medium without Phenol Red (Invitrogen™) supplemented with 5% (v/v) Gibco® FCS (Invitrogen™) for 72 h. Supernatants were then collected and stored at –80 °C, and slides were Giemsa stained.

The culture supernatants were analyzed for their NO concentrations using the Griess reaction by measuring combined oxidation products of NO (NO_2^- and NO_3^-) after reduction with nitrate reductase in a Colorimetric Assay (Cayman Chemical™, Ann Arbor, Michigan, USA).

The number of amastigotes per macrophage was determined by microscopic examination of Giemsa-stained slides. Data were expressed as the number of amastigotes per 100 macrophages.

3.8. Real-time PCR amplification of *L. infantum* DNA from spleen and blood samples

L. infantum DNA was specifically detected and quantified by the Servei Veterinari de Genètica Molecular, Universitat Autònoma de Barcelona, as described elsewhere (Francino *et al.*, 2006).

Briefly, DNA was extracted from frozen spleen and whole blood samples. *L. infantum* DNA load in each sample was determined by Taqman® real-time PCR (qPCR) (Applied Biosystems, Foster City, California, USA) targeting conserved DNA regions of the kinetoplast minicircle DNA from *L. infantum*. *L. infantum* DNA load in each sample was determined by relative quantification using the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method (Livak and Schmittgen, 2001). Results were expressed as x-fold more DNA copies than the calibrator sample. The calibrator for blood was a spiked sample with a known number of parasites which allowed the results to be expressed as parasites per mL.

3.9. Histopathology and immunohistochemistry

Samples of liver, spleen and kidney fixed in buffered 10 % formaldehyde solution were embedded in paraffin, and sections were stained by hematoxylin and eosin for histopathological study with high-power light microscopy at $\times 400$.

The degree of tissue parasitization was evaluated by immunohistochemistry (IHC) in spleen samples. Paraffin-embedded sections from spleen were dewaxed and rehydrated. The antigen was retrieved by steaming in 10 mM citric acid solution pH 6.0 for 30 min in a 95°C water bath. Endogenous peroxidase activity was blocked with 3 % H₂O₂ in water followed by 2.5 % H₂O₂ in methanol. Non-specific ionic interactions were blocked with a solution of powdered skimmed milk diluted in distilled water (60 g L⁻¹) and incubated for 1 h at 37°C. Immunolabeling was performed with mouse anti-*Leishmania* polyclonal antibody diluted 1:1000 in PBS containing 1 % BSA and incubated at 4°C overnight. After washing, the sections were incubated with biotinylated secondary antibody and then with streptavidin-peroxidase complex from the LSAB™ kit (Dako, Carpinteria, California, USA), both at 37°C for 30 min. The color reaction was developed at room temperature using Liquid DAB and Substrate Chromogen (Dako). The sections were counterstained with hematoxylin, dehydrated, and mounted in resin. Parasitization was evaluated using a microscope coupled to a computer running Axion Vision 5.0 software (Carl Zeiss Vision GmbH, München-Hallbergmoos, Germany). The parasite density was expressed as amastigotes per mm⁻² of tissue.

3.10. Statistical analysis

Comparisons were performed using non-parametric tests. Statistical significance was set at $P < 0.05$. All analyses were carried out using SPSS v.14.0 (SPSS Inc, Chicago, Illinois, USA). The parasite reduction achieved by each vaccination was calculated as follows: [(Median DNA load in control group – Median DNA load in vaccinated group)/Median DNA load in control group $\times 100$].

4. RESULTS

4.1. Safety

DNA vaccination was well tolerated by all hamsters, and secondary effects were not recorded. However, the second administration of protein extracts induced transitory pruritus, which resolved within a few hours. This effect was observed both for wild-type (Ni) and recombinant (Prot) extracts.

4.2. Immunogenicity

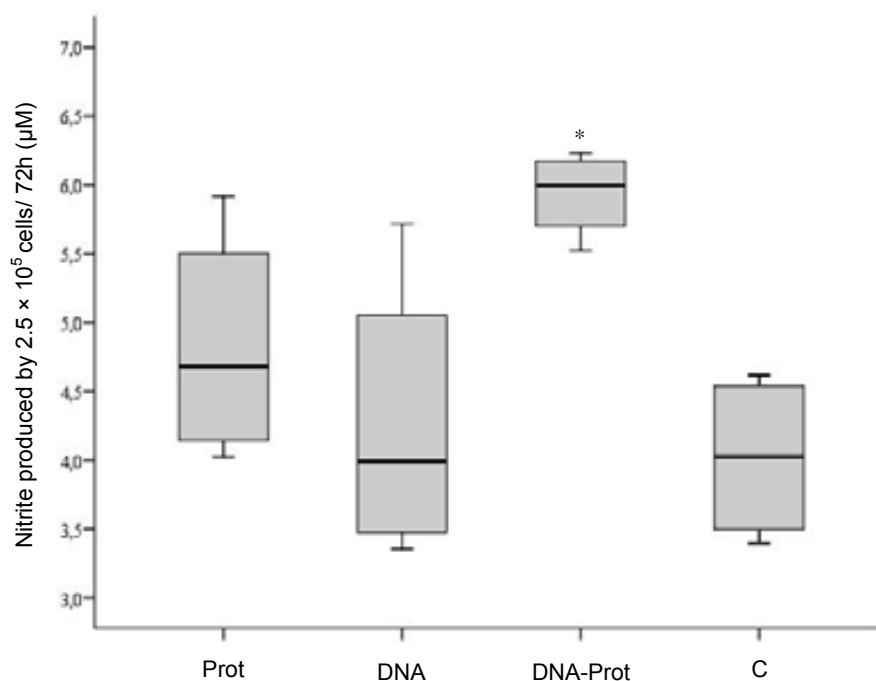
The immunogenicity elicited by the different vaccination strategies—DNA, Prot and DNA-Prot—was evaluated in terms of the humoral and cell-mediated immunity (CMI) induced before challenge using four animals from each immunization group. The *L. infantum*-specific humoral response was measured by determining antibody induction against CTLA and against recombinant *L. infantum* proteins, whereas specific CMI was inferred by quantification of NO production and parasite killing by macrophages infected *in vitro*.

Specific seroreactivity to CTLA was not detected before challenge in any vaccinated hamster. Furthermore, no specific responses were detected against the recombinant antigens KMP11, TRYP, or papLe22 directly after DNA immunization (DNA group), with only one animal (hamster D24) showing specific anti-rLACK antibodies (0.420 EU). Seroreactivity against recombinant antigens could not be evaluated for the rest of the animal groups immunized with *T. ni* protein extracts (Prot, DNA-Prot and C groups) due to the non-specific responses induced against the larva antigens.

NO produced by *L. infantum* macrophages *in vitro* from vaccinated and control hamsters at 72 h is shown in Figure 1. No significant differences were detected between concentrations of NO produced by peritoneal macrophages isolated from the DNA or the Prot groups when compared to the C group (Mann-Whitney *U*; $P = 0.686$ and $P = 0.343$, respectively). In clear contrast, macrophages obtained from the DNA-Prot group produced significantly higher concentrations of NO than those produced by macrophages from the C group (Mann-Whitney *U*; $P = 0.029$).

No significant differences were found between the number of amastigotes observed in macrophages infected *in vitro* from the DNA, Prot, or DNA-Prot groups in relation to the C group (Mann-Whitney *U*; $P = 0.415$, $P = 0.683$, and $P = 0.767$, respectively).

Figure 1. Production of NO by *Leishmania infantum*-infected macrophages obtained from hamsters vaccinated with KMPII, TRYP, LACK and papLe22 in the form of crude extracts of *T. ni* larvae producing recombinant proteins (Prot), naked plasmid (DNA), or both vaccines combined in a prime-boost strategy (DNA-Prot), and in control hamsters (C).



Significant differences were found for NO production between the DNA-Prot group and C group (* $P < 0.05$).

4.3. Protective efficacy

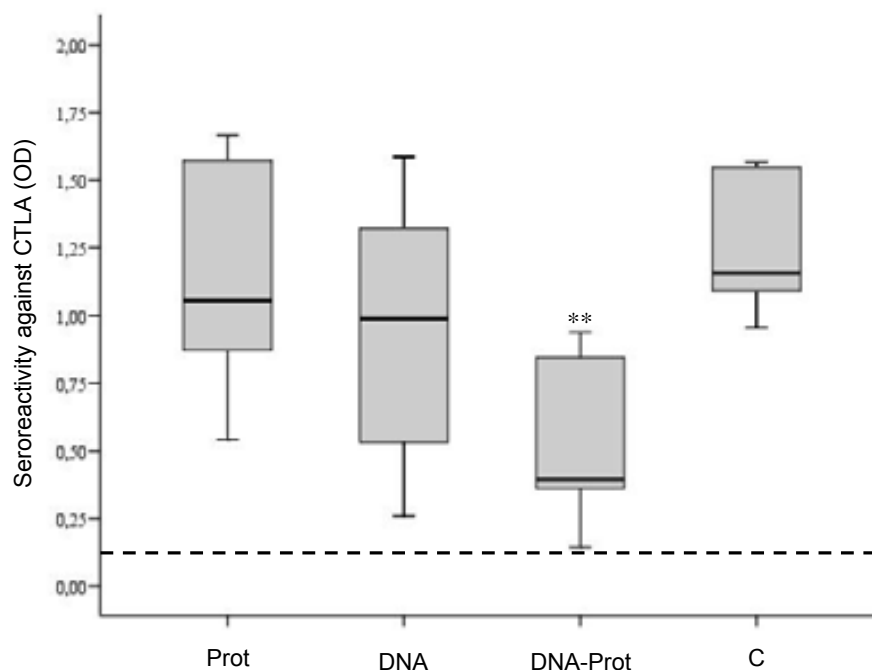
4.3.1. Specific immune response induced upon *L. infantum* challenge

Seroreactivity against CTLA in vaccinated and control hamsters at the end of the study (140 days after infection) is shown in Figure 2. All infected hamsters from vaccinated and control groups produced antibodies against CTLA. Average concentrations of specific anti-*L. infantum* antibodies in the DNA or Prot groups were not significantly different to those detected in the C group (Mann-Whitney U ; $P = 0.484$ and $P = 0.699$, respectively). Conversely, the DNA-Prot group produced significantly lower anti-CTLA antibody concentrations than the C group after infection by *L. infantum* ($P = 0.004$).

Seroreactivity against recombinant antigens could not be evaluated in groups vaccinated with protein (groups Prot and DNA-Prot), due to the high antibody responses induced against larva proteins. In the DNA group, one animal (hamster D26) showed seroreactivity against rKMPII (0.716 EU), rLACK (0.893 EU), and rpapLe22 (0.493 EU), and another (hamster D30) developed specific

antibodies against rLACK (0.425 EU). Seroreactivity against rTRYP was not detected in any DNA-vaccinated hamster.

Figure 2. Seroreactivity against crude total *Leishmania* antigen (CTLA) 140 days after *Leishmania infantum* challenge in hamsters vaccinated with KMPII, TRYP, LACK and papLe22: in the form of crude extracts of *T. ni* larvae producing recombinant proteins (Prot), naked plasmid (DNA), or both vaccines combined in a prime-boost strategy (DNA-Prot), and in control hamsters (C) challenged with *L. infantum*.



The dotted line represents the cut-off value. Significant differences were found in anti-CTLA antibody levels between the DNA-Prot group and the C group (** $P < 0.01$).

4.3.2. Histopathology findings

The spleen was abnormally enlarged in 4 of 6 hamsters from the C group. An even higher proportion of hamsters with splenomegaly was detected in the Prot group (5/6), whereas a lower proportion of hamsters with splenomegaly was observed in the DNA group (3/6) and overall in the DNA-Prot (1/5). However, the differences in the size of the spleen observed between the vaccine groups were not statistically significant (Mann-Whitney U ; $P \geq 0.05$ for all comparisons).

Histopathologic evidence was also found in the spleens of *L. infantum*-infected animals. Thus, the splenic white pulp from the C group (6/6) showed hyperplasia of the lymphoid follicles, reflecting an increase in the number of B cells. Although not significantly different from the C group, only 3 of 6

hamsters from the Prot group showed hyperplasia of the lymphoid follicles (Fisher's exact test; $P \geq 0.05$). The frequency of this finding was significantly lower in hamsters from the DNA (1/6) and DNA-Prot (1/5) groups (Fisher's exact test; $P = 0.015$ for both); curiously, the two affected hamsters showed the highest seroreactivity against CTLA within each group. Granulomas in the splenic white pulp were observed only in the DNA (3/6) and Prot (2/6) groups, and were not found in the control group or in the DNA-Prot group. Well-defined granulomas formed by epithelioid cells, macrophages, and, occasionally, giant cells were usually observed in the red pulp of the spleen of hamsters from all groups (Prot 6/6, DNA 5/6, DNA-Prot 3/5, and C 4/6). The frequency of granulomas was not statistically different in any group when compared to the C group ($P \geq 0.05$ for all comparisons).

All groups showed nodular infiltrate—characterized by macrophages, lymphocytes and plasma cells—in the liver parenchyma (Prot 6/6, DNA 5/6, DNA-Prot 4/5, and C 6/6). Granulomas in the liver parenchyma were not observed in hamsters from the C group (0/6), but they had developed to a greater or lesser extent in hamsters from the other three vaccinated groups (Prot 4/6, DNA 3/6, DNA-Prot 2/5). The frequency of nodular infiltrate or granulomas was not significantly different in any group in relation to the C group ($P \geq 0.05$ for all comparisons). Mononuclear inflammatory infiltrate in the periportal area was observed in all groups (Prot 5/6, DNA 4/6, DNA-Prot 1/5, and C 6/6). Only in the DNA-Prot group was the frequency of this infiltrate lower than in the C group (Fisher's exact test; $P = 0.015$). Finally, hyperplasia of the Kupffer cells in the sinusoids was detected only in the C (6/6) and Prot (1/6) groups. Its frequency was significantly lower in all groups when compared to C group (Fisher's exact test; $P = 0.002$ for both the DNA and DNA-Prot groups and $P = 0.015$ for the Prot group).

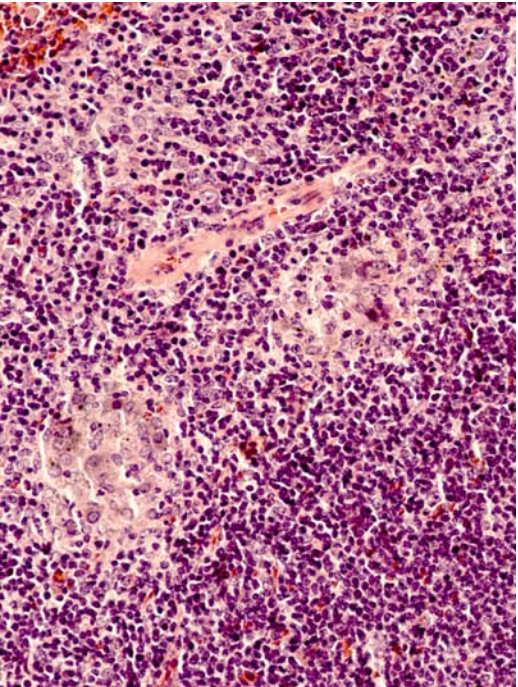
Only two hamsters—one in the DNA (hamster D27) and another in the DNA-Prot (hamster B14) groups, in which parasites were not found in blood or in spleen—showed no histopathological abnormalities in the spleen or liver.

No histological abnormalities were found in the kidney of any study hamsters.

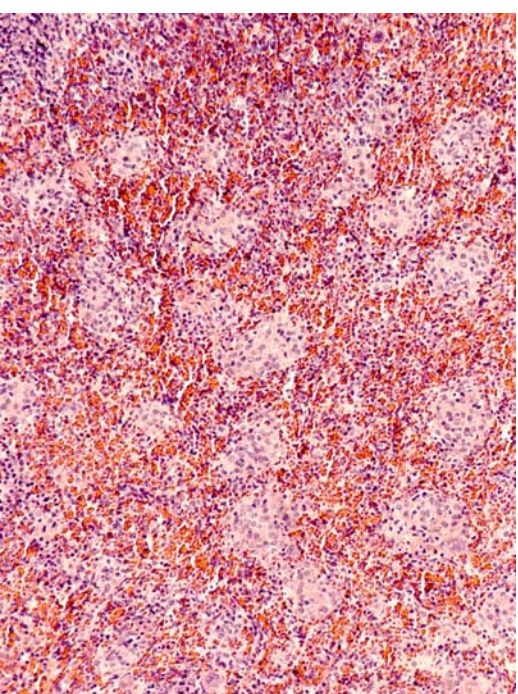
Some of the histopathology findings described are shown in Figure 3.

