

MANUAL TÉCNICO

TECNOLOGÍA RECOMBINANTE

AL SERVICIO DE LA SALUD ANIMAL



Leish-Tec®

VACUNA RECOMBINANTE CONTRA LEISHMANIASIS VISCERAL CANINA

PROTECCIÓN PARA LOS PERROS
CONTRA LA LEISHMANIASIS VISCERAL CANINA

cediVEP® S.R.L.
CENTRO DE DIAGNOSTICO VETERINARIO DEL PARAGUAY



INDICE

Pag.

| | |
|--|-----------|
| CEVA SALUD ANIMAL | 3 |
| LEISHMANIASIS VISCERAL CANINA | 4 |
| Introducción y Epidemiología | 4 |
| Etiología y Transmisión | 4 |
| Patogenesis | 6 |
| Aspectos Clínicos y Alteraciones Laboratoriales | 6 |
| DIAGNOSTICO ESPECÍFICO | 9 |
| Metodos Parasitológicos | 9 |
| Metodos Serológicos | 10 |
| Metodos Moleculares | 11 |
| Otros Metodos | 11 |
| ESTADIFICACIÓN CLINICA DE LA ENFERMEDAD CANINA | 12 |
| TRATAMIENTO Y PRONÓSTICO | 13 |
| CONTROL Y PREVENCIÓN | 13 |
| VACUNA LEISH-TECH | 14 |
| Vacuna Recombinante | 14 |
| Proteína A2 | 14 |
| Fases de Desarrollo de la Vacuna | 15 |
| Presentación e Informaciones Técnicas | 15 |
| PROTOCOLO DE LA VACUNACIÓN | 16 |
| Posibles Reacciones Adversas | 17 |
| Factores que pueden Interferir en la Respuesta a la Vacuna | 17 |
| Contraindicaciones | 17 |
| REFERENCIAS | 18 |

CEVA SALUD ANIMAL

Ceva Salud Animal es una multinacional francesa, presente en 110 países con un enfoque en la investigación, desarrollo, producción y comercialización de productos farmacéuticos y vacunas para animales de compañía, rumiantes, ovejas y aves.

Debemos nuestra existencia a los granjeros, guardianes de mascotas y a los veterinarios que nos apoyan. Como resultado, nos dedicamos a ofrecer los mejores productos y servicios.

El vínculo entre los seres humanos y animales es una parte esencial de la vida. Creemos que esto debe ser adoptado y reflejado, también en la ciencia. Nuestro objetivo es proporcionar productos y servicios que no solo protegen y mejoran la vida de los animales, pero también proporcionan el bienestar de cada individuo en nuestra comunidad global.



LEISHMANIASIS VISCERAL CANINA

INTRODUCCIÓN Y EPIDEMIOLOGÍA

La Leishmaniasis visceral (LV) es una enfermedad zoonótica que afecta, además del hombre, a varias especies animales, tanto domésticas como salvajes. Es una enfermedad causada por los protozoos del género *Leishmania*, siendo la especie *Leishmania infantum chagasi*, el agente etiológico causante de endemias en Brasil. Entre los huéspedes vertebrados que pueden infectarse, el perro es el que se considera importante en el mantenimiento del ciclo epidemiológico de la enfermedad en las zonas urbanizadas por la alta capacidad de infectar al insecto vector de la enfermedad.

Presenta una amplia distribución, tanto a nivel mundial como nacional, habiendo referencia de la aparición de infección (casos autóctonos) en unos 90 países. En las Américas, aproximadamente el 90% de los casos de LV humana se han registrado en Brasil, con casos de LV humana y canina ocurridos hasta el momento, en 23 y 25 unidades federativas del país, respectivamente.

