

Estudio del perfil electroforético en sueros de caninos con leishmaniasis visceral de Posadas, provincia de Misiones, Argentina

Study of the sera electrophoretic profile in dogs infected with visceral leishmaniasis from Posadas, Misiones, Argentina

Ramayo, L.G.¹; Estevez, J.O.²; Nevot, M.C.²; Stempler, A.¹; Goldman, L.¹; Jar, A.M.¹; Mundo, S.L.¹

¹ Cátedra de Inmunología. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad de Buenos Aires. Argentina. Chorroarín 280 (1427).

² Veterinaria del Oeste, Posadas, Misiones, Argentina.

RESUMEN

La leishmaniasis visceral es una enfermedad zoonótica producida por el protozooario *Leishmania infantum* (*syn. chagasi*) transmitida por el flebótomo *Lutzomyia longipalpis* y que tiene al canino como principal reservorio en áreas urbanas y periurbanas. En el presente trabajo se realizó un estudio electroforético retrospectivo de 40 sueros de caninos enfermos con diagnóstico parasitológico confirmado de leishmaniasis obtenidos entre los años 2006 y 2008 en la ciudad de Posadas, provincia de Misiones, Argentina. El 80 % (32 de 40) de las muestras presentaron alteraciones en el perfil electroforético caracterizadas por la disminución de la relación albúmina/globulina y la presencia de hipergammaglobulinemia de tipo policlonal en el 52,5 % de los casos (21 de 40) y de hipergammaglobulinemia de tipo monoclonal a isotipo IgG en el 27,5 % (11 de 40) de ellos. Cinco de los sueros con anormalidades en el perfil electroforético mostraron valores normales de proteinemia; el resto presentó hiperproteinemia. Estos resultados muestran que la hipergammaglobulinemia y la disminución de la relación albúmina/globulina fueron hallazgos clínico patológicos frecuentes en este brote, tal como se describe en otras partes del mundo.

Palabras clave: (canino), (electroforesis), (leishmaniasis), (hipergammaglobulinemia)

Correspondencia *e-mail*: Silvia Mundo smundo@fvet.uba.ar

Recibido: 15-06-2011

Aceptado: 13-11-2011

SUMMARY

Visceral leishmaniasis is a zoonotic disease caused by protozoan *Leishmania infantum* (*syn. chagasi*), transmitted by phlebotomine *Lutzomyia longipalpis*. Canines are its main reservoir in urban and suburban areas. Forty sera from sick dogs with leishmaniasis confirmed by parasitological diagnosis were analyzed in a retrospective study. Sera were obtained during 2006-2008 in the city of Posadas, Misiones province, Argentina. Eighty % (32 out of 40) of these samples showed distortions in the electrophoretic profile, characterized by a diminished albumin/globulin ratio and the presence of polyclonal hypergammaglobulinemia in 52.5 % (21 out of 40) of the samples, or IgG-monoclonal hypergammaglobulinemia in 27.5 % (11 out of 40) of the samples. Five of these sera with altered electrophoretic profile showed normal protein concentrations, while the other showed hyperproteinemia. These results show that hypergammaglobulinemia and a diminished albumin/globulin ratio were common pathological findings in this outbreak, as it has been described elsewhere.

Key words: (canine), (electrophoresis), (leishmaniasis), (hypergammaglobulinemia)

INTRODUCCIÓN

La leishmaniasis es una enfermedad zoonótica parasitaria transmitida por vectores, producida por diferentes especies de protozoarios pertenecientes al género *Leishmania*. En el ser humano cursa con cuadros clínicos diversos que se agrupan en tres presentaciones principales: cutánea, mucocutánea y visceral¹⁹.

La leishmaniasis visceral (LV) es la forma más severa de la enfermedad. Su agente etiológico es *Leishmania infantum* (*syn. chagasi*), y ocasiona más de 50 000 muertes y alrededor de 500 000 casos nuevos por año en el mundo¹⁹. El primer foco autóctono registrado en la República Argentina tuvo lugar en el mes de mayo de 2006 en la ciudad de Posadas, provincia de Misiones²⁶, donde desde entonces y hasta abril de 2010 se notificaron un total de 58 casos humanos, 6 de ellos fatales⁶. Posteriormente se informaron casos en las provincias de Santiago del Estero y Corrientes¹⁶.