Figure 3. Histopathology findings observed in the infected hamsters: a) Spleen (x200), hyperplastic lymphoid follicles, b) Spleen (x100), granulomas in the red pulp, c) Liver (x100). Nodular infiltrate in the parenchyma and mononuclear inflammatory infiltrate in the periportal area, d) Liver (x400), hyperplasia of the Kupffer cells in the sinusoids

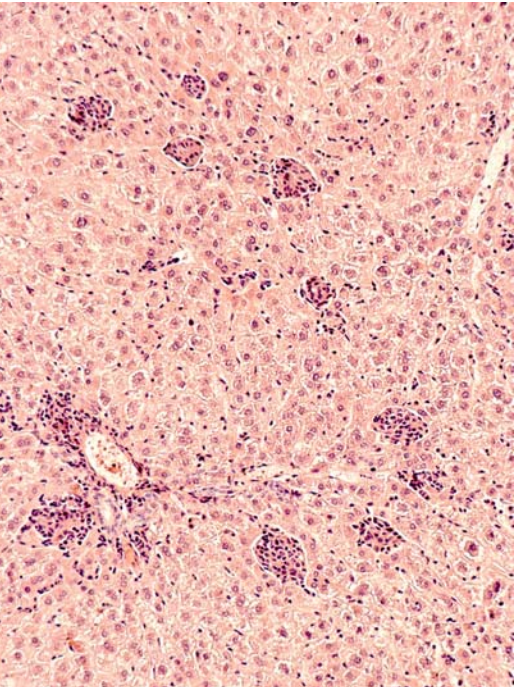
a)



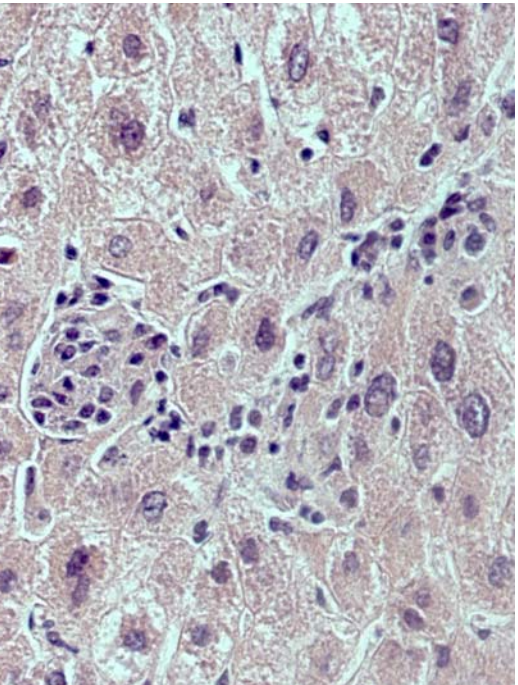
b)



c)



d)



4.3.3. Protection against *L. infantum* infection

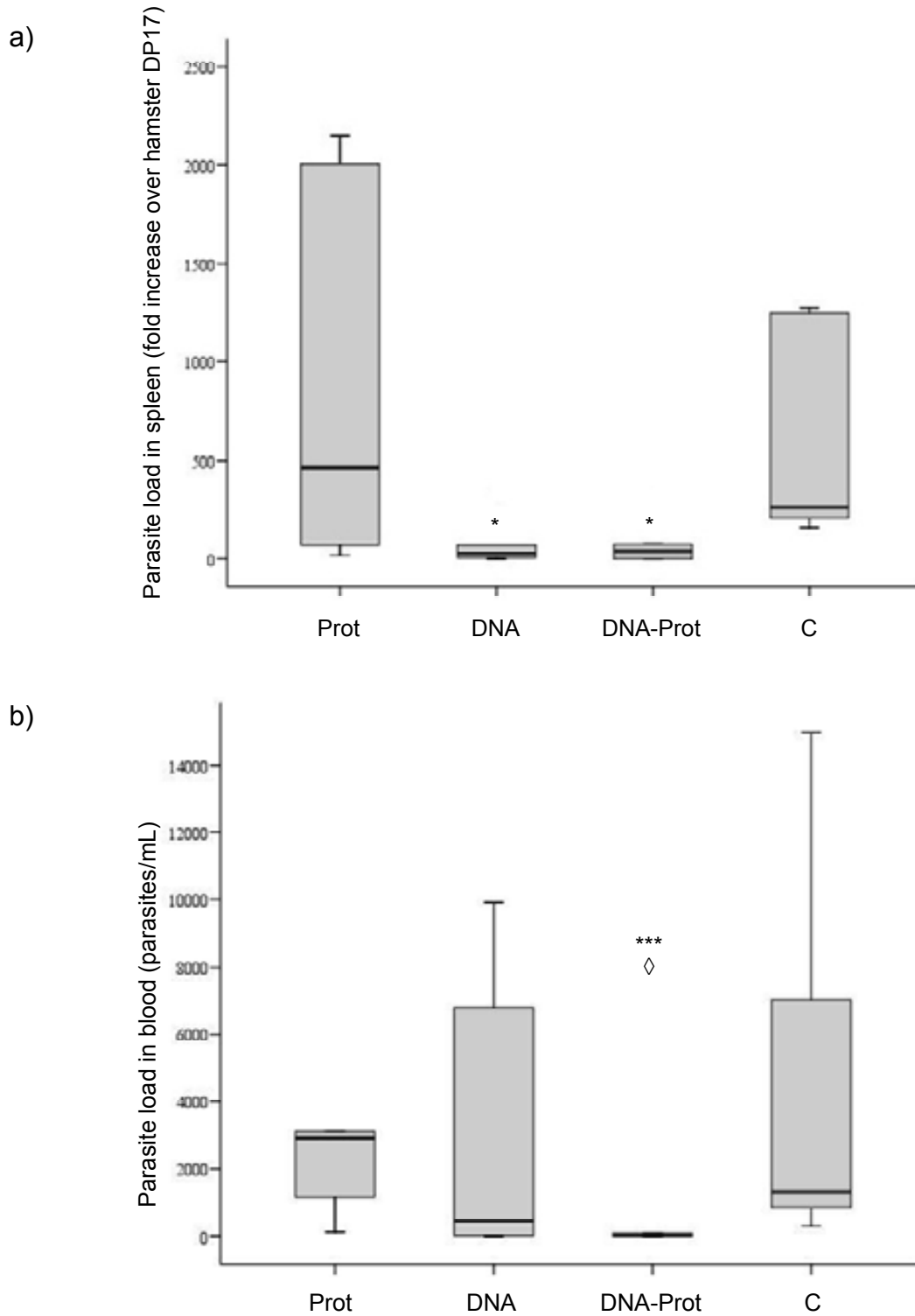
The spleen parasite burden was assessed by both IHC and qPCR. Although parasite density by IHC and parasite load by qPCR in the spleen samples showed significant correlations (Spearman $\rho = 0.682$; $P = 0.001$), the sensitivity of IHC was lower than that obtained for qPCR, since some samples proved to be negative for IHC but positive for qPCR. Thus, we calculated parasitological protection using the qPCR parasite load. The average number of parasites per mm² detected in spleen by IHC (median [interquartile range]) was 3195 [1072–5842] for the Prot group, 321 [0–2332] for the DNA group, 853 [0–2280] for the DNA-Prot group, and 1004 [0–3284] for the C group. Parasite load determined by qPCR in the spleen is shown in Figure 4a. Median spleen parasite load from the Prot group was 78 % higher than in the C group, but this increase was not statistically significant (Mann-Whitney U ; $P = 0.818$). In contrast, the DNA group and the DNA-Prot group showed a 90 % and 86 % reduction in qPCR median parasite load, respectively, in relation to the C group, and both differences were statistically significant (Mann-Whitney U ; $P = 0.015$ and $P = 0.030$, respectively).

Parasite load determined by qPCR in blood is shown in Figure 4b. The median blood parasite load of the Prot group was 123 % higher than that of the C group, but the difference was not statistically significant (Mann-Whitney U ; $P = 0.792$). The DNA group showed a non-significant 66 % reduction in relation to the C group (Mann-Whitney U ; $P = 0.179$). Parasitaemia in the DNA-Prot group was 97 % lower than in the C group (Mann-Whitney U ; $P = 0.051$). An extreme outlier was identified in this group (Grubbs' test; $P = 0.026$) and, when it was excluded from the analysis, the difference in blood parasite load between the DNA-Prot group and the C group was highly significant (99 % reduction, Mann-Whitney U ; $P < 0.001$).

Two hamsters from the DNA and the DNA-Prot vaccine groups (hamsters D27 and B14, respectively) showed complete absence of parasites in blood and spleen.

The correlation between serology and parasite load was evaluated. The concentration of antibodies against CLTA significantly correlated with the parasite load in blood and spleen (qPCR) (Spearman, $P = 0.701$, $P < 0.001$; $P = 0.679$, $P < 0.001$, respectively).

Figure 4. Parasite load in spleen (a) and blood (b) from hamsters vaccinated with KMPII, TRYP, LACK, and papLe22 in the form of crude extracts of *T. ni* larvae producing recombinant proteins (Prot), naked plasmid (DNA), or both vaccines combined in a prime-boost strategy (DNA-Prot), and in control hamsters (C) 140 days after challenge with *L. infantum*.



Significant differences were found between the parasite loads of the DNA group or the DNA-Prot group and the C group (* $P < 0.05$, *** $P < 0.001$).

5. DISCUSSION

An effective vaccine against *L. infantum* infection should be able to provide a T_h1-like immune response with induction of both CD4+ and CD8+ T cells, production of IFN- γ , and activation of macrophages to produce NO, the main leishmanicidal molecule synthesized by the macrophage (Holzmüller *et al.*, 2006). Several attempts have been made with different vaccines, although the results have been frequently unsuccessful (Handman, 2001). In this study, we used a golden hamster model to compare the immunogenicity and protective efficacy of three vaccine strategies—recombinant protein, naked DNA, and DNA-protein heterologous prime-boost, based on the antigens KMP11, TRYP, LACK and papLe22—against *L. infantum* infection.

Although vaccination with recombinant proteins has been described as moderately effective against *L. infantum* infection in rodents (Wilson *et al.*, 1995; Aguilar-Be *et al.*, 2005; Coler *et al.*, 2007; Goto *et al.*, 2007), the immunization of hamsters with rKMP11, rTRYP, rLACK, and rpapLe22 expressed in *T. ni* larvae did not achieve parasitological protection after challenge with *L. infantum*, and we could not detect specific CMI in vaccinated animals. Moreover, although not significant, a slightly higher parasite load in blood and spleen was observed in the C group, suggesting that this strategy could in fact be promoting a non-protective T_h2 response, thus allowing parasite replication. Lack of extra-adjuvant in our vaccine formulation might explain the failure to induce a T_h1 response (Coler and Reed, 2005). In contrast with our results, vaccination with insect-derived recombinant proteins without purification yielded successful results against viral diseases (Ferrer *et al.*, 2007; Perez-Filgueira *et al.*, 2007; Perez-Martin, 2009), most probably reflecting the strong CMI required for protection against intracellular parasites or the different nature of the vaccine antigens used in our assay. One potential explanation might be found in the pathogenic nature of KMP11 (de Carvalho *et al.*, 2003), LACK (Maasho *et al.*, 2000; Carvalho *et al.*, 2005), or papLe22 (Suffia *et al.*, 2000), which elicit human production of IL-10, a pleiotropic anti-inflammatory cytokine capable of inhibiting synthesis of pro-inflammatory T_h1-like cytokines. Vaccine designs to redirect the immune response against these parasite antigens towards a T_h1 phenotype are currently being developed in our laboratory.

DNA vaccines have been shown to stimulate antibody production, as well as immunity mediated by CD4+ and CD8+ T cells (Huygen, 2005). In our study, the DNA vaccine induced antibodies against rLACK in one hamster, suggesting that *in vivo* expression of the antigens occurred. The significant reduction in parasite load in the spleen suggests that some degree of cell-mediated protective response was developed, although it did not take the form of significant NO production. DNA vaccine prevented hyperplasia of the lymphoid follicles, suggesting that it could have a deleterious

effect on aberrant B-cell proliferation and antibody production associated with the development of disease (Requena *et al.*, 2000).

Interestingly, vaccination with DNA followed by a protein boost allowed hamsters to control parasite loads better, an effect that correlated with a drastic reduction in the parasite-specific humoral response after challenge. This phenomenon, also described in hamsters vaccinated with *papLe22* DNA (Fragaki *et al.*, 2001) and in other protective vaccines against VL in hamsters (Gomes *et al.*, 2008) and dogs (Molano *et al.*, 2003; Fernandes *et al.*, 2008), might be due to a redirection of the T_{h2} response towards a T_{h1} response and/or to the lower antigenic stimulation caused by the presence of lower parasite loads. In this sense, our results showed a positive correlation between parasite load in spleen and blood samples and the *L. infantum*-specific humoral response. Boosting with a protein vaccine also led to significant production of NO in macrophages, which is indicative of effective T-cell-mediated anti-*L. infantum* activity. Similarly, other vaccines assayed in hamsters revealed an association between vaccine protection and levels of NO production by macrophages (Basu *et al.*, 2005) or iNOS expression (Gomes *et al.*, 2008). In our prime-boost experiments, successful NO production correlated with higher parasitological protection, whereas protection conferred by our DNA vaccine (with no boost) did not show such a correlation. In this regard, both DNA and DNA-Prot vaccines significantly reduced the parasite load in the spleen (90 % and 86 %, respectively), while only the prime-boost strategy was capable of significantly reducing parasitaemia (99 %). The lower parasitaemia observed in the DNA-Prot group could reflect a lower replication rate of the parasite in other organs (Rodriguez-Cortes *et al.*, 2007a) due to more effective parasite killing. The intrinsic immune mechanisms governing induction of NO upon DNA-protein vaccination are currently being characterized in our laboratory. Despite the relative unresponsiveness of iNOS transcription to IFN- γ in the hamster model (Perez *et al.*, 2006), other cytokines (eg, IL-1, TNF, IFN- α or IFN- β) might induce NO and protection (Bronte and Zanovello, 2005).

Several authors have shown the prime-boost strategy to improve the efficacy of immunization with recombinant proteins against *Leishmania* sp. (Gurunathan *et al.*, 1997; Iborra *et al.*, 2003; Rafati *et al.*, 2005; Poot *et al.* 2006; Saravia *et al.*, 2005; Tewary *et al.*, 2005; and Ferreira *et al.*, 2008). Prime-boost strategies have also been more effective than the DNA strategy alone in conferring protective immunity in vaccinated dogs (Ramiro *et al.*, 2003), while efficacy has been similar in mice (Rafati *et al.*, 2001; Iborra *et al.*, 2003; Tewary *et al.*, 2005). It is possible that the capacity for boosting the immune response could depend on the nature of the antigen and/or the animal species used. Our results show the prime-boost strategy with KMP11, TRYP, LACK, and *papLe22*, to be useful in eliciting strong cellular immune responses against *L. infantum*, as seen in assays

against other diseases, such as AIDS, which demands strong CMI (Dale *et al.*, 2006), malaria (Hill, 2006), tuberculosis (Skeiky and Sadoff, 2006), and cancer (Prud'homme, 2005).

Hamsters from the three vaccination strategies developed, to a greater or lesser extent, granulomas in the liver. These are the main histopathological structures involved in hepatic resistance to visceralizing species of *Leishmania*, in which the macrophages surround and kill the parasite (Kaye *et al.*, 2004). However, it is important to note that a granuloma that appears structurally intact does not necessarily guarantee anti-leishmanial action if the macrophage fails to become activated (Murray, 2001). Thus, it is possible that the granulomas observed in the Prot, DNA and DNA-Prot groups did not have the same effective anti-parasitic effects.

Both the DNA and crude larvae extracts composing the prime-boost vaccine described here had the advantage of being inexpensive and remaining stable for long periods without refrigeration (Perez-Filgueira *et al.*, 2007), attributes that are particularly interesting for use in developing countries. Insect-derived proteins are of high quality since they are processed with most of the post-translational modifications needed to produce the conformational epitopes of the proteins (Kost *et al.*, 2005). Moreover, it has been shown that a protein produced in the baculovirus insect system induced immunogenicity against its native counterpart, whereas *E. coli*-derived protein did not (Matsuoka *et al.*, 1996). Both vaccines were safe and well-tolerated. However, the second dose of protein, either containing the recombinant proteins or only Ni antigen for control purposes, produced transitory pruritus in all the animals that received it. This reaction was probably a type I hypersensitivity reaction against larva and/or baculovirus antigens when encountered for the second time. Conversely, vaccination with crude larvae extracts did not induce hypersensitivity in other species, such as mice (Ferrer *et al.*, 2007), rabbit (Perez-Filgueira *et al.*, 2007), and pig (Perez-Martin, 2009), suggesting that the reaction might be due to the particular sensitivity of the hamster.

In conclusion, we demonstrate that the prime-boost strategy with naked DNA and insect-derived recombinant KMPII, TRYP, LACK and papLe22 induces significant parasitological protection against *L. infantum* challenge in the golden hamster model. This protection is better than that obtained with the naked DNA or protein vaccine strategies used alone. The prime-boost vaccine composed of naked DNA and insect-derived recombinant proteins can be a safe, stable, inexpensive, and effective measure for the control of visceral leishmaniasis.

REFERENCES

- Aguilar-Be, I., da Silva Zardo, R., Paraguai de Souza, E., Borja-Cabrera, G. P., Rosado-Vallado, M., Mut-Martin, M., Garcia-Miss Mdel, R., Palatnik de Sousa, C. B., and Dumonteil, E. (2005): Cross-protective efficacy of a prophylactic *Leishmania donovani* DNA vaccine against visceral and cutaneous murine leishmaniasis. *Infect Immun* 73, 812-9.
- Alexander, J., and Bryson, K. (2005): T helper (h)1/Th2 and *Leishmania*: paradox rather than paradigm. *Immunol Lett* 99, 17-23.
- Alvar, J., Aparicio, P., Aseffa, A., Den Boer, M., Canavate, C., Dedet, J. P., Gradoni, L., Ter Horst, R., Lopez-Velez, R., and Moreno, J. (2008): The relationship between leishmaniasis and AIDS: the second 10 years. *Clin Microbiol Rev* 21, 334-59, table of contents.
- Basu, R., Bhaumik, S., Basu, J. M., Naskar, K., De, T., and Roy, S. (2005): Kinetoplastid membrane protein-11 DNA vaccination induces complete protection against both pentavalent antimonial-sensitive and -resistant strains of *Leishmania donovani* that correlates with inducible nitric oxide synthase activity and IL-4 generation: evidence for mixed Th1- and Th2-like responses in visceral leishmaniasis. *J Immunol* 174, 7160-71.
- Bern, C., Maguire, J. H., and Alvar, J. (2008): Complexities of assessing the disease burden attributable to leishmaniasis. *PLoS Negl Trop Dis* 2, e313.
- Bhaumik, S., Basu, R., Sen, S., Naskar, K., and Roy, S. (2009): KMP-11 DNA immunization significantly protects against *L. donovani* infection but requires exogenous IL-12 as an adjuvant for comparable protection against *L. major*. *Vaccine* 27, 1306-16.
- Bora, D. (1999): Epidemiology of visceral leishmaniasis in India. *Natl Med J India* 12, 62-8.
- Borja-Cabrera, G. P., Correia Pontes, N. N., da Silva, V. O., Paraguai de Souza, E., Santos, W. R., Gomes, E. M., Luz, K. G., Palatnik, M., and Palatnik de Sousa, C. B. (2002): Long lasting protection against canine kala-azar using the FML-QuilA saponin vaccine in an endemic area of Brazil (Sao Gonçalo do Amarante, RN). *Vaccine* 20, 3277-84.
- Bronte, V., and Zanovello, P. (2005): Regulation of immune responses by L-arginine metabolism. *Nat Rev Immunol* 5, 641-54.
- Carson, C., Antoniou, M., Ruiz-Arguello, M. B., Alcami, A., Christodoulou, V., Messaritakis, I., Blackwell, J. M., and Courtenay, O. (2009): A prime/boost DNA/Modified vaccinia virus Ankara vaccine expressing recombinant *Leishmania* DNA encoding TRYP is safe and immunogenic in outbred dogs, the reservoir of zoonotic visceral leishmaniasis. *Vaccine* 27, 1080-6.
- Carvalho, L. P., Passos, S., Dutra, W. O., Soto, M., Alonso, C., Gollob, K. J., Carvalho, E. M., and Ribeiro de Jesus, A. (2005): Effect of LACK and KMP11 on IFN-gamma production by peripheral blood mononuclear cells from cutaneous and mucosal leishmaniasis patients. *Scand J Immunol* 61, 337-42.
- Coler, R. N., and Reed, S. G. (2005): Second-generation vaccines against leishmaniasis. *Trends Parasitol* 21, 244-9.
- Coler, R. N., Goto, Y., Bogatzki, L., Raman, V., and Reed, S. G. (2007): Leish-111f, a recombinant polyprotein vaccine that protects against visceral Leishmaniasis by elicitation of CD4+ T cells. *Infect Immun* 75, 4648-54.
- Cruz, I., Nieto, J., Moreno, J., Canavate, C., Desjeux, P., and Alvar, J. (2006): *Leishmania*/HIV co-infections in the second decade. *Indian J Med Res* 123, 357-88.
- Dale, C. J., Thomson, S., De Rose, R., Ranasinghe, C., Medveczky, C. J., Pamungkas, J., Boyle, D. B., Ramshaw, I. A., and Kent, S. J. (2006): Prime-boost strategies in DNA vaccines. *Methods Mol Med* 127, 171-97.
- de Carvalho, L. P., Soto, M., Jeronimo, S., Dondji, B., Bacellar, O., Luz, V., Orge Orge, G., Alonso, C., Jesus, A. R., and Carvalho, E. M. (2003): Characterization of the immune response to *Leishmania infantum* recombinant antigens. *Microbes Infect* 5, 7-12.
- Desjeux, P. (2004): Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 27, 305-18.
- Dondji, B., Perez-Jimenez, E., Goldsmith-Pestana, K., Esteban, M., and McMahon-Pratt, D. (2005): Heterologous prime-boost vaccination with the LACK antigen protects against murine visceral leishmaniasis. *Infect Immun* 73, 5286-9.
- Dye, C. (1996): The logic of visceral leishmaniasis control. *Am J Trop Med Hyg* 55, 125-30.
- Fernandes, A. P., Costa, M. M., Coelho, E. A., Michalick, M. S., de Freitas, E., Melo, M. N., Luiz Tafuri, W., Resende Dde, M., Hermont, V., Abrantes Cde, F., and Gazzinelli, R. T. (2008): Protective immunity against challenge with *Leishmania (Leishmania) chagasi* in beagle dogs vaccinated with recombinant A2 protein. *Vaccine* 26, 5888-95.