ETIOLOGÍA Y TRANSMISIÓN

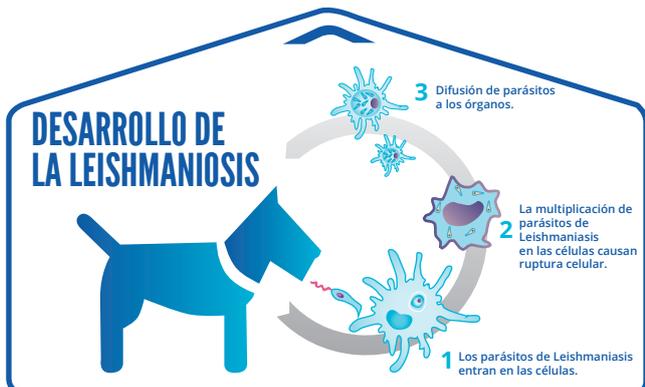
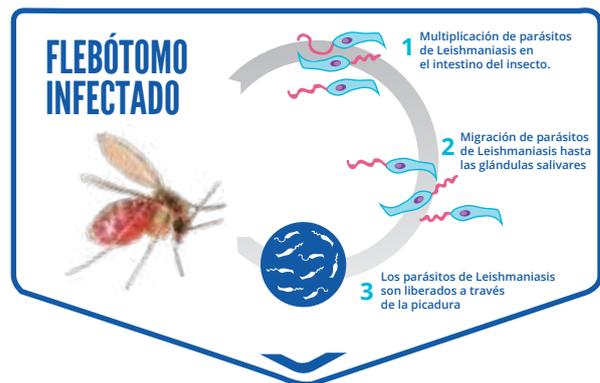
Se trata de una enfermedad causada por protozoos del género *Leishmania*, pertenecientes al sub-reino Protozoa, *phylum Sarcomastigophora*, orden Kinetoplastida, familia *Trypanosomatidae*, siendo la especie *L. infantum chagasi* aquella incriminada como agente causante de la enfermedad en Brasil.

Estos parásitos son digenéticos y pueden ser transmitidos al hombre y a los animales, dado que la cadena epidemiológica de la LV incluye la presencia del vector, del reservorio, del parásito y del huésped susceptible concomitante en la misma área.



La forma de transmisión considerada epidemiológicamente importante para el mantenimiento del ciclo de la enfermedad en animales y humanos se da por medio de la picadura de hembras de flebótomos hematófagos infectadas pertenecientes a la orden Díptera, del género *Lutzomyia*, familia *Psychodidae* y subfamilia *Phlebotominae*, popularmente conocidos como mosquitos paja. En el Brasil, los vectores de la especie *Lutzomyia longipalpis* son comprobadamente los más incriminados en la cadena de transmisión de la enfermedad, pero en algunas regiones del país, las especies *Lutzomyia cruzi* y *Lutzomyia migonei* también han sido implicadas como potencialmente transmisoras del protozoo.

Estos insectos se consideran importantes para mantener el ciclo epidemiológico de la enfermedad por el hecho de que parte del ciclo biológico del parásito ocurre en su tubo digestivo. Al picar al huésped vertebrado infectado, ingieren macrófagos con formas de amastigote (acanaladas) de *Leishmania* que, una vez ingeridas, se rompen y liberan el parásito dentro de la flebotomina. Una vez en su tracto digestivo, el parásito se multiplica por división binaria y se diferencia en formas promastigotas (flageladas), que se consideran infecciosas para huéspedes vertebrados susceptibles (Figura 1). Aunque todavía de incierta importancia en la epidemiología de la LV, otras formas de transmisión ya confirmadas para la Leishmaniasis visceral canina (LVC) y relevantes en la rutina clínica son la vertical (de madre a cachorro, vía transplacentaria), venérea y transfusión sanguínea, entre otras.



PATOGENESIS

Con la inoculación del protozoo (forma promastigota) en la piel del perro, se promueve inicialmente una respuesta inflamatoria local y la fagocitosis del parásito por macrófagos, dentro de la cual se produce la pérdida del flagelo y su transformación a la forma amastigota, que se multiplica por división binaria en el interior de las células, llegando a romperlas, con su liberación y nueva fagocitosis por otros macrófagos, hasta su diseminación, en animales susceptibles, a cualquier órgano, tejido o fluido corporal, pero particularmente, a órganos linfoides (ganglios linfáticos, médula ósea, bazo e hígado).