Al igual que en el resto de América del Sur, la hembra del flebótomo *Lutzomyia longipalpis* es el principal vector transmisor en nuestro medio. El canino (*Canis familiaris*) es a su vez el principal reservorio y responsable de la transmisión de la enfermedad al ser humano en las zonas urbanas y periurbanas. Por esto,

el incremento de los casos de LV en caninos usualmente precede al incremento de los casos en humanos. Este papel clave del canino en la cadena de transmisión de la enfermedad revela la necesidad de detectar a los animales infectados a fin de tomar las medidas de control que se consideren necesarias^{1, 6, 13, 16, 32}.

El diagnóstico de la LV en caninos requiere de un abordaje integral, en el que la anamnesis, la revisión clínica y las pruebas complementarias de laboratorio clínico orientan hacia su diagnóstico, y las técnicas parasitológicas, serológicas y biomoleculares confirman la enfermedad^{17, 28}.

La electroforesis es una prueba de laboratorio clínico que permite detectar la hipergammaglobulinemia (gammapatía), que es uno de los hallazgos clínico-patológicos más frecuentes de esta enfermedad. Este aumento de la fracción de las gamma globulinas, donde se ubican los anticuerpos, no se relaciona con la protección pero sí con la patogenia de la enfermedad y es un dato valioso para la aproximación diagnóstica, el pronóstico y el seguimiento del tratamiento de animales enfermos^{2, 5, 7, 14, 15, 20, 24, 25}.

En el presente trabajo se realizó un estudio electroforético retrospectivo de sueros de caninos enfermos con diagnóstico

parasitológico confirmado de leishmaniasis con el objetivo de determinar la presencia o no de hipergammaglobulinemia y de caracterizar el perfil electroforético más frecuente en la LV canina autóctona.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se trabajó sobre muestras de suero de 40 caninos de la ciudad de Posadas, provincia de Misiones, tomadas entre los años 2006 y 2008, pertenecientes a animales que habían sido llevados a consulta veterinaria por presentar síntomas compatibles con leishmaniasis, que se confirmó por diagnóstico parasitológico mediante citología directa de ganglios linfáticos, médula ósea y/o piel.

Se determinaron los niveles de proteínas por colorimetría mediante el sistema Proti 2 (Laboratorios Wiener S.A.I.C., Rosario, Argentina) siguiendo las instrucciones del fabricante.

La electroforesis de los sueros se realizó mediante la técnica descrita previamente para caninos³. Brevemente, las muestras de suero se sembraron sobre tiras de acetato de celulosa y se sometieron a una corriente de 150 Volt durante 35 minutos embebidas en buffer Veronal pH 8,4. Terminada la corrida, las tiras se colorearon con una solución de negro amido B y se leyeron en el densitómetro. Se obtuvieron los valores relativos (porcentaje del total de proteína) de cada fracción proteica. Los valores absolutos o concentración sérica (g/dl) se obtuvieron relacionando el valor relativo de cada fracción con el dato de proteínas totales obtenido por colorimetría.

La inmunoelectroforesis de los sueros se realizó mediante la técnica descrita previamente¹², sobre las muestras que presentaron un perfil electroforético compatible con gammapatía monoclonal determinado por la electroforesis previa. Brevemente, se realizó una corrida electroforética de las muestras en iguales condiciones a las descritas arriba, luego las tiras se enfrentaron con gammaglobulinas anti-IgG canina (producidas en conejos en nuestro laboratorio) y se incubaron durante 20 horas

en cámara húmeda a temperatura ambiente. Las tiras se lavaron, se colorearon con negro amido B y se analizaron visualmente.