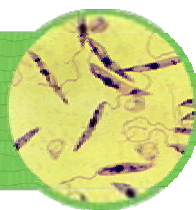
- Ferreira, J. H., Gentil, L. G., Dias, S. S., Fedeli, C. E., Katz, S., and Barbieri, C. L. (2008): Immunization with the cysteine proteinase Ldcys1 gene from *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi* and the recombinant Ldcys1 protein elicits protective immune responses in a murine model of visceral leishmaniasis. *Vaccine* 26, 677-85.
- Ferrer, F., Zoth, S. C., Calamante, G., and Taboga, O. (2007): Induction of virus-neutralizing antibodies by immunization with *Rachiplusia nu* per os infected with a recombinant baculovirus expressing the E2 glycoprotein of bovine viral diarrhea virus. *J Virol Methods* 146, 424-7.
- Fragaki, K., Suffia, I., Ferrua, B., Rousseau, D., Le Fichoux, Y., and Kubar, J. (2001): Immunisation with DNA encoding *Leishmania infantum* protein papLe22 decreases the frequency of parasitemic episodes in infected hamsters. *Vaccine* 19, 1701-9.
- Francino, O., Altet, L., Sanchez-Robert, E., Rodriguez, A., Solano-Gallego, L., Alberola, J., Ferrer, L., Sanchez, A., and Roura, X. (2006): Advantages of real-time PCR assay for diagnosis and monitoring of canine leishmaniosis. *Vet Parasitol* 137, 214-21.
- Fujiwara, R. T., Vale, A. M., Franca da Silva, J. C., da Costa, R. T., Quetz Jda, S., Martins Filho, O. A., Reis, A. B., Correa Oliveira, R., Machado-Coelho, G. L., Bueno, L. L., Bethony, J. M., Frank, G., Nascimento, E., Genaro, O., Mayrink, W., Reed, S., and Campos-Neto, A. (2005): Immunogenicity in dogs of three recombinant antigens (TSA, LelF and LmSTI1) potential vaccine candidates for canine visceral leishmaniasis. *Vet Res* 36, 827-38.
- Garg, R., and Dube, A. (2006): Animal models for vaccine studies for visceral leishmaniasis. *Indian J Med Res* 123, 439-54.
- Ghosh, A., Labrecque, S., and Matlashewski, G. (2001a): Protection against *Leishmania donovani* infection by DNA vaccination: increased DNA vaccination efficiency through inhibiting the cellular p53 response. *Vaccine* 19, 3169-78.
- Ghosh, A., Zhang, W. W., and Matlashewski, G. (2001b): Immunization with A2 protein results in a mixed Th1/Th2 and a humoral response which protects mice against *Leishmania donovani* infections. *Vaccine* 20, 59-66.
- Gomes, D. C., Pinto, E. F., de Melo, L. D., Lima, W. P., Larraga, V., Lopes, U. G., and Rossi-Bergmann, B. (2007): Intranasal delivery of naked DNA encoding the LACK antigen leads to protective immunity against visceral leishmaniasis in mice. *Vaccine* 25, 2168-72.
- Gomes, R., Teixeira, C., Teixeira, M. J., Oliveira, F., Menezes, M. J., Silva, C., de Oliveira, C. I., Miranda, J. C., Elnaiem, D. E., Kamhawi, S., Valenzuela, J. G., and Brodskyn, C. I. (2008): Immunity to a salivary protein of a sand fly vector protects against the fatal outcome of visceral leishmaniasis in a hamster model. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 7845-50.
- Goto, Y., Bogatzki, L. Y., Bertholet, S., Coler, R. N., and Reed, S. G. (2007): Protective immunization against visceral leishmaniasis using *Leishmania* sterol 24-c-methyltransferase formulated in adjuvant. *Vaccine* 25, 7450-8.
- Gradoni, L., Foglia Manzillo, V., Pagano, A., Piantedosi, D., De Luna, R., Gramiccia, M., Scalone, A., Di Muccio, T., and Oliva, G. (2005): Failure of a multi-subunit recombinant leishmanial vaccine (MML) to protect dogs from *Leishmania infantum* infection and to prevent disease progression in infected animals. *Vaccine* 23, 5245-51.
- Gurunathan, S., Sacks, D. L., Brown, D. R., Reiner, S. L., Charest, H., Glaichenhaus, N., and Seder, R. A. (1997): Vaccination with DNA encoding the immunodominant LACK parasite antigen confers protective immunity to mice infected with *Leishmania major*. *J Exp Med* 186, 1137-47.
- Handman, E. (2001): Leishmaniasis: current status of vaccine development. *Clin Microbiol Rev* 14, 229-43.
- Hill, A. V. (2006): Pre-erythrocytic malaria vaccines: towards greater efficacy. *Nat Rev Immunol* 6, 21-32.
- Holzmuller, P., Bras-Goncalves, R., and Lemesre, J. L. (2006): Phenotypical characteristics, biochemical pathways, molecular targets and putative role of nitric oxide-mediated programmed cell death in *Leishmania*. *Parasitology* 132 Suppl, S19-32.
- Huygen, K. (2005): Plasmid DNA vaccination. *Microbes Infect* 7, 932-8.
- Iborra, S., Soto, M., Carrion, J., Nieto, A., Fernandez, E., Alonso, C., and Requena, J. M. (2003): The *Leishmania infantum* acidic ribosomal protein P0 administered as a DNA vaccine confers protective immunity to *Leishmania major* infection in BALB/c mice. *Infect Immun* 71, 6562-72.
- Kamil, A. A., Khalil, E. A., Musa, A. M., Modabber, F., Mukhtar, M. M., Ibrahim, M. E., Zijlstra, E. E., Sacks, D., Smith, P. G., Zicker, F., and El-Hassan, A. M. (2003): Alum-precipitated autoclaved *Leishmania major* plus bacille Calmette-Guerrin, a candidate vaccine for visceral leishmaniasis: safety, skin-delayed type hypersensitivity response and dose finding in healthy volunteers. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 97, 365-8.
- Kaye, P. M., Svensson, M., Ato, M., Maroof, A., Polley, R., Stager, S., Zubairi, S., and Engwerda, C. R. (2004): The immunopathology of experimental visceral leishmaniasis. *Immunol Rev* 201, 239-53.

- Khalil, E. A., El Hassan, A. M., Zijlstra, E. E., Mukhtar, M. M., Ghalib, H. W., Musa, B., Ibrahim, M. E., Kamil, A. A., Elsheikh, M., Babiker, A., and Modabber, F. (2000): Autoclaved *Leishmania major* vaccine for prevention of visceral leishmaniasis: a randomised, double-blind, BCG-controlled trial in Sudan. *Lancet* 356, 1565-9.
- Khalil, E. A., Musa, A. M., Modabber, F., and El-Hassan, A. M. (2006): Safety and immunogenicity of a candidate vaccine for visceral leishmaniasis (Alum-precipitated autoclaved *Leishmania major* + BCG) in children: an extended phase II study. *Ann Trop Paediatr* 26, 357-61.
- Khoshgoo, N., Zahedifard, F., Azizi, H., Taslimi, Y., Alonso, M. J., and Rafati, S. (2008): Cysteine proteinase type III is protective against *Leishmania infantum* infection in BALB/c mice and highly antigenic in visceral leishmaniasis individuals. *Vaccine* 26, 5822-9.
- Kost, T. A., Condreay, J. P., and Jarvis, D. L. (2005): Baculovirus as versatile vectors for protein expression in insect and mammalian cells. *Nat Biotechnol* 23, 567-75.
- Livak, K. J., and Schmittgen, T. D. (2001): Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25, 402-8.
- Maasho, K., Satti, I., Nylen, S., Guzman, G., Koning, F., and Akuffo, H. (2000): A *Leishmania* homologue of receptors for activated C-kinase (LACK) induces both interferon-gamma and interleukin-10 in natural killer cells of healthy blood donors. *J Infect Dis* 182, 570-8.
- Matsuoka, H., Kobayashi, J., Barker, G. C., Miura, K., Chinzei, Y., Miyajima, S., Ishii, A., and Sinden, R. E. (1996): Induction of anti-malarial transmission blocking immunity with a recombinant ookinete surface antigen of *Plasmodium berghei* produced in silkworm larvae using the baculovirus expression vector system. *Vaccine* 14, 120-6.
- Medin, J. A., Gathy, K., and Coleman, M. S. (1995): Expression of foreign proteins in *Trichoplusia ni* larvae. *Methods Mol Biol* 39, 265-75.
- Melby, P. C., Chandrasekar, B., Zhao, W., and Coe, J. E. (2001a): The hamster as a model of human visceral leishmaniasis: progressive disease and impaired generation of nitric oxide in the face of a prominent Th1-like cytokine response. *J Immunol* 166, 1912-20.
- Melby, P. C., Yang, J., Zhao, W., Perez, L. E., and Cheng, J. (2001b): *Leishmania donovani* p36(LACK) DNA vaccine is highly immunogenic but not protective against experimental visceral leishmaniasis. *Infect Immun* 69, 4719-25.
- Mohebali, M., Khamesipour, A., Mobedi, I., Zarei, Z., and Hashemi-Fesharki, R. (2004): Double-blind randomized efficacy field trial of alum precipitated autoclaved *Leishmania major* vaccine mixed with BCG against canine visceral leishmaniasis in Meshkin-Shahr district, I.R. Iran. *Vaccine* 22, 4097-100.
- Molano, I., Alonso, M. G., Miron, C., Redondo, E., Requena, J. M., Soto, M., Nieto, C. G., and Alonso, C. (2003): A *Leishmania infantum* multi-component antigenic protein mixed with live BCG confers protection to dogs experimentally infected with *L. infantum*. *Vet Immunol Immunopathol* 92, 1-13.
- Moreno, J., Nieto, J., Masina, S., Canavate, C., Cruz, I., Chicharro, C., Carrillo, E., Napp, S., Reymond, C., Kaye, P. M., Smith, D. F., Fasel, N., and Alvar, J. (2007): Immunization with H1, HASPB1 and MML *Leishmania* proteins in a vaccine trial against experimental canine leishmaniasis. *Vaccine* 25, 5290-300.
- Murray, H. W. (2001): Tissue granuloma structure-function in experimental visceral leishmaniasis. *Int J Exp Pathol* 82, 249-67.
- Perez, L. E., Chandrasekar, B., Saldarriaga, O. A., Zhao, W., Arteaga, L. T., Travi, B. L., and Melby, P. C. (2006): Reduced nitric oxide synthase 2 (NOS2) promoter activity in the Syrian hamster renders the animal functionally deficient in NOS2 activity and unable to control an intracellular pathogen. *J Immunol* 176, 5519-28.
- Perez-Filgueira, D. M., Resino-Talavan, P., Cubillos, C., Angulo, I., Barderas, M. G., Barcena, J., and Escribano, J. M. (2007): Development of a low-cost, insect larvae-derived recombinant subunit vaccine against RHDV. *Virology* 364, 422-30.
- Perez-Martin, E. (2009) Development of new methodologies for the study of pathogenesis and control of porcine circovirus type 2 (PCV2) infection. Doctoral Thesis. Centre de Recerca en Sanitat Animal (CRESA), Universitat Autònoma de Barcelona.
- Poot, J., Spreuwenberg, K., Sanderson, S. J., Schijns, V. E., Mottram, J. C., Coombs, G. H., and Vermeulen, A. N. (2006): Vaccination with a preparation based on recombinant cysteine peptidases and canine IL-12 does not protect dogs from infection with *Leishmania infantum*. *Vaccine* 24, 2460-8.
- Prud'homme, G. J. (2005): DNA vaccination against tumors. *J Gene Med* 7, 3-17.
- Rafati, S., Salmanian, A. H., Taheri, T., Vafa, M., and Fasel, N. (2001): A protective cocktail vaccine against murine cutaneous leishmaniasis with DNA encoding cysteine proteinases of *Leishmania major*. *Vaccine* 19, 3369-75.
- Rafati, S., Nakhaee, A., Taheri, T., Taslimi, Y., Darabi, H., Eravani, D., Sanos, S., Kaye, P., Taghikhani, M., Jamshidi, S., and Rad, M. A. (2005): Protective vaccination against experimental canine

- visceral leishmaniasis using a combination of DNA and protein immunization with cysteine proteinases type I and II of *L. infantum*. *Vaccine* 23, 3716-25.
- Ramiro, M. J., Zarate, J. J., Hanke, T., Rodriguez, D., Rodriguez, J. R., Esteban, M., Lucientes, J., Castillo, J. A., and Larraga, V.** (2003): Protection in dogs against visceral leishmaniasis caused by *Leishmania infantum* is achieved by immunization with a heterologous prime-boost regime using DNA and vaccinia recombinant vectors expressing LACK. *Vaccine* 21, 2474-84.
- Ramos, I., Alonso, A., Marcen, J. M., Peris, A., Castillo, J. A., Colmenares, M., and Larraga, V.** (2008): Heterologous prime-boost vaccination with a non-replicative vaccinia recombinant vector expressing LACK confers protection against canine visceral leishmaniasis with a predominant Th1-specific immune response. *Vaccine* 26, 333-44.
- Ramshaw, I. A., and Ramsay, A. J.** (2000): The prime-boost strategy: exciting prospects for improved vaccination. *Immunol Today* 21, 163-5.
- Requena, J. M., Soto, M., Doria, M. D., and Alonso, C.** (2000): Immune and clinical parameters associated with *Leishmania infantum* infection in the golden hamster model. *Vet Immunol Immunopathol* 76, 269-81.
- Riera, C., Valladares, J. E., Gallego, M., Aisa, M. J., Castillejo, S., Fisa, R., Ribas, N., Carrio, J., Alberola, J., and 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.
- Rodriguez-Cortes, A., Solano-Gallego, L., Fernandez-Bellón, H., Arboix, M., Sanchez, A., Alberola, J.** (2002): DNA vaccination against *L. infantum* in dogs. 27th World Small Animal Veterinary Association (WSAVA) Congress.
- Rodriguez-Cortes, A., Ojeda, A., Lopez-Fuertes, L., Timon, M., Altet, L., Solano-Gallego, L., Sanchez-Robert, E., Francino, O., and Alberola, J.** (2007a): A long term experimental study of canine visceral leishmaniasis. *Int J Parasitol* 37, 683-93.
- Rodriguez-Cortes, A., Ojeda, A., Lopez-Fuertes, L., Timon, M., Altet, L., Solano-Gallego, L., Sanchez-Robert, E., Francino, O., and Alberola, J.** (2007b): Vaccination with plasmid DNA encoding KMP2, TRYP, LACK and GP63 does not protect dogs against *Leishmania infantum* experimental challenge. *Vaccine* 25, 7962-71.
- Saldarriaga, O. A., Travi, B. L., Park, W., Perez, L. E., and Melby, P. C.** (2006): Immunogenicity of a multicomponent DNA vaccine against visceral leishmaniasis in dogs. *Vaccine* 24, 1928-40.
- Saravia, N. G., Hazbon, M. H., Osorio, Y., Valderrama, L., Walker, J., Santrich, C., Cortazar, T., Lebowitz, J. H., and Travi, B. L.** (2005): Protective immunogenicity of the paraflagellar rod protein 2 of *Leishmania mexicana*. *Vaccine* 23, 984-95.
- Skeiky, Y. A., and Sadoff, J. C.** (2006): Advances in tuberculosis vaccine strategies. *Nat Rev Microbiol* 4, 469-76.
- Stager, S., Smith, D. F., and Kaye, P. M.** (2000): Immunization with a recombinant stage-regulated surface protein from *Leishmania donovani* induces protection against visceral leishmaniasis. *J Immunol* 165, 7064-71.
- Suffia, I., Ferrua, B., Stien, X., Mograbi, B., Marty, P., Rousseau, D., Fragaki, K., and Kubar, J.** (2000): A novel *Leishmania infantum* recombinant antigen which elicits interleukin 10 production by peripheral blood mononuclear cells of patients with visceral leishmaniasis. *Infect Immun* 68, 630-6.
- Sukumaran, B., Tewary, P., Saxena, S., and Madhubala, R.** (2003): Vaccination with DNA encoding ORFF antigen confers protective immunity in mice infected with *Leishmania donovani*. *Vaccine* 21, 1292-9.
- Tewary, P., Jain, M., Sahani, M. H., Saxena, S., and Madhubala, R.** (2005): A heterologous prime-boost vaccination regimen using ORFF DNA and recombinant ORFF protein confers protective immunity against experimental visceral leishmaniasis. *J Infect Dis* 191, 2130-7.
- Tewary, P., Saxena, S., and Madhubala, R.** (2006): Co-administration of IL-12 DNA with rORFF antigen confers long-term protective immunity against experimental visceral leishmaniasis. *Vaccine* 24, 2409-16.
- Todoli, F., Perez-Filgueira, M., Galindo, I., Gomez-Sebastian, S., Escribano, J. M., Rodriguez-Cortes, A., and Alberola, J.** (2009): Seroreactivity against raw insect-derived recombinant KMP2, TRYP, and LACK *Leishmania infantum* proteins in infected dogs. *Vet Parasitol*, 164, 154-61.
- Ulmer, J. B., Wahren, B., and Liu, M. A.** (2006): Gene-based vaccines: recent technical and clinical advances. *Trends Mol Med* 12, 216-22.
- WHO** (2002): The World Health Report <http://www.who.int/whr/2002/en/whr02_en.pdf>. WHO, Geneva.
- Wilson, M. E., Young, B. M., Andersen, K. P., Weinstock, J. V., Metwali, A., Ali, K. M., and Donelson, J. E.** (1995): A recombinant *Leishmania chagasi* antigen that stimulates cellular immune responses in infected mice. *Infect Immun* 63, 2062-9.

- Woodland, D. L.** (2004): Jump-starting the immune system: prime-boosting comes of age. *Trends Immunol* 25, 98-104.
- Zanin, F. H., Coelho, E. A., Tavares, C. A., Marques-da-Silva, E. A., Silva Costa, M. M., Rezende, S. A., Gazzinelli, R. T., and Fernandes, A. P.** (2007): Evaluation of immune responses and protection induced by A2 and nucleoside hydrolase (NH) DNA vaccines against *Leishmania chagasi* and *Leishmania amazonensis* experimental infections. *Microbes Infect* 9, 1070-7.
- Zhang, X., Laubach, V. E., Alley, E. W., Edwards, K. A., Sherman, P. A., Russell, S. W., and Murphy, W. J.** (1996): Transcriptional basis for hyporesponsiveness of the human inducible nitric oxide synthase gene to lipopolysaccharide/interferon-gamma. *J Leukoc Biol* 59, 575-85.