En LVC, la respuesta inmune está básicamente mediada por células T auxiliares, y la respuesta celular (Th 1) generalmente se asocia con la capacidad del huésped para controlar la infección mediante la producción de citoquinas proinflamatorias (interleucinas IL-2, IL-6 e IL-12, factor de necrosis tumoral - TN F- α e interferón gamma - IFN- γ), y la respuesta humoral (Th2) está correlacionada con la progresión de la enfermedad por la producción de citoquinas antiinflamatorias (IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13, y factor de transformación del crecimiento beta - TGF- β), siendo que la cantidad de anticuerpos producidos e inmunocomplejos formados puede generar desde un asintomático hasta múltiples manifestaciones clínicas, y cuyo período de incubación puede ser variable dependiendo del estado inmunológico del animal infectado.

ASPECTOS CLÍNICOS Y ALTERACIONES LABORATORIALES

A pesar de la aparente predisposición del Boxer, Rottweiler, Cocker Spaniel inglés y Pastor Alemán, principalmente machos, a desarrollar la enfermedad, cualquier raza de perro, tanto machos como hembras, puede verse afectada. En cuanto a la edad, la enfermedad se observa con mayor frecuencia en perros más jóvenes, hasta los 3 años de edad. posiblemente por la predisposición genética, o en los mayores de 7 años, por influencia de causas inmunodebilitantes con enfermedades crónicas, neoplasias, fármacos inmunomoduladores, coinfecciones, entre otras causas.

En cuanto al aspecto clínico, la LVC puede manifestarse con un amplio espectro de presentaciones y en diferentes grados de gravedad, no existiendo señales que se consideren específicas o patognomónicas de la enfermedad. Así, pueden ocurrir alteraciones clínicas relacionadas con cualquier órgano o sistema, como el cardio respiratorio, circulatorio, digestivo, genitourinario, locomotor, oftálmico, nervioso y, en particular, el tegumentario, siendo las manifestaciones clínicas más frecuentes observadas en el perro enfermo:



alopecia/hipotricosis (Figuras 2A y 2B). desqueratinización/seborrea (Figura 2A, 2B y 2C), onicogriposis (Figura 2B). Dermatitis ulcerosa erosionada y/o pápulo-nódulo-pustuloso (Figura 2D y 2E), hiperqueratosis nasodigital (Figura 2F), entre otros cambios cutáneos; linfadenomegalia (Figura 3A) Hepatoesplenomegalia; pérdida progresiva de peso/caquexia (Figura 3B), inapetencia o polifagia, diarrea; membranas mucosas pálidas (Figura 3C), letargo; poliuria, polidipsia, emesis; blefaritis, queratoconjuntivitis, uveítis, trastornos de endoftalmítis, vasculitis, cuadros hemorrágicos, epistaxis, disturbios de coagulación, artritis/poliartritis, osteomielitis, polimiositis, atrofia muscular (Figura 3D), y las menos frecuentes, incluyen variadas manifestaciones neurológicas, entre otras



Figura 2 - Perros con manifestaciones cutáneas de Leishmaniasis visceral, que presentan: A - Área de alopecia/hipotricosis con presencia de disqueratinización furfurérica, costras hemáticas (flechas), eritema y lignificación local; B- Uñas largas (onicogriposis), hipotricosis, eritema y escamas furfuráceas presentes en las patas delanteras, y también visibles en la mesa de consulta; C - Disqueratinización (seborrea) en la punta de la oreja (dermatosis marginal); D - Úlceras en la cara lateral de la región tarso-metatarsiana de la extremidad posterior; E - Dermatitis papulopustulosa en la región abdominal. con presencia de collares epidérmicos (flecha); F - Hiperqueratosis nasal.

Fuente: Msc. Mauricio Franco Zanette /Dr. Claudio Nazaretian Rossi.