RESULTADOS

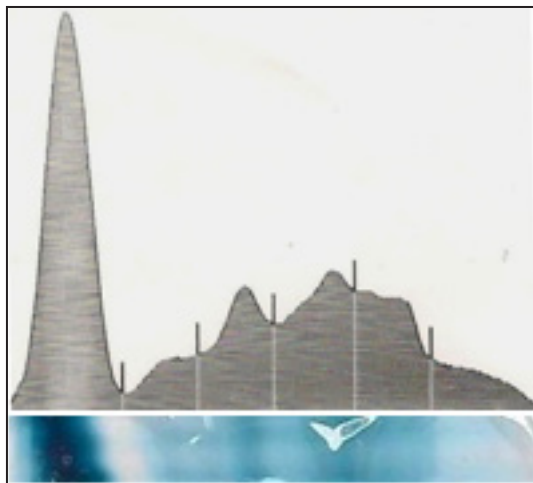
A partir del análisis electroforético efectuado en nuestro laboratorio encontramos un perfil normal (Fig.1) y dos perfiles anormales caracterizados por una hipergammaglobulinemia (gammapatía) de tipo policlonal (Fig.2a) o monoclonal (Fig.2b). El perfil electroforético monoclonal se confirmó y caracterizó como de isotipo IgG por análisis inmunoelectroforético (Fig. 3). En todos los casos, el perfil electroforético anormal se acompañó de una disminución de la relación albúmina/globulina, pero no en todos los casos se observó hiperproteinemia. La caracterización y la distribución completa de los 40 sueros analizados se muestran en la Tabla 1.

En función del valor de referencia normal de 1,1 – 2,2 g/dl de la concentración de beta globulinas, se pudo observar que la hipergammaglobulinemia se acompañó de un aumento de las beta globulinas en 2 de las 4 muestras con gammapatía policlonal y normoproteinemia (rango: 2,31 – 2,37 g/dl), en 13 de las 17 muestras con gammapatía policlonal e hiperproteinemia (rango: 2,35 – 4,82) y en 3 de las 10 muestras con gammapatía monoclonal e hiperproteinemia (rango: 3,21 – 4,90).

DISCUSIÓN

En el presente trabajo se observó que el 80% de las muestras analizadas pertenecientes a animales con sintomatología compatible con leishmaniasis y diagnóstico confirmado por técnicas parasitológicas, mostraron alteraciones en el perfil electroforético caracterizadas por hipergammaglobulinemia y una disminución de la relación albúmina/globulina. Estas anomalías coinciden con las descritas en la bibliografía extranjera^{2, 5, 7, 14, 15, 24, 25}.

El 52,50% del total de las muestras (21 de 40), presentó gammapatía de tipo policlonal, que es el tipo de gammapatía hallada con más frecuencia en esta enfermedad. Se considera que tiene su origen en una estimulación exagerada



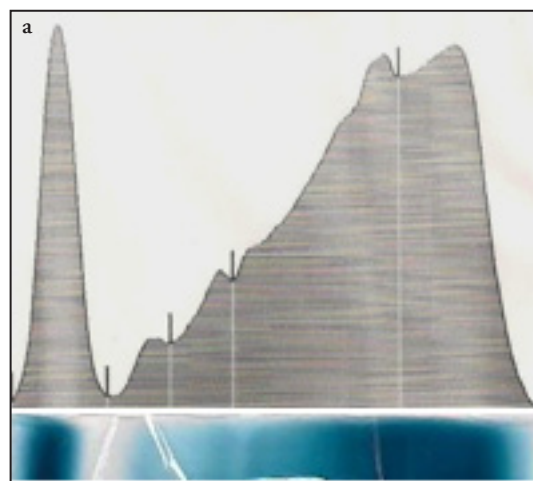
A	α-1G	α-2G	β-G	γ-G
2,52	0,36	0,83	1,96	0,58
Relación A/G: 0,67				
Proteinemia: 6,25 g/dl				

Se observa el proteinograma y la corrida electroforética de un suero con perfil normal. Los valores de A: albúmina; α-1G: alfa-1 globulinas; α-2G: alfa-2 globulinas; β-G: beta globulinas y γ-G: gamma globulinas se expresan en concentración (g/dl).