Discusión



La CanL es un problema no sólo a nivel veterinario sino también de salud pública en diversos países del mundo, la mayoría de ellos en vías de desarrollo (WHO, a). El perro es el principal reservorio peridoméstico de esta enfermedad transmisible a los humanos, de manera que el control del parásito en este hospedador es un requisito indispensable para controlar la zoonosis en el hombre. Para ello es necesario un diagnóstico preciso de los perros infectados y el desarrollo de una vacuna contra la CanL, que constituiría el método más eficaz para el control de la zoonosis (Dye, 1996). Desde hace aproximadamente 20 años, la biotecnología ha permitido la obtención de proteínas recombinantes derivadas del DNA de *Leishmania* (Kubar y Fragaki, 2005). Su aplicación en el control de la leishmaniosis ha originado la aparición de una nueva generación de herramientas diagnósticas (Maia y Campino, 2008) y vacunales (Coler y Reed, 2005; Palatnik-de-Sousa, 2008).

A lo largo de esta tesis hemos estudiado la respuesta inmunológica frente a cuatro proteínas recombinantes de *L. infantum* —KMPII, TRYP, LACK y papLe22— en el perro, y hemos evaluado su utilidad en el control de la ZVL mediante el desarrollo de técnicas diagnósticas (estudios 1 y 2) y vacunales (estudio 3). Las cuatro proteínas fueron producidas con éxito en larvas *T. ni* infectadas con baculovirus. Todas ellas fueron identificadas como bandas del peso molecular esperado en los correspondientes WB y conservaron su inmunogenicidad. Esta característica era esperable, puesto que el sistema de expresión de proteínas recombinantes en larvas infectadas por baculovirus permite la producción de proteínas derivadas de patógenos eucariotas con la mayoría de modificaciones postraduccionales presentes en la proteína nativa, obteniéndose así proteínas de gran calidad (Kost *et al.*, 2005). Las proteínas recombinantes pudieron utilizarse en forma de extractos crudos de larva de manera que no se realizó su purificación para emplearlas en los diferentes ensayos (pruebas de laboratorio o pruebas *in vivo*). Los extractos crudos sin purificar han constituido un reactivo útil en otras enfermedades tanto para fines diagnósticos como vacunales (Barderas *et al.*, 2000; Barderas *et al.*, 2001; Perez-Filgueira *et al.*, 2007; Gomez-Sebastian *et al.*, 2008; Perez-Martin *et al.*, 2008).

Son varias las ventajas que proporciona el sistema de obtención de proteínas recombinantes en larvas biorreactoras. Por una parte, permite la obtención de importantes cantidades de proteína de gran calidad a bajo coste. Por ejemplo, la proteína rKMPII obtenida a partir de una única larva infectada con baculovirus permitiría tapizar hasta 10 000 pocillos de ELISA (estudio 1), y el coste de una dosis de vacuna empleando este tipo de extractos sin purificación se estimó en 0,000044 € (Perez-Filgueira *et al.*, 2007). Por otra parte, los extractos de proteínas liofilizados no requieren condiciones especiales de transporte ni almacenamiento, y a temperatura ambiente mantienen su antigenicidad durante más de 2 años (Perez-Filgueira *et al.*, 2007). En conjunto, todas estas características convierten a las proteínas recombinantes producidas en larvas de insectos

lepidópteros en reactivos especialmente útiles para su aplicación en técnicas de control de la ZVL en países en vías de desarrollo, los más afectados por esta enfermedad.

1. IDENTIFICACIÓN DE INMUNÓGENOS DE CÉLULAS B MEDIANTE EL USO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES: UTILIDAD DIAGNÓSTICA EN LA INFECCIÓN POR *L. INFANTUM* EN EL PERRO

El diagnóstico diferencial de la CanL incluye enfermedades tan diversas como demodicosis, sarna sarcóptica, alergia a las pulgas, neoplasias cutáneas, dermatitis infecciosas o inmunomediadas, ehrlichiosis, rickettsiosis y babesiosis (Gomes *et al.*, 2008). El diagnóstico clínico, por lo tanto, no es concluyente y requiere el apoyo de pruebas parasitológicas o inmunológicas (Maia y Campino, 2008). De los métodos parasitológicos, la PCR es la técnica con mayor sensibilidad, pero tiene el inconveniente de requerir muestras invasivas para ello, de ser cara y de requerir de un equipamiento muy especializado, no resultando aplicable en situaciones de campo. En cambio, algunos métodos inmunológicos para evaluación de la respuesta humoral son más baratos y requieren menor equipamiento, en especial el DAT y la inmunocromatografía de tipo *dipstick* (Chappuis *et al.*, 2007). El ELISA tiene algunos requerimientos técnicos pero, a diferencia del DAT y el *dipstick*, es un método objetivo y cuantitativo que permite el cribado serológico de un gran número de muestras con una gran sensibilidad, y que además muestra una exactitud significativamente mejor que los métodos habitualmente considerados de referencia como la PCR y la IFI (Rodríguez-Cortés *et al.*, enviado). Además, se ha descrito que el uso de algunos antígenos como rK39 en *dipstick*, reduce la sensibilidad del diagnóstico respecto al obtenido mediante ELISA (Lemos *et al.*, 2008).

Tradicionalmente, la respuesta humoral específica contra *Leishmania* se ha evaluado empleando antígeno crudo del parásito (Riera *et al.*, 1999; Nakhaee *et al.*, 2004; Vale *et al.*, 2009). Este tipo de reactivo tiene la desventaja de ser difícilmente estandarizable ya que la concentración final de cada antígeno es desconocida y puede diferir según el laboratorio y el lote, la fase del parásito o el método de obtención. Es por ello que diversos estudios han evaluado la presencia de anticuerpos contra antígenos recombinantes de *Leishmania* en perros enfermos, con el objetivo de desarrollar una técnica serodiagnóstica estandarizable (tabla 4 de la introducción, pág. 41). En el estudio 1 evaluamos la utilidad diagnóstica del ELISA basado en 3 antígenos recombinantes —rKMPII, rTRYP y rLACK— en perros con CanL.

El antígeno rKMPII fue reconocido por un 75 % de los perros con CanL. Previamente, la presencia de anticuerpos anti-rKMPII se había descrito en 24 de 25 perros infectados de forma natural (96 %) (Berberich *et al.*, 1997) y en 4 de 4 perros infectados de forma experimental (100 %) (Nieto

et al., 1999). Los resultados de los diferentes estudios indican que la mayoría de perros infectados por *L. infantum* desarrolla anticuerpos contra KMPII durante la CanL, con una seroprevalencia muy similar a la descrita en los humanos con VL (70 %–100 %) (Berberich *et al.*, 1997; Jensen *et al.*, 1998; Ramirez *et al.*, 1998; Trujillo *et al.*, 1999; de Carvalho *et al.*, 2003). KMPII es un importante componente estructural de la membrana de *Leishmania* y se ha estimado que existe un abundante número de copias por parásito ($\sim 2 \times 10^6$) (Jardim *et al.*, 1995), hecho que puede haber favorecido su papel como diana de la respuesta inmunológica humoral. Tres factores indican la utilidad del extracto crudo de larvas conteniendo rKMPII como componente de un ELISA para el diagnóstico de los perros con CanL: 1) el antígeno rKMPII fue reconocido por un elevado porcentaje de perros enfermos; 2) la utilización de extracto crudo de larva no produjo una disminución significativa de la sensibilidad en comparación con la descrita en los estudios citados que emplearon rKMPII producido en *E. coli* y purificado (Berberich *et al.*, 1997; Nieto *et al.*, 1999) (Test de χ^2 , $P \geq 0.05$ para todas las comparaciones); y 3) la absorbancia del ELISA basado en rKMPII se ha correlacionado significativamente con la del rK39, tanto en humanos con VL como en perros con CanL (Goto *et al.*, 2009).

KMPII es un antígeno muy conservado en la clase *Kinetoplastea*, presente de forma abundante no sólo en el género *Leishmania* sino también en *Trypanosoma* (Stebeck *et al.*, 1995). En *Crithidia*, *Leptomonas* y *Phytomonas* spp. también se ha descrito la presencia de esta proteína, pero en estos géneros o bien se expresa en una proporción mucho menor o bien presenta una escasa inmunogenicidad (Stebeck *et al.*, 1995). Los anticuerpos dirigidos contra la proteína KMPII de *Leishmania* pueden provocar reacciones cruzadas contra la proteína KMPII de *Trypanosoma* (*Tr.*) *brucei* (Stebeck *et al.*, 1995) causante de la tripanosomiasis africana (WHO, b), o de *Tr. cruzi* (Berberich *et al.*, 1997; Trujillo *et al.*, 1999; Thomas *et al.*, 2001), causante de la enfermedad de Chagas-Mazza en América Central y América del Sur (WHO, c). Ambos parásitos pueden afectar al perro, que además constituye el principal reservorio de *Tr. cruzi* (Minter, 1976; Mehlitz, 1979). En las ecorregiones alrededor de la cuenca Mediterránea no existen casos de infección por *Trypanosoma*, de manera que rKMPII podría ser un antígeno de utilidad para el diagnóstico de la CanL. Sin embargo, su aplicación en otras ecorregiones donde la distribución de ambos parásitos se solapa podría provocar falsos positivos. Estudios detallados de los determinantes antigénicos de esta proteína revelan que mientras los pacientes con leishmaniosis reconocen principalmente epítomos conformacionales, los pacientes con la enfermedad de Chagas-Mazza reconocen epítomos lineales, particularmente dos regiones situadas en el centro y en el extremo carboxi-terminal (Trujillo *et al.*, 1999; Thomas *et al.*, 2001). Así, sería posible un método diagnóstico diferencial para la enfermedad de Chagas-Mazza mediante una prueba paralela basada en estos dos péptidos lineales de KMPII. Recientemente, se ha desarrollado una prueba que permite diagnosticar específicamente la infección por *Tr. cruzi* en el perro evitando la reacción cruzada con

L. infantum (Umezawa *et al.*, 2009). Esta prueba se basa en antígenos excretados-secretados de tripomastigotes (TESA) que previamente se habían utilizado para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas-Mazza en humanos (Umezawa *et al.*, 2001). La utilización del antígeno crudo de *Leishmania* también puede provocar reacciones cruzadas con otros patógenos como *Erichia*, *Rickettsia*, o *Toxoplasma* (Gomes *et al.*, 2008). Las pruebas basadas en antígenos recombinantes permitirán identificar los antígenos que inducen estas reacciones cruzadas y obtener métodos diagnósticos de mayor especificidad.

Hasta el momento, ningún estudio ha evaluado la seroprevalencia frente a los antígenos TRYP y LACK en perros con CanL. En el estudio 1, la seroprevalencia detectada contra el antígeno TRYP en los perros con enfermedad patente fue del 51 %. El único estudio con estas características en humanos describió la misma seroprevalencia en pacientes con VL y con CL (50 %) (Webb *et al.*, 1998). Los resultados sugieren que TRYP es un inmunógeno moderado de células B en los perros con CanL, de manera similar a lo que ocurre en los pacientes con VL. La inmunización con tres antígenos entre los que se incluía TRYP indujo una producción de anticuerpos moderada contra esta proteína, tanto en perros (Fujiwara *et al.*, 2005) como en macacos Rhesus (*Macaca mulatta*) (Campos-Neto *et al.*, 2001). Por otro lado, los resultados del estudio 1 indican que la proteína LACK es reconocida únicamente por el 42 % de perros con leishmaniosis. El antígeno LACK (Kamoun-Essghaier *et al.*, 2005) fue identificado como componente de las bandas altamente inmunorreactivas de 30 kDa–36 kDa en el WB de pacientes con VL causada por *L. infantum*. Un único estudio ha evaluado la seroprevalencia frente a este antígeno en humanos, detectando que un 97 % de pacientes con VL presentaban anticuerpos contra rLACK (Maalej *et al.*, 2003). La seroprevalencia frente a LACK en perros con CanL obtenida en el estudio 1 difiere significativamente de la descrita en humanos. Varias razones podrían explicar esta diferencia. En primer lugar, es posible que LACK sea un inmunógeno más débil sobre los linfocitos B en los perros que en los humanos. En este sentido, se ha descrito que los antígenos rCPB y rK39 son inmunógenos más débiles sobre los linfocitos B durante la CanL que durante la VL (Goto *et al.*, 2009). Para evidenciar que un fenómeno similar ocurre con el antígeno LACK y descartar que las diferencias sean debidas a otros factores, las muestras deberían ensayarse conjuntamente en la misma técnica de ELISA. En segundo lugar, podría ocurrir que la seroprevalencia frente a LACK fuese igual en humanos y perros, como hemos descrito en el caso de KMPII y TRYP, pero que algún factor como una fase diferente de la enfermedad de los individuos de ambos estudios hubiese influido en el resultado. En este sentido, se ha observado que la serorreactividad frente a diversos antígenos varía según el tiempo post-infección en perros infectados experimentalmente (Nieto *et al.*, 1999). Finalmente, la diferencia podría deberse a un enmascaramiento parcial del antígeno LACK en el ELISA a causa del extracto crudo de larva. No hay evidencias de que esto

ocurriese con el ELISA basado en rKMPII, sin embargo la cantidad de antígeno necesaria para poner a punto el ELISA basado en rLACK fue 20 veces superior.

Los ELISA basados en otros antígenos como rK39, pero también rCPA (Rafati *et al.*, 2003), rGP63 (Morales *et al.*, 1997), rLdcccys (Pinheiro *et al.*, 2009) o rLiP2b (Soto *et al.*, 1995) han obtenido mejores niveles de sensibilidad para el diagnóstico de los perros con CanL que los ELISA basados en extractos crudos de larva conteniendo rKMPII, rTRYP o rLACK (tabla 4 de la introducción, pág. 41). Sin embargo, la complementariedad observada entre estos tres antígenos permitió aumentar la sensibilidad del diagnóstico cuando los resultados fueron evaluados en paralelo (estudio 1). Combinando los tres resultados, la sensibilidad aumentó hasta el 93 % y no difirió significativamente de la obtenida con el ELISA de antígeno crudo, mientras que la especificidad se mantuvo también muy elevada (97 %). Otros ensayos diagnósticos han combinado los resultados de diferentes antígenos en paralelo, mejorando la sensibilidad en relación al uso de un único antígeno. La combinación de los antígenos rK9 y rK39sub (fragmento único sin repeticiones de K39) obtuvo una sensibilidad del 89 % (Rosati *et al.*, 2003), mientras que la de rK39, rK26 y rA2 alcanzó el 100 % (Porrozzi *et al.*, 2007). La creación de proteínas quimera conteniendo epítomos de diferentes antígenos ha sido otra estrategia para aumentar la sensibilidad del diagnóstico, alcanzando sensibilidades del 79 %– 98 %. La combinación de los antígenos rKMPII, rTRYP o rLACK en el mismo pocillo o la creación de una proteína quimera fusionando los tres, podría constituir un método eficaz para el diagnóstico de la CanL.

Una característica interesante del diagnóstico basado en proteínas recombinantes sería la de poder diferenciar individuos vacunados de infectados. En Brasil dos vacunas contra la CanL han obtenido el registro sanitario: Leishmune®, basada en el antígeno FML purificado y LeishTec®, basada en el antígeno rA2. De momento, no existe ningún test diagnóstico comercial capaz de diferenciar a los perros vacunados de los perros infectados. El uso del antígeno crudo sólo permitiría diferenciar correctamente a los infectados de los vacunados con LeishTec® (Fernandes *et al.*, 2008), pero no con Leishmune®. Sin embargo, el programa de control de la leishmaniosis de Brasil exige la realización de cribados serológicos y el sacrificio de los perros seropositivos (Moreira *et al.*, 2004). De esta manera, existe la posibilidad de que los perros vacunados sean diagnosticados erróneamente como infectados y en consecuencia, sacrificados (Dantas-Torres y Brandao-Filho, 2006). Podríamos hipotetizar que el ELISA basado en la combinación de rKMPII, rTRYP y rLACK serviría para diferenciar a los animales vacunados con Leishmune® o LeishTec® de los animales infectados, ya que ninguno de los antígenos de estas dos vacunas (FML y rA2) está presente en la técnica diagnóstica. Algunos estudios empiezan a explorar este campo, y se ha descrito, por ejemplo, que el diagnóstico combinando rK39 y antígeno crudo permitiría la identificación de los perros infectados con una elevada especificidad y sensibilidad,

respectivamente, y diferenciarlos correctamente de los perros vacunados con TRYP o LACK (Carson *et al.*, 2009a). A medida que se comercialicen y utilicen nuevas vacunas contra la CanL, se intensificará la necesidad de desarrollar nuevas pruebas para el correcto diagnóstico de los perros infectados.

En el estudio 2, evaluamos la serología frente a los antígenos recombinantes de *L. infantum* en 27 perros residentes en una zona endémica. Cinco de los perros incluidos en el estudio presentaron signos clínicos de CanL, y fueron diagnosticados como infectados por la presencia de anticuerpos frente al antígeno crudo (n = 5), reacción LST positiva (n = 4) o parásito en sangre mediante qPCR (n = 2). Uno de los animales, precisamente el que presentó una serología más elevada contra el antígeno crudo, fue seropositivo a KMPII. En cambio, ninguno de los 5 animales reconoció rTRYP o rLACK. Los resultados sugieren que la sensibilidad del ELISA basado en las proteínas recombinantes rKMPII, rTRYP, rLACK podría ser inferior en los perros con bajos niveles de anticuerpos frente al parásito que en los perros con niveles elevados. Sin embargo, el escaso número de animales seropositivos bajos evaluados (n = 3) no permite extraer conclusiones claras. Una razón para esta pérdida de sensibilidad podría ser que la serorreactividad frente a estas proteínas recombinantes apareciese en un momento más avanzado de la infección. En este sentido, en dos infecciones experimentales con *L. infantum* se detectaron anticuerpos frente a rKMPII de 30 a 60 días más tarde que frente a otros antígenos del parásito (Nieto *et al.*, 1999; Carrillo *et al.*, 2008). Otra razón podría ser que el uso de extractos proteicos sin purificar disminuyese la sensibilidad de la técnica diagnóstica, como se ha comentado anteriormente. No obstante, hay que tener en cuenta que la purificación de los antígenos aumentaría de forma considerable el coste de producción. La ventaja de utilizarlos sin purificar radica precisamente en el bajo coste, una característica muy deseable para las herramientas diagnósticas empleadas contra esta enfermedad. Debido a la elevada producción de proteína recombinante en las larvas, la utilización del extracto crudo suele ser suficiente como para permitir la detección de anticuerpos frente a la proteína de interés (Barderas *et al.*, 2000; Gomez-Sebastian *et al.*, 2008; Perez-Martin *et al.*, 2008). En futuros estudios, compararemos la sensibilidad obtenida mediante los antígenos recombinantes en forma de extracto crudo o purificado en el diagnóstico de los perros con bajos niveles de anticuerpos contra el parásito.

Dos de los 5 animales con CanL del estudio 2, aquellos que presentaron una serología más elevada frente al antígeno crudo, presentaron también anticuerpos contra rpapLe22. La serorreactividad frente al antígeno rpapLe22 sólo fue evaluada en el estudio 2 debido a que su obtención fue posterior a la realización del estudio 1. Un estudio ha descrito anticuerpos anti-rpapLe22 en perros infectados de forma natural y en tratamiento (Fragaki *et al.*, 2001). Así, el antígeno papLe22 parece ser también un inmunógeno sobre los linfocitos B durante la CanL. No

obstante, deberán analizarse un mayor número de animales para determinar cuál es la seroprevalencia frente a este antígeno y cuál es su papel en la respuesta humoral de los animales enfermos.