Figura 3 - Animales con manifestaciones sistémicas de Leishmaniasis visceral canina que muestran: A - Ganglio linfático poplítico aumentado (linfadenomegalia - círculo), B- Estado nutricional magro, con evidencia de costillas bajo de la piel y músculos atrofiados C- Palidez de las membranas mucosas orales D - Atrofia de la musculatura temporal.

Fuente: Msc. Mauricio Franco Zanette/Dr. Claudio Nazaretian Rossi.

Dado que las alteraciones laboratoriales, similares a las clínicas, se consideran inespecíficas y pueden estar relacionados con problemas secundarios provocados por la propia enfermedad y/o comorbilidades (ej. hemoparasitosis) o complicaciones presentes (ej. enfermedad renal crónica – DRC). De esta forma, los estudios laboratoriales indicados para evaluación del estado general y las respectivas alteraciones más comúnmente verificadas en animales con LVC son: proteinograma (hiperproteinemia, hipoalbuminemia, con disminución de la relación albúmina: globulina); hemograma (eritrograma - anemia, particularmente del tipo regenerativo; leucograma -leucocitosis o leucopenia, linfopenia; hemostasia - trombocitopenia/citopatía, trastornos de la coagulación, fibrinólisis); análisis de orina (proteinuria; aumento del cociente proteína: creatinina urinaria - PCR); bioquímica sérica (azotemia renal: elevación del nivel de enzimas hepáticas).

El diagnóstico de LVC se basa en tres categorías principales de evidencia, utilizando los siguientes métodos: parasitológicos (para la identificación del parásito); serológicos (para la detección de anticuerpos anti-Leishmania sp.); y moleculares (para la amplificación del ADN del protozoo). Al no existir un método diagnóstico considerado 100% sensible y específico, cada uno de ellos tiene ventajas y desventajas y son indicados en función a los aspectos clínico-laboratoriales presentados por el animal y del momento de su infección.

DIAGNÓSTICO ESPECÍFICO

Para los perros que viven en áreas no endémicas de LV, es de suma importancia preguntar en el momento de la anamnesis si el animal nació, vivió y/o si visitó este tipo de región, ya que existe la posibilidad de que haya sido infectado por el parásito en estas ocasiones.

MÉTODOS PARASITOLÓGICOS

Los métodos parasitológicos tienen una alta especificidad (simplemente no permiten discernir los protozoos que causan las formas visceral y cutánea de Leishmaniasis), pero cuya sensibilidad está directamente relacionada con la carga parasitaria del animal infectado y puede variar en función de la muestra recogida, del tiempo transcurrido desde la infección y del momento de realización del examen. Se trata de técnicas indicadas para la detección del parásito en su forma amastigote (Figuras 4A y 4B), siendo que los métodos directos son los que se utilizan habitualmente en la práctica clínica debido a la facilidad de recogida (mediante decalque de lesión cutánea erosionante y/o citología por aspiración mediante aguja fina de lesiones cutáneas papulonodulares tumorales y/o de órganos linfoides, particularmente a partir de linfonodos y/o médula ósea) y ejecución del estudio (coloración hematológica de rutina - Panotíc rápido, o aún, Giemsa, Leishman, Rosenfeld, entre otros; lectura bajo microscopía óptica - aumento 1000x, inmersión).