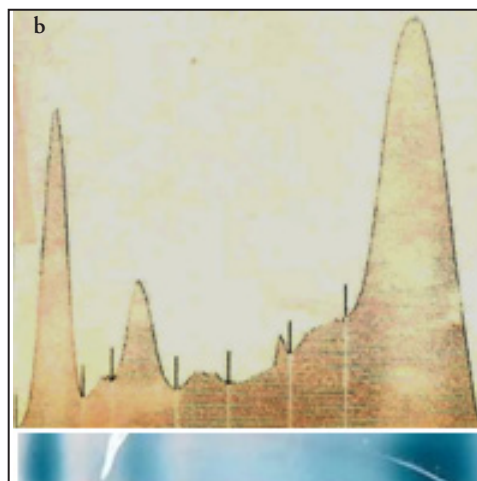
Figura 1. Perfil electroforético normal

y persistente de la rama humoral del sistema inmune, que induce la activación de numerosos clones de linfocitos. El resultante exceso de anticuerpos lleva a la formación y depósito de complejos inmunes en los pequeños vasos sanguíneos, con la consecuente activación de la cascada del complemento y el desarrollo de un proceso inflamatorio que termina en una vasculitis. Este tipo de daño a los tejidos, conocido como hipersensibilidad de tipo III o enfermedad por complejos inmunes, contribuye a la producción de lesiones dérmicas, viscerales y oculares características de la leishmaniasis visceral^{9, 15, 18, 21, 22, 30}.

Los anticuerpos son también los responsables de fenómenos autoinmunes que se relacionarían con una reactividad cruzada entre los antígenos parasitarios y los tejidos del huésped^{5, 9, 27, 30, 31}. Así, la presencia de la gammapatía policlonal no se relaciona con protección sino con enfermedad activa, ya que interviene en la inmunopatogenia de las lesiones. La protección contra la enfermedad es de tipo celular, mediada



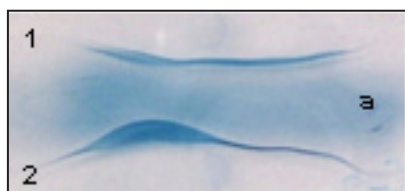
A	α-1G	α-2G	β-G	γ-G
1,66	0,26	0,63	4,05	3,33
Relación A/G: 0,19				
Proteinemia: 9,94 g/dl				



A	α-1G	α-2G	β-G	γ-G
2,09	0,24	1,54	2,18	6,93
Relación A/G: 0,17				
Proteinemia: 13,00 g/dl				

Se observa el proteinograma y la corrida electroforética de dos sueros con perfiles anormales caracterizados por una hipergammaglobulinemia (gammapatía) de tipo policlonal (a) o monoclonal (b). Los valores de A: albúmina; α-1G: alfa-1 globulinas; α-2G: alfa-2 globulinas; β-G: beta globulinas y γ-G: gamma globulinas se expresan en concentración (g/dl).

Figura 2. Perfiles electroforéticos anormales.



El perfil monoclonal se confirmó y caracterizó como de isotipo IgG. 1: IgG de suero normal (control); 2: IgG de suero con perfil monoclonal; a: anti-IgG canina.

Figura 3. Inmunolectroforesis del suero con perfil electroforético monoclonal

fundamentalmente por linfocitos T helper 1^{4, 11, 20, 28, 29}, los anticuerpos específicos que no obstante se producen contra el parásito, no defienden al animal pero pueden utilizarse para el diagnóstico serológico de la enfermedad^{17, 28}. El aumento policlonal de las gamma globulinas en nuestro estudio se acompañó en muchos casos de un aumento en el nivel de beta globulinas; esto ya ha sido descrito por otros autores y se debería a que en la fracción de beta globulinas corren, entre otras proteínas, inmunoglobulinas de los tres isotipos más abundantes en suero (IgG, IgM e IgA)^{15, 25}.

El 27,50 % del total de las muestras (11 de 40) estudiadas presentó gammapatía de tipo monoclonal, porcentaje que se puede considerar elevado teniendo en cuenta que esta gammapatía se considera poco frecuente en la leishmaniasis^{8,10}. En un estudio anterior efectuado en la zona ya habíamos encontrado esta característica²³. El mecanismo que lleva a la aparición de gammapatía monoclonal en enfermedades infecciosas o parasitarias es aun desconocido y algunos autores sugieren que podría deberse a una predisposición genética que haría que la estimulación antigénica persistente provocara la estimulación de un solo clon de linfocitos en lugar de la típica respuesta policlonal¹⁰. En coincidencia con los datos bibliográficos, el isotipo involucrado en el aumento monoclonal de las gamma globulinas fue IgG en todos los casos^{8, 10, 15}, lo que estaría indicando que aparece en los estadios finales de la respuesta inmune. No se sabe si la gammapatía monoclonal interviene de algún modo en la patogenia de la enfermedad que, según datos bibliográficos, cursa en estos casos con igual cuadro clínico que en animales que desarrollan gammapatía policlonal. Por lo tanto,

Tabla 1. Distribución de los sueros de los 40 animales enfermos estudiados. Se muestra el rango de valores obtenidos en cada grupo.