En el estudio 2, evaluamos la respuesta humoral frente al antígeno crudo y los antígenos recombinantes de *L. infantum* en perros infectados sin signos clínicos. En total, el 77 % de los perros clínicamente sanos (17 de 22), se consideraron como infectados al presentar una reacción LST positiva y/o parásitos en sangre. Ninguno de estos animales fue seropositivo al antígeno crudo de *L. infantum* ni tampoco a las cuatro proteínas recombinantes ensayadas. La serología puede ser de gran utilidad para el diagnóstico de los perros enfermos, pero una parte importante de la población infectada de forma natural y sin signos clínicos no experimenta seroconversión (Solano-Gallego *et al.*, 2001). Sin embargo, resultados no publicados de nuestro grupo sugieren que rKMPII podría ser útil para diagnosticar la población de perros infectados clínicamente sanos que sí desarrolla una respuesta humoral, como se ha descrito en pacientes con VL subclínica (Ramirez *et al.*, 1998). En 14 de 14 perros infectados experimentalmente que no desarrollaron signos clínicos de enfermedad pero sí anticuerpos contra el antígeno crudo de *Leishmania*, se hallaron anticuerpos contra rKMPII (100 %), mientras que los anticuerpos contra rTRYP y rLACK sólo se detectaron en 2 de los animales (14 %). Otros estudios han descrito que los perros infectados sin signos clínicos que desarrollan una respuesta humoral presentan una elevada serorreactividad frente a rCPB (Nakhaee *et al.*, 2004) y rA2 (Porrozzi *et al.*, 2007).

2. IDENTIFICACIÓN DE INMUNÓGENOS DE CÉLULAS T MEDIANTE EL USO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES

2.1. Utilidad diagnóstica en la infección por *L. infantum* en el perro

El DTH con leishmanina (LST) se considera un marcador de resistencia a la enfermedad, ya que generalmente sólo los perros infectados clínicamente sanos (Cardoso *et al.*, 1998; Solano-Gallego *et al.*, 2000), los perros recuperados de la CanL tras un tratamiento eficaz (Borja-Cabrera *et al.*, 2004; Gomez-Ochoa *et al.*, 2009) o los perros vacunados en los que se ha conseguido protección (Borja-Cabrera *et al.*, 2002; Molano *et al.*, 2003; Rafati *et al.*, 2005) presentan una reacción LST positiva. Sin embargo, la leishmanina es un reactivo compuesto de promastigotes fenolizados y por tanto, difícilmente estandarizable, hecho que ha impedido su aplicación comercial al ámbito clínico. A pesar de la utilidad que tendría una técnica reproducible de DTH para el diagnóstico de los perros infectados sin signos clínicos (Fernandez-Bellon *et al.*, 2005), la aplicación de las

proteínas recombinantes a las pruebas de DTH sólo ha empezado a ser explorada en la actualidad (Pinheiro *et al.*, 2009).

En el estudio 2, evaluamos la respuesta DTH contra la leishmanina, y contra los antígenos rKMPII, rTRYP, rLACK y rpapLe22 no purificados en perros residentes en la isla de Mallorca. Esta isla constituye un foco endémico del parásito donde mediante la combinación de la carga parasitaria en sangre, la serología y la respuesta celular hemos detectado una tasa de infección muy elevada (82 %), similar a la que se había descrito previamente (77 %) (Solano-Gallego *et al.*, 2000). El DTH con rTRYP fue positivo en el 56 % de animales con reacción positiva al LST, sugiriendo que este antígeno podría ser un componente adecuado en una formulación multiantigénica para la valoración de la respuesta celular contra el parásito mediante DTH. Aunque rKMPII detectó un menor número de individuos —33 % de los perros con reacción positiva a LST—, la combinación de los resultados positivos obtenidos mediante los antígenos rTRYP y rKMPII en paralelo permitió abarcar hasta el 78 % de individuos positivos a LST. Por esta razón, estimamos la sensibilidad y especificidad de la combinación de ambos antígenos en paralelo en relación a la leishmanina para la detección de la respuesta celular, obteniendo un valor del 78 % para cada uno de estos parámetros. Es conveniente recalcar que esta estimación presenta limitaciones debido al escaso número de animales analizados. No obstante, la clasificación de los perros según la respuesta DTH a TRYP y rKMPII en paralelo mostró una asociación significativa con la clasificación según el LST (Test de χ^2 , $P = 0,011$). Este resultado sugiere que rTRYP y rKMPII podrían ser componentes de interés para la obtención de un reactivo multiantigénico estandarizable para la detección de la respuesta celular específica en los perros infectados sin signos clínicos.

Es importante destacar que en uno de los animales infectados en el que se halló parásito en sangre (M13), no se detectó respuesta LST positiva, pero sí una reacción DTH contra rTRYP y rpapLe22. Es posible que la detección de la respuesta celular mediante proteínas recombinantes pueda mejorar en ciertos casos la sensibilidad de la leishmanina, en la cual la concentración de cada antígeno específico es desconocida. El único estudio de estas características publicado hasta el momento se realizó con la proteína rLdcccys1. En dicho estudio, todos los perros infectados clínicamente sanos ($n = 41$) tuvieron una reacción DTH positiva a la proteína (Pinheiro *et al.*, 2009). Quizá el test de DTH utilizando las proteínas rKMPII, rTRYP, rLACK y rpapLe22 purificadas permita aumentar el número de animales infectados detectados. Nuestro estudio es pionero en la utilización de extractos crudos de larva para la detección de la respuesta celular mediante DTH y no existe información sobre la posible interferencia de las proteínas de larva en este tipo de pruebas.

La evaluación de la respuesta celular resultó el método más sensible para la detección de los perros infectados sin signos clínicos en el estudio 2. Mientras el 64 % de los animales sin signos clínicos presentó una reacción LST positiva y una reacción DTH positiva a KMPII y/o TRYF, sólo el 50 % de animales mostró parásitos en sangre. Este hecho pone de manifiesto la necesidad de estandarizar una técnica DTH para la identificación de la población de perros infectados clínicamente sanos, los cuales constituyen la gran mayoría de los perros infectados por *Leishmania*. Otros estudios han demostrado que la cuantificación de parásitos en sangre por qPCR no es un método sensible para el diagnóstico de los perros clínicamente sanos o bajo tratamiento, los cuales generalmente muestran una presencia irregular del parásito en sangre a lo largo del tiempo (Rodríguez-Cortes *et al.*, 2007; Manna *et al.*, 2008).

En el estudio 2, 4 de los 5 animales con CanL desarrollaron una reacción LST positiva. Aunque se ha descrito que en general los perros enfermos presentan una reacción negativa al LST (Pinelli *et al.*, 1994; Molano *et al.*, 2003; Dos-Santos *et al.*, 2008), en estudios previos de nuestro grupo, animales enfermos infectados de forma experimental presentaron también una reacción LST positiva (Rodríguez-Cortes *et al.*, 2007). La presencia de una respuesta DTH específica en estos animales sugiere que los perros enfermos son capaces de desarrollar una respuesta celular protectora, pero ésta debe estar inhibida por otros factores (Carrillo y Moreno, 2009). Dos de estos perros enfermos mostraron además una respuesta DTH positiva contra los antígenos recombinantes, uno contra rKMPII y otro contra rTRYF. En cambio, ningún animal enfermo fue positivo al DTH con rLACK o rpapLe22. El estudio de la respuesta DTH con proteínas recombinantes en perros sanos y enfermos permitiría distinguir los antígenos que son marcadores de protección de los que no lo son, y quizá desarrollar formulaciones más eficaces que la leishmanina para la detección de un fenotipo de respuesta asociado a la resistencia frente a la enfermedad.

2.1. Utilidad en la identificación de candidatos vacunales

La identificación de antígenos que generan una respuesta inmune protectora en los individuos resistentes de forma natural se ha propuesto como una estrategia útil para un desarrollo más racional de vacunas (Carrillo *et al.*, 2008). Aunque los cuatro antígenos empleados en los diferentes estudios de la presente tesis han sido descritos como candidatos vacunales contra *Leishmania* (Khamesipour *et al.*, 2006; Palatnik-de-Sousa, 2008), ninguno había evaluado hasta el momento la capacidad de dichos antígenos para generar una respuesta celular protectora en los perros resistentes al parásito de forma natural.

Otros estudios han evaluado la capacidad inmunogénica de diferentes antígenos de *L. infantum* tales como HSP-70, KMP11, PFR-2 (Carrillo *et al.*, 2008) o los antígenos purificados P-8 (Carrillo *et al.*, 2007) y GP63 (Rhallem *et al.*, 1999) mediante la linfoproliferación *in vitro* de PBMCs de perros asintomáticos u oligosintomáticos y mediante la evaluación de las citocinas producidas. En este trabajo hemos utilizado por primera vez la detección de la respuesta DTH frente a las proteínas rKMP11, rTRYP, rLACK y rPapLe22 de *L. infantum* para evaluar su potencial como candidatos vacunales. La reacción DTH es un método aceptado para la evaluación de la respuesta celular (Walsh *et al.*, 1995). Esta técnica ha servido por ejemplo para detectar la inmunogenicidad de candidatos vacunales contra el sida (Sitz *et al.*, 1997) o la malaria (Stewart *et al.*, 2006). Los datos obtenidos en el estudio 2 permiten perfilar el valor de estos antígenos como candidatos vacunales contra la leishmaniosis.

En el estudio 2, observamos que un 59 % de los perros clínicamente sanos considerados como infectados (10 de 17) presentaban DTH específico contra el antígeno rTRYP. Podríamos interpretar entonces que el antígeno TRYP participa en la inducción de una respuesta celular protectora en más de la mitad de los individuos infectados que no desarrollan la enfermedad. De manera similar, en un estudio de vacuna empleando el antígeno TRYP mediante una estrategia DNA/MVA se detectó una reacción DTH positiva frente a TRYP en 6 de los 8 perros vacunados, paralelamente a la inducción de IFN- γ por este antígeno *in vitro* (Carson *et al.*, 2009b). La capacidad inmunoestimuladora de TRYP sobre los linfocitos T ha sido descrita también en pacientes con MCL o con VL tras la recuperación clínica (Webb *et al.*, 1998). La vacuna quimérica Leish-111f, compuesta por la fusión de los antígenos TRYP, LmST11 y LeiF, es actualmente la única vacuna de proteínas recombinantes contra *Leishmania* que ha alcanzado la fase de estudio clínico en humanos, tras haber demostrado protección frente a la CL en modelos murinos y de primates (Coler *et al.*, 2007). Sin embargo, los estudios realizados en perros con esta vacuna no han demostrado protección contra la CanL (Gradoni *et al.*, 2005; Moreno *et al.*, 2007). El fracaso de la vacuna en los perros podría deberse a una pérdida de inmunogenicidad de la proteína fusión en relación con las proteínas independientes. En este sentido, un estudio piloto con las proteínas TRYP, LmST11 y LeiF por separado sí que confirmó protección contra la CanL (Gradoni *et al.*, 2005). La conservación de los epítomos de TRYP estimuladores de las células T entre diferentes especies de *Leishmania* (Webb *et al.*, 1998), su presencia en el amastigote y el promastigote (Kubar y Fragaki, 2006) y su capacidad de estimular una potente respuesta celular tanto en los humanos como en los perros, indican que TRYP debe ser considerado como un prometedor candidato vacunal contra esta enfermedad.

Únicamente un 29 % (5 de 17) de los perros sin signos clínicos considerados infectados tuvieron una reacción DTH positiva frente a rKMP11. La falta de producción de IFN- γ o la inhibición de una

respuesta T_h1 debido a la producción de citocinas T_h2 podría ser la causa de este bajo número de reacciones. En este sentido, en PBMCs de perros asintomáticos y oligosintomáticos infectados experimentalmente con *L. infantum*, rKMPII indujo linfoproliferación pero una baja producción de IFN- γ (Carrillo *et al.*, 2008). KMPII es capaz de estimular la proliferación y la producción de IFN- γ por los linfocitos T CD4+ como por los T CD8+ humanos, y los epítomos responsables de esta activación han sido caracterizados (Delgado *et al.*, 2003; Basu *et al.*, 2007). Sin embargo, el perfil de citocinas inducido por KMPII en los humanos parece ser en realidad mixto; en pacientes con historia de VL, KMPII induce proliferación de los linfocitos T y producción de IFN- γ e IL-4 (Kemp *et al.*, 1993; Kurtzhals *et al.*, 1994; Jensen *et al.*, 1998) debido a la expansión de clones T_h1 y T_h2 (Kemp *et al.*, 1993). También en pacientes con VL subclínica y con CL se detecta una inducción de IL-10 e IFN- γ tras la estimulación con KMPII (de Carvalho *et al.*, 2003). En conclusión, aunque el antígeno KMPII induce proliferación de las células T y los epítomos responsables se han conservado evolutivamente en al menos 9 especies del parásito (Tolson *et al.*, 1994), la participación de KMPII en una respuesta protectora es controvertida, debido a su escaso papel T_h1 en los perros y a su papel mixto T_h1/T_h2 en humanos.

En los perros infectados sin signos clínicos, LACK parece no ser un inductor de respuesta T_h1 , ya que únicamente un 24 % (4 de 17) mostró una reacción DTH positiva frente a este antígeno. En pacientes con VL tras la curación no se observó tampoco linfoproliferación específica frente a este antígeno (Maasho *et al.*, 2001). En los pacientes con CL, LACK induce un patrón mixto de citocinas donde se detectan tanto IFN- γ como IL-10 (Bottrel *et al.*, 2001; Maasho *et al.*, 2001; Bourreau *et al.*, 2002b; Antonelli *et al.*, 2004; Carvalho *et al.*, 2005; Azeredo-Coutinho *et al.*, 2008). Curiosamente, ambas citocinas se observan también tras la estimulación con el antígeno LACK de los PBMC de personas nunca expuestas a *Leishmania* (Maasho *et al.*, 2000; Bourreau *et al.*, 2002a; Carvalho *et al.*, 2005). Debido al importante papel que IL-10 tiene en la patogenia de la VL (Nylen y Sacks, 2007) es posible que su inducción por parte de LACK condicione el entorno de citocinas de las primeras fases de infección y contribuya al establecimiento de la infección. La inducción de la tolerancia a este único antígeno ha conferido protección en ratones BALB/c frente a *L. major* (Julia *et al.*, 1996). Sin embargo, el desarrollo de una respuesta tipo T_h2 no protectora debida a la susceptibilidad a LACK explica la patogenia del parásito únicamente en este modelo experimental (Launois *et al.*, 1997; Julia y Glaichenhaus, 1999; Stetson *et al.*, 2002). En contraste con los excelentes resultados obtenidos tras la vacunación con LACK en el modelo de CL en ratón, la vacunación con LACK en el perro sólo ha conseguido una protección parcial frente a *L. infantum* (Ramiro *et al.*, 2003; Ramos *et al.*, 2008).

Sólo el 24 % de perros infectados sin signos clínicos (4 de 17) presentaron una reacción DTH positiva frente a rpaLe22. Este bajo porcentaje sugiere que este antígeno no es un inductor

relevante de respuesta celular durante la infección subclínica en el perro. En pacientes con VL, no existen indicios de producción de IFN- γ por parte de los PBMC tras la incubación con rPapLe22, ni siquiera tras el tratamiento (Suffia *et al.*, 2000). El papel agravante de este antígeno sobre la VL se ha asociado a la estimulación de la producción de IL-10, la cual aumenta a medida que avanza la infección, inhibiendo la linfoproliferación (Suffia *et al.*, 2000). Por su papel agravante de la enfermedad, PapLe22 constituiría una diana de interés para el desarrollo de vacunas. El antígeno se ha conservado evolutivamente al menos en 3 especies de *Leishmania*: *L. infantum*, *L. major* y *L. guyanensis* (Suffia *et al.*, 2000).

A la vista de estos resultados, podríamos concluir que una estrategia vacunal contra la CanL basada en estos cuatro antígenos podría aprovechar la capacidad de rTRYP de estimular una respuesta celular, pero necesitaría evitar la respuesta T_H2 que posiblemente estén provocando los antígenos KMP11, LACK, o PapLe22. Para evitar el efecto de estos antígenos potencialmente agravantes de la enfermedad o “patoantígenos” (Chang *et al.*, 2003), diversos autores han propuesto la reorientación de la respuesta T_H2 hacia una respuesta T_H1 mediante estrategias de vacunación como el DNA o el *prime-boost* (Maasho *et al.*, 2000; Fragaki *et al.*, 2001; Campos-Neto, 2005).

3. UTILIDAD DE LAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES EN LA VACUNACIÓN FRENTE A *L. INFANTUM*: COMPARACIÓN DE TRES ESTRATEGIAS VACUNALES MULTIANTIGÉNICAS

El desarrollo de una vacuna multiantigénica con antígenos conservados evolutivamente constituiría una herramienta interesante para el control de la leishmaniosis (Palatnik-de-Sousa, 2008) por diversas razones: 1) el uso de antígenos conservados permitiría desarrollar una sola vacuna contra diferentes especies de *Leishmania*; 2) la combinación de diferentes antígenos permitiría el desarrollo de respuestas inmunológicas contra diferentes epítopos del parásito y evitaría la posible falta de respuesta debida a la heterogeneidad de la población; 3) esta estrategia disminuiría la presión de selección en el parásito, la cual podría dar lugar a mutaciones y evasión de la respuesta inmunológica; 4) los diferentes antígenos podrían estimular diferentes componentes de la respuesta inmunitaria, tales como la respuesta innata y la adquirida; y 5) la respuesta inmunitaria generada contra cada antígeno se sumaría obteniendo un efecto aditivo, a menos que los antígenos fueran antagonistas entre ellos, como se ha descrito por ejemplo en la vacunación con proteínas recombinantes combinando los antígenos A2 y LACK (Coelho *et al.*, 2003) o con DNA combinando A2 y NH (Zanin *et al.*, 2007).

En el estudio 3, evaluamos la seguridad, inmunogenicidad y eficacia de la vacunación con KMP11, TRYP, LACK y PapLe22 en tres estrategias diferentes —proteína, DNA y DNA/proteína— contra la

infección por *L. infantum* en el modelo de hámster. Para evaluar la inmunogenicidad, se analizaron los niveles de anticuerpos específicos contra el antígeno total de *Leishmania* y contra los antígenos recombinantes mediante ELISA, así como la producción de NO por los macrófagos infectados *in vitro* y su capacidad leishmanicida. La carga parasitaria en bazo y sangre evaluada mediante PCR cuantitativa se empleó para estimar la eficacia de cada vacunación, calculada como el nivel de reducción de la carga parasitaria de cada grupo vacunado en relación al grupo control. Todos los hámsters presentaron anticuerpos contra el antígeno crudo de *L. infantum* al final del estudio, hecho que se puede interpretar como que la infección se produjo en todos los individuos (Requena *et al.*, 2000).