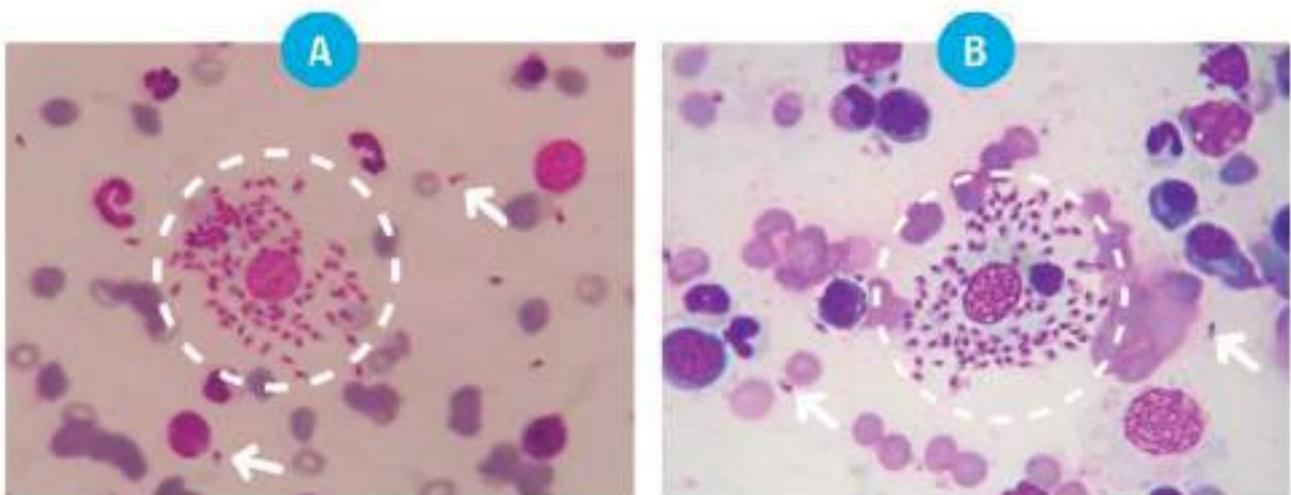


Figura 4 - Exámenes citológicos de ganglios linfáticos poplíteos (A) y médula ósea (B) de perros con Leishmaniasis visceral que identifican amastigotes de *Leishmania* sp extracelular (flechas) y macrófagos internos (encerrados en círculos) (color panóptico, microscopía óptica, aumento de 1000x) - inmersión).

Fuente: Msc. Mauricio Franco Zaneue/Dr. Claudio Nazaretian Rossi.

MÉTODOS SEROLÓGICOS

En cuanto a las pruebas serológicas, en general tienen una alta sensibilidad y especificidad, sin embargo, no están indicados en los primeros 3 a 5 meses de infección, particularmente en animales asintomáticos (ventana inmunológica o de seroconversión, que es el tiempo que transcurre entre la infección y la formación de anticuerpos anti-Leishmania sp. susceptibles de ser detectados por estos métodos). Existen, habitualmente disponibles en el mercado nacional, tanto métodos serológicos cualitativos como aquellos considerados cuantitativos.

En relación con el primero (pruebas comerciales rápidas - inmunocromatográficas, ELISA). tienen la ventaja de proporcionar resultados rápidos. sin embargo, están indicados como métodos de cribado, siendo recomendado, en los casos positivos, que se proceda a la confirmación del diagnóstico por otros métodos (serológico cuantitativo, parasitológico y/o molecular, entre otros).

En cuanto a las técnicas serológicas cuantitativas, las que se utilizan generalmente en la rutina clínica son el ensayo inmunoenzimático (ELISA) y la reacción de inmunofluorescencia indirecta (RIFI), siendo posible, para ambas, cuantificar el nivel de anticuerpos circulantes contra el agente. Mediante el método ELISA es necesario conocer el punto de corte de la reacción (cut-off, estandarizado por el laboratorio que realiza la prueba), y de la densidad óptica del animal testado (DO), donde son considerados negativos por ésta técnica animales con DO bajo el punto de corte de la reacción, y aquellos con DO por encima de ese valor, se dice que son positivos para LVC. En cuanto a estos resultados, cabe señalar que existe un consenso mundial de que se pueden considerar positivos directamente sólo por este medio los casos en los cuales el animal estudiado presenta DO por lo menos 2 a 4 veces por encima del punto de corte de la reacción.

En cuanto a RIFI, en Brasil, los animales con títulos $\geq 1:40$ se consideran positivos para la enfermedad, sin embargo, se considera consensualmente a nivel internacional, como determinante el conocimiento del título más alto presentado por el perro estudiado (conocido como titulación o dilución completa o total). ya que se sugiere que los animales con títulos serológicos de hasta 1: 80 sean considerados como sospechosos de LVC, es decir, solo títulos $\geq 1: 160$ sería confirmatorio para el diagnóstico de la enfermedad directamente por esta técnica.