PERFIL ELECTROFORÉTICO	Valores de referencia *	NORMAL		GAMMAPATÍA POLICLONAL		GAMMAPATÍA MONOCLONAL a IgG	
		n= 8 (20,0%)		n=21 (52,5%)		n=11 (27,5%)	
Proteinemia		Normal	Aumentada	Normal	Aumentada	Normal	Aumentada
				n= 8 (20,0%)	n= 0	n= 4 (10,0%)	n= 17 (42,5%)
Concentración de proteínas	5,5 - 7,5 g/dl	5,52-7,36 g/dl	n.d.	5,54-7,20 g/dl	7,83-13,12 g/dl	6,98 g/dl	9,14-13,00 g/dl
Concentración de gammaglobulinas	0,5 - 1,1 g/dl	0,53-0,97 g/dl	n.d.	1,23-2,18 g/dl	1,30-5,00 g/dl	2,79 g/dl	3,40-9,37 g/dl
Relación albúmina/globulina	0,6 - 1,2	0,62-0,86	n.d.	0,19-0,49	0,11-0,53	0,23	0,11-0,23

* Se indican los valores de referencia del laboratorio del Servicio de Diagnóstico Inmunológico de la Cátedra de Inmunología de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad de Buenos Aires.

el significado de la presencia del componente monoclonal en la leishmaniasis aun no está dilucidado. La gammapatía monoclonal se acompañó en algunas muestras de un aumento en la concentración de beta globulinas, lo que podría indicar un concomitante aumento policlonal de inmunoglobulinas, como ha sido mencionado por otros investigadores¹⁰.

La hiperproteinemia, alteración característica de la leishmaniasis^{2, 5, 7, 14, 15, 24, 25}, acompañó a las alteraciones electroforéticas en 27 de las 32 de las muestras con perfiles anormales. Sin embargo, los valores normales de proteinemia en las cinco muestras restantes, sugiere que la normoproteinemia no excluye la posibilidad de alteraciones en el perfil electroforético, tanto poli como monoclonal.

CONCLUSIONES

Este trabajo muestra que la hiper-gammaglobulinemia y la disminución de la relación albúmina/globulina, detectadas por la técnica de electroforesis, fueron hallazgos clínico- patológicos muy frecuentes en este brote autóctono de leishmaniasis visceral, tal como se describe en otras partes del mundo. No sólo la gammapatía policlonal, sino también la gammapatía monoclonal, fueron los perfiles electroforéticos característicos en este estudio. Los valores normales de concentración de proteínas séricas no excluyeron la presencia de estas alteraciones. La técnica de electroforesis podría entonces contemplarse dentro del panel de pruebas de laboratorio que el veterinario solicita cuando realiza la evaluación clínica del animal.

Debido a que este trabajo se realizó en forma retrospectiva sobre animales con síntomas compatibles con leishmaniasis clasificados como positivos por examen parasitológico, no se pudo evaluar la utilidad de la electroforesis en caninos asintomáticos ni la relación de cada perfil electroforético anormal con la sintomatología y la evolución de la enfermedad. En un nuevo estudio de tipo prospectivo se podrían evaluar estos dos puntos y aportar de este modo más datos acerca del diagnóstico y

de la inmunopatogenia de la leishmaniasis en el canino.