La vacuna compuesta por las proteínas recombinantes no purificadas conteniendo rKMPII, rTRYP, rLACK y rpapLe22 no indujo un aumento significativo de la producción de NO en los macrófagos, y los niveles de anticuerpos específicos contra los antígenos recombinantes no pudieron ser detectados, de manera que no se consiguió demostrar inmunogenicidad. Tampoco a nivel histopatológico se observaron diferencias importantes post-infección en relación al grupo control, siendo las principales alteraciones esplénicas y hepáticas igual de frecuentes en ambos grupos. En este grupo no se detectó una reducción de la carga parasitaria, hecho que parece indicar que la vacuna no generó una respuesta inmunitaria protectora. El antígeno TRYP recombinante administrado como proteína sí fue protector contra *L. major* en el modelo de ratón (Campos-Neto *et al.*, 2001), sin embargo, el antígeno LACK recombinante administrado en ratones por vía intravenosa adelantó la aparición y la velocidad de crecimiento de las lesiones producidas por *L. amazonensis* (Okuno *et al.*, 2002). Es posible que la escasa capacidad de inducción de la respuesta celular o incluso la producción de citocinas T_H2 por parte de LACK o de alguno de los otros antígenos incluidos en la vacuna contribuyera al desarrollo de la infección en este grupo. En el perro, algunas vacunas de proteínas recombinantes, como la compuesta por rCPA y rCPB (Poot *et al.*, 2006) o la proteína quimera Leish-111f (Gradoni *et al.*, 2005; Moreno *et al.*, 2007) no han obtenido protección, aunque la segunda ha demostrado ser eficaz en ratón y hámster (Coler *et al.*, 2007). Las vacunas compuestas por proteínas recombinantes del parásito que han sido protectoras frente a la CanL han obtenido eficacias moderadas del 37 %–60 % (Moreno *et al.*, 2007; Fernandes *et al.*, 2008). La única que ha conseguido una protección elevada ha sido una vacuna compuesta por una proteína quimera de cuatro antígenos (Proteína Q) y BCG como adyuvante, la cual indujo una reducción de la carga parasitaria del 90 % (Molano *et al.*, 2003). Sin embargo, estudios recientes con una proteína similar a la Q empleando otros adyuvantes no han obtenido protección (Poot *et al.*, 2009).

La utilización de adyuvantes permite potenciar la respuesta obtenida por los antígenos, aunque algunas proteínas como HASPB1 han resultado ser protectoras sin adyuvante en modelos

murinos (Stager *et al.*, 2000). En el estudio 3 evaluamos la vacunación con proteínas recombinantes en forma de extracto crudo, conteniendo tanto las proteínas de *L. infantum* como los antígenos de *T. ni*. Debido a que se trata de una estrategia de vacunación innovadora y todavía poco estudiada, se desconoce si la utilización de los extractos crudos podría tener un efecto adyuvante o si, por el contrario, podría ser perjudicial e inducir reacciones adversas o autoanticuerpos contra proteínas conservadas presentes tanto en la larva como en el hospedador. De momento, los resultados apuntan a que el uso del extracto crudo es seguro y bien tolerado en diferentes especies —ratón, conejo y cerdo— y que consigue inducir inmunogenicidad y protección contra diversos agentes infecciosos (Ferrer *et al.*, 2007; Perez-Filgueira *et al.*, 2007, Perez-Martin, 2009). Por lo tanto, el uso directo de los extractos crudos de larva puede ser de gran utilidad en estudios preclínicos de vacunas, agilizando el proceso de obtención de antígenos y de evaluación de candidatos vacunales. En nuestro estudio, la segunda dosis de extracto crudo provocó la aparición de prurito en los hámsters, apuntando al desarrollo de una reacción de hipersensibilidad contra los antígenos de la larva. Esta reacción, que fue transitoria y leve, no había sido descrita en el resto de especies estudiadas, por lo que parece ser debida a las condiciones particulares de esta especie. Futuros estudios deberán evaluar el impacto que el uso del extracto crudo tiene sobre el sistema inmunológico, así como sus posibles efectos beneficiosos o perjudiciales en la inmunización.

A diferencia de la vacunación con proteína, la vacunación con DNA empleando los genes *KMP11*, *TRYP*, *LACK* y *papLe22* clonados en el plásmido pVAX1™ fue capaz de conferir protección en hámsters frente a *L. infantum*. La combinación de los 4 plásmidos vacunales logró reducir la carga parasitaria en bazo, principal órgano diana de la infección, de forma casi completa (90 %), aunque no disminuyó significativamente la carga parasitaria en sangre. Uno de los animales vacunados no presentó parásitos ni en bazo ni en sangre. En este grupo se detectaron anticuerpos contra el antígeno rLACK tras la vacunación, sugiriendo que la producción de al menos este antígeno ocurrió de manera satisfactoria *in vivo*. Además, en algunos de los hámsters se detectaron anticuerpos anti-rKMP11, anti-rLACK y anti-rpapLe22 post-infección. Un estudio realizado en hámsters describe la presencia de anticuerpos contra rKMP11 únicamente en aquellos animales resistentes a la infección por *L. infantum* (Requena *et al.*, 2000). Aunque el hámster que presentó anticuerpos contra rKMP11 presentó cierto grado de protección parasitológica, en nuestro estudio no observamos dicha asociación, ya que el animal que presentó ausencia de parásitos en sangre y en bazo no mostró anticuerpos anti-rKMP11. Tras la vacunación con DNA no se detectó un aumento significativo en la producción de NO por parte de los macrófagos, sin embargo, la protección parasitológica inducida por la vacuna parece indicar que ésta provocó el desarrollo de una respuesta T_h1 específica. La vacunación con DNA es una estrategia más adecuada que la de proteínas recombinantes contra las enfermedades infecciosas que requieren la inducción de una

respuesta celular para su protección (Huygen, 2005). Algunos estudios de vacunas de DNA en modelos experimentales describen una protección muy elevada frente a *L. donovani* empleando el antígeno KMPII (Basu *et al.*, 2005; Bhaumik *et al.*, 2009), pero sólo protección parcial frente a *L. infantum* empleando papLe22 (Fragaki *et al.*, 2001). En cambio, la vacunación con DNA empleando el antígeno LACK no había conseguido conferir protección frente a la VL murina (Melby *et al.*, 2001; Marques-da-Silva *et al.*, 2005). Respecto a TRYP, no se había ensayado como candidato aislado frente a la VL, pero frente a infección experimental con *L. major* resultó altamente protector en forma de DNA (Campos-Neto *et al.*, 2002).

Nuestro grupo ensayó el que hasta ahora es el único estudio de protección de una vacuna de DNA en perros infectados experimentalmente con *L. infantum* (Rodríguez-Cortes, 2002). La vacuna, que contenía los genes *KMPII*, *TRYP*, *LACK* y *gp63* fue inmunogénica pero no logró conferir protección, a pesar de compartir 3 de los 4 genes de la vacuna empleada en el estudio 3. Aunque las vacunas de DNA han demostrado una gran efectividad en modelos murinos, su aplicación en otras especies no ha conseguido niveles aceptables de protección (Gurunathan *et al.*, 2000). Para mejorar la efectividad de este tipo de vacunas se han propuesto y ensayado diversos procedimientos, como el *gene-gun* (Pertmer *et al.*, 1995), la electroporación (Luckay *et al.*, 2007) o el uso de micropartículas para transfectar APCs (Denis-Mize *et al.*, 2000). En los últimos años, la reestimulación de la respuesta inmunológica inducida por las vacunas de DNA mediante el uso de los mismos antígenos en vectores diferentes, conocida como estrategia *prime-boost*, ha permitido aumentar los niveles de inmunidad celular de forma muy significativa (Woodland, 2004). Este tipo de vacunas constituyen en la actualidad una de las herramientas más prometedoras para el control de enfermedades que requieren este tipo de respuesta (Radosevic *et al.*, 2009), tales como la malaria (Hill, 2006), la tuberculosis (McShane *et al.*, 2005), el sida (Robinson, 2007), o el cáncer (Harrop *et al.*, 2006; Madan *et al.*, 2007). Diversas de estas estrategias *prime-boost* ya han superado las fases preclínicas en animales y están siendo evaluadas en humanos.

En el estudio 3, la reestimulación del sistema inmunológico de los hámsters vacunados con DNA mediante el uso de extracto crudo conteniendo las proteínas recombinantes de *L. infantum* consiguió una elevada protección parasitológica tanto en bazo (86 %) como en sangre (99 %). En uno de los cinco animales no se detectó parasitismo en ninguno de los dos tejidos. En este grupo se produjo una inducción de la respuesta celular específica, la cual fue detectable a través de un aumento significativo de la producción de NO en los macrófagos. La inducción de esta molécula leishmanicida no se ha observado en los hámsters infectados por especies viscerotrópicas de *Leishmania* ni tampoco en los tratados (Bories *et al.*, 1998, Melby *et al.*, 1998, Melby *et al.*, 2001, Perez *et al.*, 2006), sin embargo, la vacuna *prime-boost* descrita en el estudio 3 y otras dos

vacunas protectoras ensayadas en hámster han conseguido estimular su producción (Basu *et al.*, 2005, Gomes *et al.*, 2008). Este hecho pone de manifiesto que una potente respuesta celular específica es capaz de controlar la carga parasitaria en el hámster infectado. En este sentido, se han observado elevadas cargas parasitarias en hámsters infectados en los que no se ha detectado actividad de iNOS (Melby *et al.*, 2001) y se ha descrito una correlación negativa entre la carga parasitaria y la linfoproliferación específica (Riça-Capela *et al.*, 2003). Por otra parte, las concentraciones de IgG anti-*Leishmania* fueron significativamente más bajas en este grupo que en el grupo control, reflejando o bien una menor carga parasitaria o bien una redirección de la respuesta T_H2 hacia una T_H1 . De acuerdo con nuestros resultados, las concentraciones de anticuerpos específicos se han correlacionado con la carga parasitaria en hámsters infectados experimentalmente por *L. infantum* (Riça-Capela *et al.*, 2003).

Es importante destacar que ciertas alteraciones histopatológicas fueron significativamente menos frecuentes en los grupos vacunados con DNA (DNA o DNA-Prot) que en el grupo control. Los resultados sugieren que la vacunación con DNA previno el desarrollo de la hiperplasia en los folículos linfoides del bazo, un hallazgo seguramente asociado a la proliferación aberrante de los linfocitos B y al elevado nivel de anticuerpos que se observa durante el desarrollo de la enfermedad (Requena *et al.*, 2000). Sin embargo, sólo los animales que recibieron el *boost* con proteínas sufrieron con menor frecuencia la presencia de infiltrado inflamatorio periportal en el hígado, una característica histopatológica descrita tanto en los hámsters (Riça-Capela *et al.*, 2003) como en los perros enfermos (Giunchetti *et al.*, 2008). En conclusión, los resultados sugieren que la vacuna de DNA-Prot evitó el desarrollo de las respuestas inmunológicas relacionadas con la patogenia en bazo e hígado.

Diversos estudios han ensayado en los últimos años estrategias de vacunación *prime-boost*, no sólo en modelos murinos sino también en el perro. Mientras que, como se ha mencionado, la vacunación en ratón con DNA conteniendo el antígeno LACK no había demostrado eficacia (Melby *et al.*, 2001; Marques-da-Silva *et al.*, 2005) la estrategia *prime-boost* ha logrado conferir elevados grados de protección contra la VL (Dondji *et al.*, 2005). En perros, este tipo de vacuna resultó protectora pero con una eficacia de sólo el 60 % (Ramiro *et al.*, 2003). Es posible que el antígeno LACK administrado de manera aislada no sea protector frente a la VL, aún en estrategias de *prime-boost*. En este sentido, los estudios con rLACK en perro descritos en los estudios 1 y 2 detectaron una baja inmunogenicidad humoral y celular de este antígeno en los animales infectados de manera natural (42 % de seroprevalencia, 19 % de animales con respuesta DTH positiva). Recientemente, la vacunación *prime-boost* empleando el antígeno TRYP en perros consiguió inducir una potente respuesta celular, superior a la del antígeno LACK (Carson *et al.*, 2009a), hecho que concuerda con la inmunogenicidad de estos antígenos en los perros infectados

de forma natural (estudio 2). También un estudio de vacuna *prime-boost* combinando CPA y CPB consiguió una protección del 100 % en ratón y del 80 % en perro (Rafati *et al.*, 2005; Rafati *et al.*, 2006), superior a la obtenida sólo con el antígeno LACK. Seguramente, la vacunación con múltiples antígenos produce un efecto aditivo y es capaz de inducir mayores niveles de protección que la vacunación mediante un solo antígeno. Sin embargo, la protección inducida por los antígenos puede variar de manera importante según la estrategia vacunal empleada, seguramente debido a factores como el papel que estos antígenos juegan durante la infección natural y la capacidad de la estrategia elegida para inducir una respuesta T_h1 contra ellos. La elevada protección observada en el modelo de hámster mediante la estrategia *prime-boost* conteniendo los antígenos KMP11, TRYP, LACK y papLe22 sugiere que esta vacuna podría ser eficaz en el control de la infección en el perro, el reservorio peridoméstico más importante de la zoonosis causada por *L. infantum*.

BIBLIOGRAFÍA

- Antonelli, L. R., Dutra, W. O., Almeida, R. P., Bacellar, O., and Gollob, K. J. (2004): Antigen specific correlations of cellular immune responses in human leishmaniasis suggests mechanisms for immunoregulation. *Clin Exp Immunol* 136, 341-8.
- Azeredo-Coutinho, R. B., Matos, D. C., Armoa, G. G., Maia, R. M., Schubach, A., Mayrink, W., and Mendonca, S. C. (2008): Contrasting human cytokine responses to promastigote whole-cell extract and the *Leishmania* analogue receptor for activated C kinase antigen of *L. amazonensis* in natural infection versus immunization. *Clin Exp Immunol* 153, 369-75.
- Barderas, M. G., Wigdorovitz, A., Merelo, F., Beitia, F., Alonso, C., Borca, M. V., and Escribano, J. M. (2000): Serodiagnosis of African swine fever using the recombinant protein p30 expressed in insect larvae. *J Virol Methods* 89, 129-36.
- Barderas, M. G., Rodriguez, F., Gomez-Puertas, P., Aviles, M., Beitia, F., Alonso, C., and Escribano, J. M. (2001): Antigenic and immunogenic properties of a chimera of two immunodominant African swine fever virus proteins. *Arch Virol* 146, 1681-91.
- Basu, R., Bhaumik, S., Basu, J. M., Naskar, K., De, T., and Roy, S. (2005): Kinetoplastid membrane protein-11 DNA vaccination induces complete protection against both pentavalent antimonial-sensitive and -resistant strains of *Leishmania donovani* that correlates with inducible nitric oxide synthase activity and IL-4 generation: evidence for mixed Th1- and Th2-like responses in visceral leishmaniasis. *J Immunol* 174, 7160-71.
- Basu, R., Roy, S., and Walden, P. (2007): HLA class I-restricted T cell epitopes of the kinetoplastid membrane protein-11 presented by *Leishmania donovani*-infected human macrophages. *J Infect Dis* 195, 1373-80.
- Berberich, C., Requena, J. M., and Alonso, C. (1997): Cloning of genes and expression and antigenicity analysis of the *Leishmania infantum* KMP-11 protein. *Exp Parasitol* 85, 105-8.
- Bhaumik, S., Basu, R., Sen, S., Naskar, K., and Roy, S. (2009): KMP-11 DNA immunization significantly protects against *L. donovani* infection but requires exogenous IL-12 as an adjuvant for comparable protection against *L. major*. *Vaccine* 27, 1306-16.
- Bories C., Coffin C., Mathieu D., Bories P.N., Scherman E., Rivollet D., Deniau M. (1998) Lack of a nitric-oxide response during the course of *Leishmania infantum* infection in the golden hamster (*Mesocricetus auratus*), with or without treatment with liposomal amphotericin B. *Ann Trop Med Parasitol* 92, 685-92.
- Borja-Cabrera, G. P., Correia Pontes, N. N., da Silva, V. O., Paraguai de Souza, E., Santos, W. R., Gomes, E. M., Luz, K. G., Palatnik, M., and Palatnik de Sousa, C. B. (2002): Long lasting protection against canine kala-azar using the FML-QuilA saponin vaccine in an endemic area of Brazil (Sao Gonçalo do Amarante, RN). *Vaccine* 20, 3277-84.
- Borja-Cabrera, G. P., Cruz Mendes, A., Paraguai de Souza, E., Hashimoto Okada, L. Y., de, A. T. F. A., Kawasaki, J. K., Costa, A. C., Reis, A. B., Genaro, O., Batista, L. M., Palatnik, M., and Palatnik-de-Sousa, C. B. (2004): Effective immunotherapy against canine visceral leishmaniasis with the FML-vaccine. *Vaccine* 22, 2234-43.
- Bottrel, R. L., Dutra, W. O., Martins, F. A., Gontijo, B., Carvalho, E., Barral-Netto, M., Barral, A., Almeida, R. P., Mayrink, W., Locksley, R., and Gollob, K. J. (2001): Flow cytometric determination of cellular sources and frequencies of key cytokine-producing lymphocytes directed against recombinant LACK and soluble *Leishmania* antigen in human cutaneous leishmaniasis. *Infect Immun* 69, 3232-9.
- Bourreau, E., Collet, M., Prevot, G., Milon, G., Ashimoff, D., Hasagewa, H., Parra-Lopez, C., and Launois, P. (2002a): IFN-gamma-producing CD45RA+CD8+ and IL-10-producing CD45RA-CD4+ T cells generated in response to LACK in naive subjects never exposed to *Leishmania*. *Eur J Immunol* 32, 510-20.
- Bourreau, E., Prevot, G., Gardon, J., Pradinaud, R., Hasagewa, H., Milon, G., and Launois, P. (2002b): LACK-specific CD4(+) T cells that induce gamma interferon production in patients with localized cutaneous leishmaniasis during an early stage of infection. *Infect Immun* 70, 3122-9.
- Burns, J. M., Jr., Shreffler, W. G., Benson, D. R., Ghalib, H. W., Badaro, R., and Reed, S. G. (1993): Molecular characterization of a kinesin-related antigen of *Leishmania chagasi* that detects specific antibody in African and American visceral leishmaniasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 775-9.
- Campos-Neto, A., Porrozzi, R., Greeson, K., Coler, R. N., Webb, J. R., Seiky, Y. A., Reed, S. G., and Grimaldi, G., Jr. (2001): Protection against cutaneous leishmaniasis induced by recombinant antigens in murine and nonhuman primate models of the human disease. *Infect Immun* 69, 4103-8.