En Brasil. Las pruebas serológicas son las indicadas para el diagnóstico de la enfermedad por el Programa de Vigilancia y Control de LVC del Ministerio de Salud, siendo el inmunocromatográfico (DPP) recomendado como método de cribado animal, y el ELISA con examen confirmatorio en casos positivos por el primero.

MÉTODOS MOLECULARES

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) permite la identificación y amplificación de secuencias de ADN del parásito a partir de material de diferentes tejidos, en particular órganos linfoides (ganglios linfáticos, médula ósea, hígado) y de biopsias de piel (incluyendo cortes histológicos de tejidos parafinados y congelados), entre otros (hisopado de conjuntiva, sangre, licor y vector). Se considera el método de diagnóstico más sensible en las primeras etapas de la infección, especialmente si el material proviene de órganos linfoides.

En cuanto a la técnica de PCR empleada, aquellas en tiempo real tienen una mayor sensibilidad comparativamente frente a las convencionales, ya que, en las primeras, el riesgo de contaminación de la muestra es menor dado que se trata de una técnica cerrada. Además, por medio de la misma se puede cuantificar la carga parasitaria por la posibilidad de determinar el número de copias de ADN presentes en la muestra biológica, lo que se considera importante cuando se realiza el seguimiento del paciente en terapia o tras el tratamiento de LVC.

OTROS METODOS

El diagnóstico también puede establecerse mediante el uso de examen histopatológico, inmunocito/histoquímica, intradermorreacción (evaluación de la respuesta inmunitaria celular cutánea mediante una reacción de hipersensibilidad retardada), citometría de flujo (para detectar la proporción de linfocitos CD4+/CD8+), cultivo del parásito, inoculación experimental en animales de laboratorio y xenodiagnóstico (detección y aislamiento del agente mediante su vector natural).

Así, ante la posibilidad de resultados falsos positivos o negativos, dependiendo de la técnica utilizada, se recomienda que en infecciones naturales de la enfermedad se empleen múltiples métodos de diagnóstico, ya que una sola técnica puede no identificar a todos los animales parasitados, en la dependencia, en particular, del tipo de respuesta inmune que presenta el huésped y el tiempo transcurrido entre su infección y el momento del diagnóstico (Figura 5).