BIBLIOGRAFÍA

- 1- Acardi, SA.; Liotta, DJ.; Santini, MS.; Romagosa, CM.; Salomón, OD. Detection of *Leishmania infantum* in naturally infected *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) and *Canis familiaris* in Misiones, Argentina: the first report of a PCR-RFLP and sequencing-based confirmation assay. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, September 2010; 105(6): 796-9.
- 2- Almeida, MAO.; Jesus, EEV.; Sousa-Atta, MLB.; Alves., LC.; Berne, MEA.; Atta, AM. 232 Clinical and serological aspects of visceral leishmaniasis in Northeast Brazilian dogs naturally infected with *Leishmania chagasi*. *Veterinary Parasitology*. 2005; 127: 227-32
- 3- Barta, O.; Arnold, D.F. Electrophoresis. En: Barta, O. (ed): *Monographs in Animal Immunology, Veterinary Clinical Immunology Laboratory*. Bar-Lab, Inc. 1993: Chapter C1, pp C1-1 – C1-17.
- 4- Cabral, M.; O'Grady, JE.; Gomes, S.; Sousa, JC.; Thompson, H.; Alexander, J. The immunology of canine leishmaniasis: strong evidence for a developing disease spectrum from asymptomatic dogs. *Vet. Parasitol.*, 1998; 76: 173-80.
- 5- Ciaramella, P.; Oliva, G.; De Luna, RD.; Gradoni, L.; Ambrosio, R.; Cortese, L.; Scalone, A.; Persechino A. A retrospective clinical study of canine leishmaniasis in 150 dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. *Vet Rec*. 1997;141: 539-43.
- 6- Cruz, I.; Acosta, I.; Gutiérrez, MN.; Nieto, J.; Cañavale, C.; Deschutter, J.; Bornay-Llinares, FJ. A canine leishmaniasis pilot survey in an emerging focus of visceral leishmaniasis: Posadas (Misiones, Argentina). *BMC Infect Dis*. Dec. 2010; 1 (10): 342-7.
- 7- Ferrer, L.; Aisa, MJ.; Roura, X.; Potús, M. Serological diagnosis and treatment of canine leishmaniasis. *Vet. Rec.*, Mayo 20 1995; 514-6.
- 8- Font A.; Closa, M.; Mascort, J. Monoclonal Gammopathy in a Dog with Visceral Leishmaniasis. *J. Vet. Int. Med.*, 1994; 8 (3): 233-5.