- Campos-Neto, A., Webb, J. R., Greeson, K., Coler, R. N., Skeiky, Y. A., and Reed, S. G.** (2002): Vaccination with plasmid DNA encoding TSA/LmST11 leishmanial fusion proteins confers protection against *Leishmania major* infection in susceptible BALB/c mice. *Infect Immun* 70, 2828-36.
- Campos-Neto, A.** (2005): What about Th1/Th2 in cutaneous leishmaniasis vaccine discovery? *Braz J Med Biol Res* 38, 979-84.
- Cardoso, L., Neto, F., Sousa, J. C., Rodrigues, M., and Cabral, M.** (1998): Use of a leishmanin skin test in the detection of canine *Leishmania*-specific cellular immunity. *Vet Parasitol* 79, 213-20.
- Carrillo, E., Ahmed, S., Goldsmith-Pestana, K., Nieto, J., Osorio, Y., Travi, B., Moreno, J., and McMahon-Pratt, D.** (2007): Immunogenicity of the P-8 amastigote antigen in the experimental model of canine visceral leishmaniasis. *Vaccine* 25, 1534-43.
- Carrillo, E., Crusat, M., Nieto, J., Chicharro, C., Thomas Mdel, C., Martinez, E., Valladares, B., Canavate, C., Requena, J. M., Lopez, M. C., Alvar, J., and Moreno, J.** (2008): Immunogenicity of HSP-70, KMP-11 and PFR-2 leishmanial antigens in the experimental model of canine visceral leishmaniasis. *Vaccine* 26, 1902-11.
- Carrillo, E., and Moreno, J.** (2009): Cytokine profiles in canine visceral leishmaniasis. *Vet Immunol Immunopathol* 128, 67-70.
- Carson, C., Antoniou, M., Christodoulou, V., Messaritakis, I., Quinnell, R. J., Blackwell, J. M., and Courtenay, O.** (2009a): Selection of appropriate serological tests to measure the incidence of natural *Leishmania infantum* infection during DNA/MVA prime/boost canine vaccine trials. *Vet Parasitol.* 162, 207-13.
- Carson, C., Antoniou, M., Ruiz-Arguello, M. B., Alcami, A., Christodoulou, V., Messaritakis, I., Blackwell, J. M., and Courtenay, O.** (2009b): A prime/boost DNA/Modified vaccinia virus Ankara vaccine expressing recombinant *Leishmania* DNA encoding TRYP is safe and immunogenic in outbred dogs, the reservoir of zoonotic visceral leishmaniasis. *Vaccine* 27, 1080-6.
- Carvalho, L. P., Passos, S., Dutra, W. O., Soto, M., Alonso, C., Gollob, K. J., Carvalho, E. M., and Ribeiro de Jesus, A.** (2005): Effect of LACK and KMP11 on IFN-gamma production by peripheral blood mononuclear cells from cutaneous and mucosal leishmaniasis patients. *Scand J Immunol* 61, 337-42.
- Coelho, E. A., Tavares, C. A., Carvalho, F. A., Chaves, K. F., Teixeira, K. N., Rodrigues, R. C., Charest, H., Matlashewski, G., Gazzinelli, R. T., and Fernandes, A. P.** (2003): Immune responses induced by the *Leishmania (Leishmania) donovani* A2 antigen, but not by the LACK antigen, are protective against experimental *Leishmania (Leishmania) amazonensis* infection. *Infect Immun* 71, 3988-94.
- Coler, R. N., and Reed, S. G.** (2005): Second-generation vaccines against leishmaniasis. *Trends Parasitol* 21, 244-9.
- Coler, R. N., Goto, Y., Bogatzki, L., Raman, V., and Reed, S. G.** (2007): Leish-111f, a recombinant polyprotein vaccine that protects against visceral Leishmaniasis by elicitation of CD4+ T cells. *Infect Immun* 75, 4648-54.
- Chang, K. P., Reed, S. G., McGwire, B. S., and Soong, L.** (2003): *Leishmania* model for microbial virulence: the relevance of parasite multiplication and pathoantigenicity. *Acta Trop* 85, 375-90.
- Chappuis, F., Sundar, S., Hailu, A., Ghalib, H., Rijal, S., Peeling, R. W., Alvar, J., and Boelaert, M.** (2007): Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? *Nat Rev Microbiol* 5, 873-82.
- da Costa, R. T., Franca, J. C., Mayrink, W., Nascimento, E., Genaro, O., and Campos-Neto, A.** (2003): Standardization of a rapid immunochromatographic test with the recombinant antigens K39 and K26 for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 97, 678-82.
- Dantas-Torres, F., and Brandao-Filho, S. P.** (2006): Visceral leishmaniasis in Brazil: revisiting paradigms of epidemiology and control. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 48, 151-6.
- de Carvalho, L. P., Soto, M., Jeronimo, S., Dondji, B., Bacellar, O., Luz, V., Orge Orge, G., Alonso, C., Jesus, A. R., and Carvalho, E. M.** (2003): Characterization of the immune response to *Leishmania infantum* recombinant antigens. *Microbes Infect* 5, 7-12.
- Delgado, G., Parra-Lopez, C. A., Vargas, L. E., Hoya, R., Estupinan, M., Guzman, F., Torres, A., Alonso, C., Velez, I. D., Spinel, C., and Patarroyo, M. E.** (2003): Characterizing cellular immune response to kinetoplastid membrane protein-11 (KMP-11) during *Leishmania (Viannia) panamensis* infection using dendritic cells (DCs) as antigen presenting cells (APCs). *Parasite Immunol* 25, 199-209.
- Denis-Mize, K. S., Dupuis, M., MacKichan, M. L., Singh, M., Doe, B., O'Hagan, D., Ulmer, J. B., Donnelly, J. J., McDonald, D. M., and Ott, G.** (2000): Plasmid DNA adsorbed onto cationic microparticles mediates target gene expression and antigen presentation by dendritic cells. *Gene Ther* 7, 2105-12.

- Dondji, B., Perez-Jimenez, E., Goldsmith-Pestana, K., Esteban, M., and McMahon-Pratt, D. (2005): Heterologous prime-boost vaccination with the LACK antigen protects against murine visceral leishmaniasis. *Infect Immun* 73, 5286-9.
- Dos-Santos, W. L., Jesus, E. E., Paranhos-Silva, M., Pereira, A. M., Santos, J. C., Baleeiro, C. O., Nascimento, E. G., Moreira, E. D., Oliveira, G. G., and Pontes-de-Carvalho, L. C. (2008): Associations among immunological, parasitological and clinical parameters in canine visceral leishmaniasis: Emaciation, spleen parasitism, specific antibodies and leishmanin skin test reaction. *Vet Immunol Immunopathol* 123, 251-9.
- Dye, C. (1996): The logic of visceral leishmaniasis control. *Am J Trop Med Hyg* 55, 125-30.
- Fernandes, A. P., Costa, M. M., Coelho, E. A., Michalick, M. S., de Freitas, E., Melo, M. N., Luiz Tafuri, W., Resende Dde, M., Hermont, V., Abrantes Cde, F., and Gazzinelli, R. T. (2008): Protective immunity against challenge with *Leishmania (Leishmania) chagasi* in beagle dogs vaccinated with recombinant A2 protein. *Vaccine* 26, 5888-95.
- Fernandez-Bellon, H., Solano-Gallego, L., Rodriguez, A., Rutten, V. P., Hoek, A., Ramis, A., Alberola, J., and Ferrer, L. (2005): Comparison of three assays for the evaluation of specific cellular immunity to *Leishmania infantum* in dogs. *Vet Immunol Immunopathol* 107, 163-9.
- Ferrer, F., Zoth, S. C., Calamante, G., and Taboga, O. (2007): Induction of virus-neutralizing antibodies by immunization with *Rachiplusia nu* per os infected with a recombinant baculovirus expressing the E2 glycoprotein of bovine viral diarrhea virus. *J Virol Methods* 146, 424-7.
- Fragaki, K., Suffia, I., Ferrua, B., Rousseau, D., Le Fichoux, Y., and Kubar, J. (2001): Immunisation with DNA encoding *Leishmania infantum* protein papLe22 decreases the frequency of parasitemic episodes in infected hamsters. *Vaccine* 19, 1701-9.
- Fujiwara, R. T., Vale, A. M., Franca da Silva, J. C., da Costa, R. T., Quetz Jda, S., Martins Filho, O. A., Reis, A. B., Correa Oliveira, R., Machado-Coelho, G. L., Bueno, L. L., Bethony, J. M., Frank, G., Nascimento, E., Genaro, O., Mayrink, W., Reed, S., and Campos-Neto, A. (2005): Immunogenicity in dogs of three recombinant antigens (TSA, LeIF and LmST11) potential vaccine candidates for canine visceral leishmaniasis. *Vet Res* 36, 827-38.
- Giunchetti, R. C., Mayrink, W., Carneiro, C. M., Correa-Oliveira, R., Martins-Filho, O. A., Marques, M. J., Tafuri, W. L., and Reis, A. B. (2008): Histopathological and immunohistochemical investigations of the hepatic compartment associated with parasitism and serum biochemical changes in canine visceral leishmaniasis. *Res Vet Sci* 84, 269-77.
- Gomes, R., Teixeira, C., Teixeira, M. J., Oliveira, F., Menezes, M. J., Silva, C., de Oliveira, C. I., Miranda, J. C., Elnaiem, D. E., Kamhawi, S., Valenzuela, J. G., and Brodskyn, C. I. (2008): Immunity to a salivary protein of a sand fly vector protects against the fatal outcome of visceral leishmaniasis in a hamster model. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 7845-50.
- Gomes, Y. M., Paiva Cavalcanti, M., Lira, R. A., Abath, F. G., and Alves, L. C. (2008): Diagnosis of canine visceral leishmaniasis: biotechnological advances. *Vet J* 175, 45-52.
- Gomez-Ochoa, P., Castillo, J. A., Gascon, M., Zarate, J. J., Alvarez, F., and Couto, C. G. (2009): Use of domperidone in the treatment of canine visceral leishmaniasis: a clinical trial. *Vet J* 179, 259-63.
- Gomez-Sebastian, S., Perez-Filgueira, D. M., Gomez-Casado, E., Nunez, M. C., Sanchez-Ramos, I., Tabares, E., and Escribano, J. M. (2008): DIVA diagnostic of Aujeszky's disease using an insect-derived virus glycoprotein E. *J Virol Methods* 153, 29-35.
- Goto, Y., Howard, R. F., Bhatia, A., Trigo, J., Nakatani, M., Netto, E. M., and Reed, S. G. (2009): Distinct antigen recognition pattern during zoonotic visceral leishmaniasis in humans and dogs. *Vet Parasitol* 160, 215-20.
- Gradoni, L., Foglia Manzillo, V., Pagano, A., Piantedosi, D., De Luna, R., Gramiccia, M., Scalone, A., Di Muccio, T., and Oliva, G. (2005): Failure of a multi-subunit recombinant leishmanial vaccine (MML) to protect dogs from *Leishmania infantum* infection and to prevent disease progression in infected animals. *Vaccine* 23, 5245-51.
- Gurunathan, S., Klinman, D. M., and Seder, R. A. (2000): DNA vaccines: immunology, application, and optimization. *Annu Rev Immunol* 18, 927-74.
- Harrop, R., John, J., and Carroll, M. W. (2006): Recombinant viral vectors: cancer vaccines. *Adv Drug Deliv Rev* 58, 931-47.
- Hill, A. V. (2006): Pre-erythrocytic malaria vaccines: towards greater efficacy. *Nat Rev Immunol* 6, 21-32.
- Huygen, K. (2005): Plasmid DNA vaccination. *Microbes Infect* 7, 932-8.
- Jardim, A., Funk, V., Caprioli, R. M., and Olafson, R. W. (1995): Isolation and structural characterization of the *Leishmania donovani* kinetoplastid membrane protein-11, a major immunoreactive membrane glycoprotein. *Biochem J* 305 (Pt 1), 307-13.

- Jensen, A. T., Gasim, S., Ismail, A., Gaafar, A., Kurtzhals, J. A., Kemp, M., El Hassan, A. M., Kharazmi, A., and Theander, T. G. (1998): Humoral and cellular immune responses to synthetic peptides of the *Leishmania donovani* kinetoplastid membrane protein-11. *Scand J Immunol* 48, 103-9.
- Julia, V., Rassoulzadegan, M., and Glaichenhaus, N. (1996): Resistance to *Leishmania major* induced by tolerance to a single antigen. *Science* 274, 421-3.
- Julia, V., and Glaichenhaus, N. (1999): CD4(+) T cells which react to the *Leishmania major* LACK antigen rapidly secrete interleukin-4 and are detrimental to the host in resistant B10.D2 mice. *Infect Immun* 67, 3641-4.
- Kamoun-Essghaier, S., Guizani, I., Strub, J. M., Van Dorselaer, A., Mabrouk, K., Ouelhazi, L., and Dellagi, K. (2005): Proteomic approach for characterization of immunodominant membrane-associated 30- to 36-kiloDalton fraction antigens of *Leishmania infantum* promastigotes, reacting with sera from Mediterranean visceral leishmaniasis patients. *Clin Diagn Lab Immunol* 12, 310-20.
- Kemp, M., Kurtzhals, J. A., Bendtzen, K., Poulsen, L. K., Hansen, M. B., Koech, D. K., Kharazmi, A., and Theander, T. G. (1993): *Leishmania donovani*-reactive Th1- and Th2-like T-cell clones from individuals who have recovered from visceral leishmaniasis. *Infect Immun* 61, 1069-73.
- Khamesipour, A., Rafati, S., Davoudi, N., Maboudi, F., and Modabber, F. (2006): Leishmaniasis vaccine candidates for development: a global overview. *Indian J Med Res* 123, 423-38.
- Kost, T. A., Condreay, J. P., and Jarvis, D. L. (2005): Baculovirus as versatile vectors for protein expression in insect and mammalian cells. *Nat Biotechnol* 23, 567-75.
- Kubar, J., and Fragaki, K. (2005): Recombinant DNA-derived leishmania proteins: from the laboratory to the field. *Lancet Infect Dis* 5, 107-14.
- Kubar, J., and Fragaki, K. (2006): *Leishmania* proteins derived from recombinant DNA: current status and next steps. *Trends Parasitol* 22, 111-6.
- Kurtzhals, J. A., Hey, A. S., Jardim, A., Kemp, M., Schaefer, K. U., Odera, E. O., Christensen, C. B., Githure, J. I., Olafson, R. W., Theander, T. G., and et al. (1994): Dichotomy of the human T cell response to *Leishmania* antigens. II. Absent or Th2-like response to gp63 and Th1-like response to lipophosphoglycan-associated protein in cells from cured visceral leishmaniasis patients. *Clin Exp Immunol* 96, 416-21.
- Launois, P., Maillard, I., Pingel, S., Swihart, K. G., Xenarios, I., Acha-Orbea, H., Diggelmann, H., Locksley, R. M., MacDonald, H. R., and Louis, J. A. (1997): IL-4 rapidly produced by V beta 4 V alpha 8 CD4+ T cells instructs Th2 development and susceptibility to *Leishmania major* in BALB/c mice. *Immunity* 6, 541-9.
- Lemos, E. M., Laurenti, M. D., Moreira, M. A., Reis, A. B., Giunchetti, R. C., Raychaudhuri, S., and Dietze, R. (2008): Canine visceral leishmaniasis: performance of a rapid diagnostic test (Kalazar Detect) in dogs with and without signs of the disease. *Acta Trop* 107, 205-7.
- Luckay, A., Sidhu, M. K., Kjekouk, R., Megati, S., Chong, S. Y., Roopchand, V., Garcia-Hand, D., Abdullah, R., Braun, R., Montefiori, D. C., Rosati, M., Felber, B. K., Pavlakis, G. N., Mathiesen, I., Israel, Z. R., Eldridge, J. H., and Egan, M. A. (2007): Effect of plasmid DNA vaccine design and in vivo electroporation on the resulting vaccine-specific immune responses in rhesus macaques. *J Virol* 81, 5257-69.
- Maalej, I. A., Chenik, M., Louzir, H., Ben Salah, A., Bahloul, C., Amri, F., and Dellagi, K. (2003): Comparative evaluation of ELISAs based on ten recombinant or purified *Leishmania* antigens for the serodiagnosis of Mediterranean visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* 68, 312-20.
- Maasho, K., Satti, I., Nylen, S., Guzman, G., Koning, F., and Akuffo, H. (2000): A *Leishmania* homologue of receptors for activated C-kinase (LACK) induces both interferon-gamma and interleukin-10 in natural killer cells of healthy blood donors. *J Infect Dis* 182, 570-8.
- Maasho, K., Wolday, D., Edjigu, M., Soderstrom, K., Britton, S., and Akuffo, H. (2001): Induction and abrogation of LACK reactive cells in the evolution of human leishmaniasis. *Clin Exp Immunol* 124, 255-61.
- Madan, R. A., Arlen, P. M., and Gulley, J. L. (2007): PANVAC-VF: poxviral-based vaccine therapy targeting CEA and MUC1 in carcinoma. *Expert Opin Biol Ther* 7, 543-54.
- Maia, C., and Campino, L. (2008): Methods for diagnosis of canine leishmaniasis and immune response to infection. *Vet Parasitol* 158, 274-87.
- Manna, L., Gravino, A. E., Picillo, E., Decaro, N., and Buonavoglia, C. (2008): *Leishmania* DNA quantification by real-time PCR in naturally infected dogs treated with miltefosine. *Ann N Y Acad Sci* 1149, 358-60.
- Marques-da-Silva, E. A., Coelho, E. A., Gomes, D. C., Vilela, M. C., Masioli, C. Z., Tavares, C. A., Fernandes, A. P., Afonso, L. C., and Rezende, S. A. (2005): Intramuscular immunization with p36(LACK) DNA vaccine induces IFN-gamma production but does not protect BALB/c mice against *Leishmania chagasi* intravenous challenge. *Parasitol Res* 98, 67-74.

- McShane, H., Pathan, A. A., Sander, C. R., Goonetilleke, N. P., Fletcher, H. A., and Hill, A. V.** (2005): Boosting BCG with MVA85A: the first candidate subunit vaccine for tuberculosis in clinical trials. *Tuberculosis (Edinb)* 85, 47-52.
- Melby, P. C., Tryon, V. V., Chandrasekar, B., and Freeman, G. L.** (1998): Cloning of Syrian hamster (*Mesocricetus auratus*) cytokine cDNAs and analysis of cytokine mRNA expression in experimental visceral leishmaniasis. *Infect Immun* 66, 2135-42.
- Melby, P. C., Yang, J., Zhao, W., Perez, L. E., and Cheng, J.** (2001): *Leishmania donovani* p36(LACK) DNA vaccine is highly immunogenic but not protective against experimental visceral leishmaniasis. *Infect Immun* 69, 4719-25.
- Mettler, M., Grimm, F., Capelli, G., Camp, H., and 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, 5515-9.
- Mehlitz D.** (1979): Trypanosome infections in domestic animals in Liberia. *Tropenmed Parasitol* 1979 30, 212-9.
- Minter D.M.** (1976): Epidemiology of Chagas' disease. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 70, 124.
- Molano, I., Alonso, M. G., Miron, C., Redondo, E., Requena, J. M., Soto, M., Nieto, C. G., and Alonso, C.** (2003): A *Leishmania infantum* multi-component antigenic protein mixed with live BCG confers protection to dogs experimentally infected with *L. infantum*. *Vet Immunol Immunopathol* 92, 1-13.
- Morales, G., Carrillo, G., Requena, J. M., Guzman, F., Gomez, L. C., Patarroyo, M. E., and Alonso, C.** (1997): Mapping of the antigenic determinants of the *Leishmania infantum* gp63 protein recognized by antibodies elicited during canine visceral leishmaniasis. *Parasitology* 114 (Pt 6), 507-16.
- Moreira, E. D., Jr., Mendes de Souza, V. M., Sreenivasan, M., Nascimento, E. G., and Pontes de Carvalho, L.** (2004): Assessment of an optimized dog-culling program in the dynamics of canine *Leishmania* transmission. *Vet Parasitol* 122, 245-52.
- Moreno, J., Nieto, J., Masina, S., Canavate, C., Cruz, I., Chicharro, C., Carrillo, E., Napp, S., Reymond, C., Kaye, P. M., Smith, D. F., Fasel, N., and Alvar, J.** (2007): Immunization with H1, HASPB1 and MML *Leishmania* proteins in a vaccine trial against experimental canine leishmaniasis. *Vaccine* 25, 5290-300.
- Nakhaee, A., Taheri, T., Taghikhani, M., Mohebbali, M., Salmanian, A. H., Fasel, N., and Rafati, S.** (2004): Humoral and cellular immune responses against Type I cysteine proteinase of *Leishmania infantum* are higher in asymptomatic than symptomatic dogs selected from a naturally infected population. *Vet Parasitol* 119, 107-23.
- Nieto, C. G., Garcia-Alonso, M., Requena, J. M., Miron, C., Soto, M., Alonso, C., and Navarrete, I.** (1999): Analysis of the humoral immune response against total and recombinant antigens of *Leishmania infantum*: correlation with disease progression in canine experimental leishmaniasis. *Vet Immunol Immunopathol* 67, 117-30.
- Nylen, S., and Sacks, D.** (2007): Interleukin-10 and the pathogenesis of human visceral leishmaniasis. *Trends Immunol* 28, 378-84.
- Okuno, T., Takeuchi, M., Matsumoto, Y., Otsuka, H., and Matsumoto, Y.** (2002): Pretreatment of leishmania homologue of receptors for activated C kinase (LACK) promotes disease progression caused by *Leishmania amazonensis*. *Exp Anim* 51, 335-41.
- Palatnik-de-Sousa, C. B.** (2008): Vaccines for leishmaniasis in the fore coming 25 years. *Vaccine* 26, 1709-24.
- Perez, L. E., Chandrasekar, B., Saldarriaga, O. A., Zhao, W., Arteaga, L. T., Travi, B. L., and Melby, P. C.** (2006): Reduced nitric oxide synthase 2 (NOS2) promoter activity in the Syrian hamster renders the animal functionally deficient in NOS2 activity and unable to control an intracellular pathogen. *J Immunol* 176, 5519-28.
- Perez-Filgueira, D. M., Resino-Talavan, P., Cubillos, C., Angulo, I., Barderas, M. G., Barcena, J., and Escribano, J. M.** (2007): Development of a low-cost, insect larvae-derived recombinant subunit vaccine against RHDV. *Virology* 364, 422-30.
- Perez-Martin, E., Grau-Roma, L., Argilaguuet, J. M., Nofrarias, M., Escribano, J. M., Gomez-Sebastian, S., Segales, J., and Rodriguez, F.** (2008): Development of two *Trichoplusia ni* larvae-derived ELISAs for the detection of antibodies against replicase and capsid proteins of porcine circovirus type 2 in domestic pigs. *J Virol Methods* 154, 167-74.
- Perez-Martin, E.** (2009) Development of new methodologies for the study of pathogenesis and control of porcine circovirus type 2 (PCV2) infection. Doctoral Thesis. Centre de Recerca en Sanitat Animal (CRESA), Universitat Autònoma de Barcelona.

- Pertmer, T. M., Eisenbraun, M. D., McCabe, D., Prayaga, S. K., Fuller, D. H., and Haynes, J. R.** (1995): Gene gun-based nucleic acid immunization: elicitation of humoral and cytotoxic T lymphocyte responses following epidermal delivery of nanogram quantities of DNA. *Vaccine* 13, 1427-30.
- Pinelli, E., Killick-Kendrick, R., Wagenaar, J., Bernadina, W., del Real, G., and Ruitenbergh, J.** (1994): Cellular and humoral immune responses in dogs experimentally and naturally infected with *Leishmania infantum*. *Infect Immun* 62, 229-35.
- Pinheiro, P. H., Pinheiro, A. N., Ferreira, J. H., Costa, F. A., Katz, S., and Barbieri, C. L.** (2009): A recombinant cysteine proteinase from *Leishmania (Leishmania) chagasi* as an antigen for delayed-type hypersensitivity assays and serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. *Vet Parasitol* 162, 32-9.
- Poot, J., Spreuwenberg, K., Sanderson, S. J., Schijns, V. E., Mottram, J. C., Coombs, G. H., and Vermeulen, A. N.** (2006): Vaccination with a preparation based on recombinant cysteine peptidases and canine IL-12 does not protect dogs from infection with *Leishmania infantum*. *Vaccine* 24, 2460-8.
- Poot, J., Janssen, L. H., van Kasteren-Westerneng, T. J., van der Heijden-Liefkens, K. H., Schijns, V. E., and Heckerroth, A.** (2009): Vaccination of dogs with six different candidate leishmaniasis vaccines composed of a chimerical recombinant protein containing ribosomal and histone protein epitopes in combination with different adjuvants. *Vaccine* 27, 4439-46.
- Porrozi, R., Santos da Costa, M. V., Teva, A., Falqueto, A., Ferreira, A. L., dos Santos, C. D., Fernandes, A. P., Gazzinelli, R. T., Campos-Neto, A., and Grimaldi, G., Jr.** (2007): Comparative evaluation of enzyme-linked immunosorbent assays based on crude and recombinant leishmanial antigens for serodiagnosis of symptomatic and asymptomatic *Leishmania infantum* visceral infections in dogs. *Clin Vaccine Immunol* 14, 544-8.
- Radosevic, K., Rodriguez, A., Lemckert, A., and Goudsmit, J.** (2009): Heterologous prime-boost vaccinations for poverty-related diseases: advantages and future prospects. *Expert Rev Vaccines* 8, 577-92.
- Rafati, S., Nakhaee, A., Taheri, T., Ghashghaii, A., Salmanian, A. H., Jimenez, M., Mohebbali, M., Masina, S., and Fasel, N.** (2003): Expression of cysteine proteinase type I and II of *Leishmania infantum* and their recognition by sera during canine and human visceral leishmaniasis. *Exp Parasitol* 103, 143-51.
- Rafati, S., Nakhaee, A., Taheri, T., Taslimi, Y., Darabi, H., Eravani, D., Sanos, S., Kaye, P., Taghikhani, M., Jamshidi, S., and Rad, M. A.** (2005): Protective vaccination against experimental canine visceral leishmaniasis using a combination of DNA and protein immunization with cysteine proteinases type I and II of *L. infantum*. *Vaccine* 23, 3716-25.
- Rafati, S., Zahedifard, F., and Nazgouee, F.** (2006): Prime-boost vaccination using cysteine proteinases type I and II of *Leishmania infantum* confers protective immunity in murine visceral leishmaniasis. *Vaccine* 24, 2169-75.
- Ramirez, J. R., Berberich, C., Jaramillo, A., Alonso, C., and Velez, I. V.** (1998): Molecular and antigenic characterization of the *Leishmania (Viannia) panamensis* kinetoplastid membrane protein-11. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 93, 247-54.
- Ramiro, M. J., Zarate, J. J., Hanke, T., Rodriguez, D., Rodriguez, J. R., Esteban, M., Lucientes, J., Castillo, J. A., and Larraga, V.** (2003): Protection in dogs against visceral leishmaniasis caused by *Leishmania infantum* is achieved by immunization with a heterologous prime-boost regime using DNA and vaccinia recombinant vectors expressing LACK. *Vaccine* 21, 2474-84.
- Ramos, I., Alonso, A., Marcen, J. M., Peris, A., Castillo, J. A., Colmenares, M., and Larraga, V.** (2008): Heterologous prime-boost vaccination with a non-replicative vaccinia recombinant vector expressing LACK confers protection against canine visceral leishmaniasis with a predominant Th1-specific immune response. *Vaccine* 26, 333-44.
- Requena, J. M., Soto, M., Doria, M. D., and Alonso, C.** (2000): Immune and clinical parameters associated with *Leishmania infantum* infection in the golden hamster model. *Vet Immunol Immunopathol* 76, 269-81.
- Rhalem, A., Sahibi, H., Guessous-Idrissi, N., Lasri, S., Natami, A., Riyad, M., and Berrag, B.** (1999): Immune response against *Leishmania* antigens in dogs naturally and experimentally infected with *Leishmania infantum*. *Vet Parasitol* 81, 173-84.
- Riça-Capela M.J., Cortes S., Leandro C., Peleteiro M.C., Santos-Gomes G., Campino L.** (2003): Immunological and histopathological studies in a rodent model infected with *Leishmania infantum* promastigotes or amastigotes. *Parasitol Res* 89, 163-9.
- Riera, C., Valladares, J. E., Gallego, M., Aisa, M. J., Castillejo, S., Fisa, R., Ribas, N., Carrio, J., Alberola, J., and 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.
- Robinson, H. L.** (2007): HIV/AIDS vaccines: 2007. *Clin Pharmacol Ther* 82, 686-93.
- Rodriguez-Cortes, A., Ojeda, A., Lopez-Fuertes, L., Timon, M., Altet, L., Solano-Gallego, L., Sanchez-Robert, E., Francino, O., and Alberola, J.** (2007): A long term experimental study of canine visceral leishmaniasis. *Int J Parasitol* 37, 683-93.
- Rodriguez-Cortes, A., Solano-Gallego, L., Fernandez-Bellón, H., Arboix, M., Sanchez, A., Alberola, J.** (2002): DNA vaccination against *L. infantum* in dogs. 27th World Small Animal Veterinary Association (WSAVA) Congress.
- Rosario, E. Y., Genaro, O., Franca-Silva, J. C., da Costa, R. T., Mayrink, W., Reis, A. B., and Carneiro, M.** (2005): Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay using crude *Leishmania* and recombinant antigens as a diagnostic marker for canine visceral leishmaniasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 100, 197-203.
- Rosati, S., Ortoffi, M., Profiti, M., Mannelli, A., Mignone, W., Bollo, E., and Gradoni, L.** (2003): Prokaryotic expression and antigenic characterization of three recombinant *Leishmania* antigens for serological diagnosis of canine leishmaniasis. *Clin Diagn Lab Immunol* 10, 1153-6.
- Scalone, A., De Luna, R., Oliva, G., Baldi, L., Satta, G., Vesco, G., Mignone, W., Turilli, C., Mondesire, R. R., Simpson, D., Donoghue, A. R., Frank, G. R., and Gradoni, L.** (2002): Evaluation of the *Leishmania* recombinant K39 antigen as a diagnostic marker for canine leishmaniasis and validation of a standardized enzyme-linked immunosorbent assay. *Vet Parasitol* 104, 275-85.
- Sitz, K. V., Loomis-Price, L. D., Ratto-Kim, S., Kenner, J. R., Sau, P., Eckels, K. H., Redfield, R. R., and Birx, D. L.** (1997): Delayed-type hypersensitivity skin testing using third variable loop peptides identifies T lymphocyte epitopes in human immunodeficiency virus-infected persons. *J Infect Dis* 176, 1085-9.
- Solano-Gallego, L., Llull, J., Ramos, G., Riera, C., Arboix, M., Alberola, J., and Ferrer, L.** (2000): The Ibizian hound presents a predominantly cellular immune response against natural *Leishmania* infection. *Vet Parasitol* 90, 37-45.
- Solano-Gallego, L., Morell, P., Arboix, M., Alberola, J., and 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, 560-3.
- Soto, M., Requena, J. M., Quijada, L., Angel, S. O., Gomez, L. C., Guzman, F., Patarroyo, M. E., and Alonso, C.** (1995): During active viscerocutaneous leishmaniasis the anti-P2 humoral response is specifically triggered by the parasite P proteins. *Clin Exp Immunol* 100, 246-52.
- Soto, M., Requena, J. M., Quijada, L., and Alonso, C.** (1998): Multicomponent chimeric antigen for serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. *J Clin Microbiol* 36, 58-63.
- Stager, S., Smith, D. F., and Kaye, P. M.** (2000): Immunization with a recombinant stage-regulated surface protein from *Leishmania donovani* induces protection against visceral leishmaniasis. *J Immunol* 165, 7064-71.
- Stebeck, C. E., Beecroft, R. P., Singh, B. N., Jardim, A., Olafson, R. W., Tuckey, C., Prenevost, K. D., and Pearson, T. W.** (1995): Kinetoplastid membrane protein-11 (KMP-11) is differentially expressed during the life cycle of African trypanosomes and is found in a wide variety of kinetoplastid parasites. *Mol Biochem Parasitol* 71, 1-13.
- Stetson, D. B., Mohrs, M., Mallet-Designe, V., Teyton, L., and Locksley, R. M.** (2002): Rapid expansion and IL-4 expression by *Leishmania*-specific naive helper T cells in vivo. *Immunity* 17, 191-200.
- Stewart, V. A., Walsh, D. S., McGrath, S. M., Kester, K. E., Cummings, J. F., Voss, G., Delchambre, M., Garcon, N., Cohen, J. D., and Heppner, D. G., Jr.** (2006): Cutaneous delayed-type hypersensitivity (DTH) in a multi-formulation comparator trial of the anti-falciparum malaria vaccine candidate RTS,S in rhesus macaques. *Vaccine* 24, 6493-502.
- Suffia, I., Ferrua, B., Stien, X., Mograbi, B., Marty, P., Rousseau, D., Fragaki, K., and Kubar, J.** (2000): A novel *Leishmania infantum* recombinant antigen which elicits interleukin 10 production by peripheral blood mononuclear cells of patients with visceral leishmaniasis. *Infect Immun* 68, 630-6.
- Thomas, M. C., Longobardo, M. V., Carmelo, E., Maranon, C., Planelles, L., Patarroyo, M. E., Alonso, C., and Lopez, M. C.** (2001): Mapping of the antigenic determinants of the T. cruzi kinetoplastid membrane protein-11. Identification of a linear epitope specifically recognized by human Chagasic sera. *Clin Exp Immunol* 123, 465-71.
- Tolson, D. L., Jardim, A., Schnur, L. F., Stebeck, C., Tuckey, C., Beecroft, R. P., Teh, H. S., Olafson, R. W., and Pearson, T. W.** (1994): The kinetoplastid membrane protein 11 of *Leishmania donovani* and African trypanosomes is a potent stimulator of T-lymphocyte proliferation. *Infect Immun* 62, 4893-9.

- Trujillo, C., Ramirez, R., Velez, I. D., and Berberich, C.** (1999): The humoral immune response to the kinetoplastid membrane protein-11 in patients with American leishmaniasis and Chagas disease: prevalence of IgG subclasses and mapping of epitopes. *Immunol Lett* 70, 203-9.
- Umezawa, E. S., Nascimento, M. S., and Stolf, A. M.** (2001): Enzyme-linked immunosorbent assay with *Trypanosoma cruzi* excreted-secreted antigens (TESA-ELISA) for serodiagnosis of acute and chronic Chagas' disease. *Diagn Microbiol Infect Dis* 39, 169-76.
- Umezawa, E. S., Souza, A. I., Pinedo-Cancino, V., Marcondes, M., Marcili, A., Camargo, L. M., Camacho, A. A., Stolf, A. M., and Teixeira, M. M.** (2009): TESA-blot for the diagnosis of Chagas disease in dogs from co-endemic regions for *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma evansi* and *Leishmania chagasi*. *Acta Trop* 111, 15-20.
- Vale, A. M., Fujiwara, R. T., da Silva Neto, A. F., Miret, J. A., Alvarez, D. C., da Silva, J. C., Campos-Neto, A., Reed, S., Mayrink, W., and Nascimento, E.** (2009): Identification of highly specific and cross-reactive antigens of *Leishmania* species by antibodies from *Leishmania (Leishmania) chagasi* naturally infected dogs. *Zoonoses Public Health* 56, 41-8.
- Walsh, D. S., Looareesuwan, S., Vaniganonta, S., Viravan, C., and Webster, H. K.** (1995): Cutaneous delayed-type hypersensitivity responsiveness in patients during and after *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* infections. *Clin Immunol Immunopathol* 77, 89-94.
- Webb, J. R., Campos-Neto, A., Owendale, P. J., Martin, T. I., Stromberg, E. J., Badaro, R., and Reed, S. G.** (1998): Human and murine immune responses to a novel *Leishmania major* recombinant protein encoded by members of a multicopy gene family. *Infect Immun* 66, 3279-89.
- WHO** (a). Leishmaniasis: background information. <http://www.who.int/leishmaniasis/en/>
- WHO** (b). Human African trypanosomiasis. http://www.who.int/trypanosomiasis_african/en/
- WHO** (c). Chagas disease. http://www.who.int/topics/chagas_disease/en/
- Woodland, D. L.** (2004): Jump-starting the immune system: prime-boosting comes of age. *Trends Immunol* 25, 98-104.
- Zanin, F. H., Coelho, E. A., Tavares, C. A., Marques-da-Silva, E. A., Silva Costa, M. M., Rezende, S. A., Gazzinelli, R. T., and Fernandes, A. P.** (2007): Evaluation of immune responses and protection induced by A2 and nucleoside hydrolase (NH) DNA vaccines against *Leishmania chagasi* and *Leishmania amazonensis* experimental infections. *Microbes Infect* 9, 1070-7.

Conclusiones



1. Las proteínas rKMPII, rTRYP, rLACK y rpapLe22 de *L. infantum* producidas en larvas de *T. ni* presentan el peso molecular esperado y son reconocidas por el suero de perros infectados.
2. Los antígenos KMPII, TRYP, LACK y papLe22 de *L. infantum* presentan epítomos reconocidos por células B de perros con leishmaniosis patente. Se detectaron seroprevalencias del 75 %, 51 % y 42 % para KMPII, TRYP y LACK, respectivamente, en una población de perros enfermos infectados de forma natural y experimental. De los tres antígenos citados anteriormente, el antígeno KMPII representa el inmunógeno más potente para células B caninas.
3. Ninguno de los ELISA basados en los antígenos rKMPII, rTRYP o rLACK presentó una sensibilidad comparable a la del CTLA para el diagnóstico de los perros con leishmaniosis. Sin embargo, la utilización en paralelo de estos tres ELISA alcanzó una elevada sensibilidad (93 %) y especificidad (97 %), las cuales no difirieron significativamente de las obtenidas con el CTLA. Esta técnica puede constituir una herramienta sensible, específica, reproducible y de bajo coste para el diagnóstico de la CanL.
4. Los perros sin signos clínicos de leishmaniosis residentes en zona endémica que no presentaron anticuerpos específicos contra el CTLA tampoco presentaron anticuerpos contra las proteínas recombinantes rKMPII, rTRYP, rLACK o rpapLe22. Por el contrario, en este grupo de animales resultó ser más sensible para el diagnóstico el LST (64 % de reacciones positivas).
5. Los antígenos KMPII, TRYP, LACK y papLe22 de *L. infantum* pueden actuar como inmunógenos para células T en perros infectados residentes en zona endémica. El porcentaje de perros infectados con una respuesta DTH positiva frente a rKMPII, rTRYP, rLACK y rpapLe22 fue del 27 %, 50 %, 18 % y 18 %, respectivamente, indicando que de los cuatro antígenos estudiados, TRYP constituye el inmunógeno más potente para células T en perros.
6. Las pruebas DTH basadas en rTRYP y rKMPII valoradas en paralelo mostraron una sensibilidad y especificidad del 78 % para el diagnóstico de los perros infectados en relación al LST, las cuales no difirieron significativamente de las obtenidas por éste. Los antígenos rTRYP y rKMPII pueden ser componentes de interés para una prueba de DTH estandarizable basada en proteínas recombinantes para el diagnóstico de los perros infectados por *L. infantum*.

7. Las estrategias de vacunación basadas en DNA desnudo, proteína o *prime-boost* heterólogo DNA-proteína empleando KMPII, TRYP, LACK y papLe22 en el plásmido pVAX1™ y en extractos crudos de *T. ni* son seguras y bien toleradas en el modelo de hámster.
8. La vacunación de hámsters con extractos crudos de *T. ni* conteniendo las proteínas rKMPII, rTRYP, rLACK y rpapLe22 de *L. infantum* no confirió protección parasitológica frente a la infección experimental con *L. infantum*.
9. Aunque la vacunación de hámsters con DNA plasmídico conteniendo los genes *KMPII*, *TRYP*, *LACK* y *papLe22* confirió un alto grado de protección parasitológica frente a la infección experimental con *L. infantum*, la estrategia de vacunación *prime-boost* fue la que consiguió una mejor inmunogenicidad y una mayor eficacia, reduciendo significativamente la carga parasitaria en un 86 % en el bazo y en un 99 % en sangre. La estrategia *prime-boost* basada en DNA desnudo y proteína empleando KMPII, TRYP, LACK y papLe22 puede ser de utilidad para el control de la ZVL.



UAB

UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA
DEPARTAMENT DE FARMACOLOGIA, TERAPÈUTICA I TOXICOLOGIA