- 9- Galvao-Castro, B; Sa Ferreira, JA; Marzochi, KF; Marzochi, MCA; Coutinho, SG; Lambert, PH. Polyclonal B cell activation, circulating immune complexes and autoimmunity in human American visceral leishmaniasis. *Clin Exp Immunol* 1984; 56: 58-66.
- 10- Giraudel, JM.; Pagès, JP.; Guelfi, JF. Monoclonal Gammopathies in the dog: A retrospective study of 18 cases (1986-1999) and literature review. *J Am Anim Hosp Assoc*, 2002; 38: 135-47.
- 11- Grimaldi, G.; Tesh, RB. Leishmaniasis of the new World: current concepts and implications for future research. *Clin Microbiol Rev*, July 1993; 6 (3): 230-50.
- 12- Margni, R. A. *Inmunología e inmunquímica*. 5° ed. Ed. Méd. Panamericana. Buenos Aires, Argentina, 1996.
- 13- Margonari, C.; Freitas, C.R.; Ribeiro, R.C.; Moura, A.C.; Timbo, M.; Gripp, A.H. Epidemiology of visceral leishmaniasis through spatial analysis, in Belo Horizonte municipality, state of Minas Gerais, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2006 Feb; 101(1): 31-8
- 14- Marzochi, MCA.; Cautinho, SG.; Souza, W. Canine visceral leishmaniasis in Rio de Janeiro, Brazil. Clinical, parasitological, therapeutically and epidemiological findings (1977-1983). *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1985; 80: 349-57
- 15- McConkey, SE.; López, A.; Shaw, D.; Calder, J. Leishmanial polyarthritis in a dog. *Can Vet J*, August 2002; 43: 607-9.
- 16- Ministerio de Salud de la Nación. Dirección de Epidemiología. *Guía para el equipo de salud Nro 5: Enfermedades infecciosas | leishmaniasis visceral*. Marzo/2010
- 17- Moreira, MAB.; Luvizotto, MCR.; Garcia, JF.; Corbett, CEP.; Laurenti, MD. Comparison of parasitological, immunological and molecular methods for the diagnosis of leishmaniasis in dogs with different clinical signs. *Vet Parasitol*, 2007; 145: 245-52.
- 18- Nieto, C.G.; Navarrete, I.; Habela, M.A.; Serrano, F.; Redondo, E. Pathological changes in kidneys of dogs with natural *Leishmania* infection. *Vet Parasitol*. 1992; Dec, 45(1-2): 33-47.
- 19- PAHO - Pan American Health Organization. Update of American trypanosomiasis and leishmaniasis control and research: final report. PAHO/HDM/CD/512-2008, PAHO, Rio de Janeiro, 176 pp.
- 20- Pinelli, E. ; Killick-Kendrick, R.; Wagenaar, J. ; Bernadina, W.; del Real, G.; Ruitenber, J. Cellular and humoral immune responses in dogs experimentally and naturally infected with *Leishmania infantum*. *Infect Immun*. 1994; 62: 229-35
- 21- Poli, A.; Abramo, E.; Mancianti, E.; Nigro, M.; Pieri, S.; Bionda, A. Renal involvement in canine leishmaniasis. A lightmicroscopic, immunohistochemical and electron-microscopic study. *Nephron*. 1991; 57(4): 444-52.
- 22- Pumarola, M.; Brevik, L.; Badiola, J.; Vargas, A.; Domingo, M.; Ferrer, L. Canine leishmaniasis associated with systemic vasculitis in two dogs. *J Comp Pathol*. 1991 Oct; 105(3): 279-86.
- 23- Ramayo, L.; Estévez, J.; Nevot, M.; Jar, A.; Maure, P.; Goldman, L.; Mundo, S. Perfil electroforético de caninos con leishmaniasis de la provincia de Misiones, República Argentina. [Abstract P016]. III Congreso Latinoamericano de Zoonosis. VI Congreso Argentino de Zoonosis. Buenos Aires, Argentina. 18 al 20 de junio de 2008. Buenos Aires: Asociación Argentina de Zoonosis.
- 24- Reis, AB.; Martins-Filho OA.; Teixeira-Carvalho, A.; et al. Parasite density and impaired biochemical/hematological status are associated with severe clinical aspects of canine visceral leishmaniasis. *Res Vet Sci*, Aug. 2006; 81 (1): 68-73.
- 25- Romdane, MN.; Ben Romdhane, S.; Jemli, MH.; Metoui, K. Profils électrophorétiques dans la leishmaniose canine. *Revue Méd Vét*, 1992; 143 (10): 753-6.
- 26- Salomon, OD.; Sinagra, A.; Nevot, MC.; et al. First visceral leishmaniasis focus in Argentina. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, February 2008; 103(1): 109-11.
- 27- Smith, B.E.; Tompkins, M.B.; Breitschwerdt, E.B. Antinuclear antibodies can be detected in dog sera reactive to *Bartonella vinsonii* subsp. *berkhoffii*, *Ehrlichia canis*, or *Leishmania infantum* antigens. *J Vet Intern Med*. 2004 Jan-Feb; 18(1): 47-51.

- 28- Solano Gallego, L.; Baneth, G. Canine leishmaniasis - a challenging zoonosis. *EJCAP*. December 2008; 18 (3): 232-41.
- 29- Todolí, F.; Solano-Gallego, L.; de Juan, R.; *et al.* Humoral and *In Vivo* Cellular Immunity against the raw insect-derived recombinant *Leishmania infantum* antigens KMPII, TRYI, LACK, and papLe22 in dogs from an endemic area. *Am J Trop Med Hyg*, 2010; 83 (6): 1287-94.
- 30- Vamvakidis, CD; Koutinas, AF; Kanakoudis, G; Georgiadis, G; Saridomichelakis, M. Masticatory and skeletal muscle myositis in canine leishmaniasis (*Leishmania infantum*). *Vet Res*, 2000 Jun 10; 146(24):698-703.
- 31- Voulgarelis, M.; Voulgari PV; Serelis, J.; Drosos, AA.; Skopouli, FN. Visceral leishmaniasis resembling systemic lupus erythematosus. *Clinical Rheumatology*, December 2003; 22 (6): 452-5.
- 32- Werneck, GL; Costa, CH; Walker, AM; David, JR; Wand, M; Maguire, JH Multilevel modelling of the incidence of visceral leishmaniasis in Teresina, Brazil. *Epidemiol. Infect* 2007 Feb; 135(2):195-201.