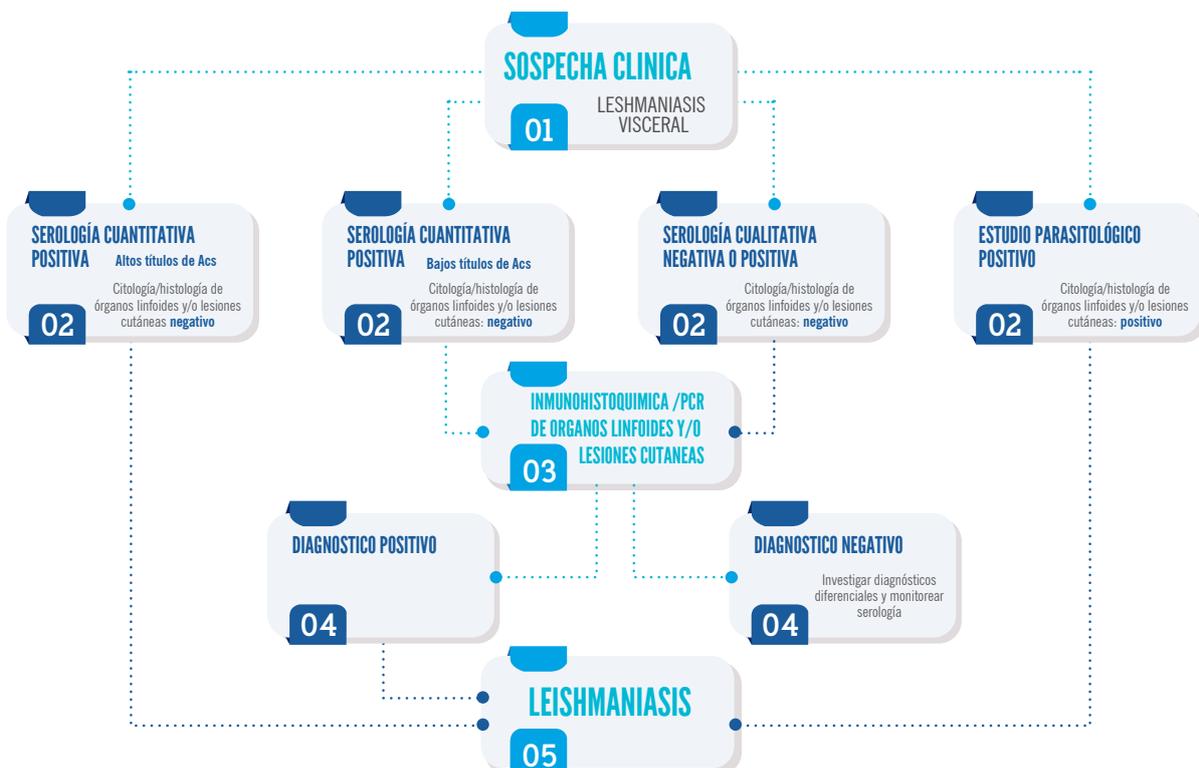


Figura 5: Diagrama de flujo sugerido para el diagnóstico de Leishmaniasis visceral canina. Acs = anticuerpos.

ESTADIFICACIÓN CLÍNICA DE LA ENFERMEDAD CANINA

Los animales con CVL se insertan en diferentes estadios de la enfermedad según los cambios clínicos, patológicos y serológicos que presenten. El propósito de la estadificación es agrupar a los animales que se encuentran en el mismo grado de afectación de la enfermedad para luego indicar la terapia más adecuada para su manejo y el pronóstico probable. Algunos sistemas han sido propuestos por diferentes grupos de investigadores en el mundo, como el de Brasileish, CLWG y LeishVet.

Recientemente (2018), Brasileish propuso que la estadificación de LVC se divida en 5 etapas, que incluyen perros expuestos y sin enfermedad, los infectados asintomáticos, sintomáticos, sin y con alteración renal, incluso en animales con ERC grave, de la siguiente manera:

- **Estadio I (expuesto/sin enfermedad):** sin manifestaciones clínicas o alteraciones laboratoriales detectables; con diagnóstico serológico de reactivo con título bajo (prueba cualitativa rápida, ELISA con DO bajo y/o RIFI con titulación hasta 1: 80 y sin confirmación parasitológica por otros diagnósticos métodos;
- **Estadio II (sin enfermedad/enfermedad leve):** señales clínicas de leves a ausentes (linfadenopatía periférica, dermatitis papular, pérdida de peso discreta), generalmente sin alteraciones laboratoriales (perfil renal normal); con diagnóstico serológico reactivo (ELISA y/o RIFI con títulos serológicos bajos a medios), y diagnóstico parasitológico confirmado, (citología, cultivo, PCR y/o IHQ);
- **Estadio III (enfermedad moderada):** con evidencias clínicas (lesiones mucocutáneas como onicogrifosis, úlceras, disqueratinización, además de manifestaciones sistémicas, como anorexia, pérdida progresiva de peso), alteraciones laboratoriales (anemia leve no regenerativa, hipergammaglobulinemia, síndrome de la hiperviscosidad del suero secundaria a hiperproteinemia - proteínas totales con títulos elevados, hasta > 12g/dl - y con la consecuente posibilidad de formación de inmunocomplejos - uveítis, glomerulonefritis, artritis; Subestados: A) perfil renal normal - creatinina <1,4 mg/dl, PCR <0,5; B) perfil renal con alteración - creatinina <1,4 mg/dl, PCR entre 0,5-1); 0 reactivo de diagnóstico serológico (ELISA y/o RIFI con títulos de anticuerpos bajos o altos; diagnóstico parasitológico confirmado (metodología, cultivo, PCR y/o IHQ);
- **Estadio IV (enfermedad grave):** con evidencia clínica del estadio III asociado con la progresión de la enfermedad renal; alteraciones laboratoriales (las descritas en el estadio III, así aquellas relacionadas a DRC en estadios I, con RPC > 1, o II en la escala IRIS, con valores de creatinina sérica entre 1.4-2mg/dl); además del diagnóstico serológico reactivo (ELISA y/o RIFI con títulos serológicos medios a altos) y diagnóstico parasitológico confirmado (citología, cultivo, PCR y/o IHQ);
- **Estadio V (enfermedad muy grave):** con manifestaciones clínicas presentes en los estadios previos, así como aquellas relacionadas con la enfermedad renal en sus estadios finales con tromboembolismo pulmonar y/o síndrome nefrótico; alteraciones laboratoriales (las de los estadios anteriores, aparte de la DRC en el estadio III, con creatinina entre 2,1-3 mg/dl, o IV en la escala IRIS, con niveles séricos de creatinina > 5 mg/dl, o incluso cuadro compatible con síndrome nefrótico, con marcada proteinuria y PCR también > 5); además del diagnóstico serológico reactivo (ELISA y/o RIFI con títulos de anticuerpos medios a altos y diagnóstico parasitológico confirmado (citología, cultivo, PCR y/o IHQ).

TRATAMIENTO Y PRONÓSTICO

Como se indicó anteriormente, los animales con LVC se dividen en estadios clínicos de acuerdo con las manifestaciones clínicas y de laboratorio y los métodos de diagnóstico utilizados para diagnosticar la enfermedad. El tratamiento está indicado en su forma multimodal, es decir, asociando un fármaco leishmanicida (actúa eliminando parásitos) asociado a leishmaniostático (tiene como objetivo evitar la replicación del protozoo), inmunoestimulante (mejora la respuesta inmunitaria contra el parásito), y/o inmunomodulador (ayuda a la mejoría clínica, disminuyendo la respuesta inflamatoria y formación de inmunocomplejos). Además, es fundamental que el animal en terapia reciba tratamiento de apoyo, según la necesidad, dada su situación clínica, así como estar desverminado, usar ectoparasiticida de forma continua, inmunizado contra otras enfermedades infecciosas, y monitoreado clínico y de laboratorio frecuentemente durante toda la vida. El pronóstico es variable según el estadio en el que se encuentra el animal, yendo de bueno (estadios I e II), bueno a reservado (estadio III), reservado a desfavorable (etapa IV), hasta bastante desfavorable (estadio V), de acuerdo a la estadificación clínica previamente descrita.

CONTROL Y PREVENCIÓN

En virtud a las características epidemiológicas y del aún insuficiente conocimiento de los distintos elementos que componen la cadena de transmisión del LVC, las estrategias de control señaladas por la Fundación Nacional de Salud (FUNASA) están enfocadas a la eliminación del reservorio (perro seroreactivo); lucha contra el vector mediante la aspersión de repelentes/insecticidas (piretroides, organoclorados, organofosforados), del manejo ambiental para la reducción de la proliferación de flebótomos (evitar la acumulación de materia orgánica), y actividades de educación sanitaria; y el diagnóstico y tratamiento precoces y reducción del riesgo de infección en humanos.

En ese contexto, cuando se trabaja en la prevención de la LVC, lo ideal es trabajar con el concepto de **Double Defense** (Doble Defensa),

enfoque multimodal basado en el concepto de proteger el animal tópicamente mediante activos con acción repelente/insecticida (pipetas y/o collares), controlando los flebotomíneos, vectores naturales de la enfermedad; y de forma sistemática, mediante el uso de productos que tengan acción contra el protozoo, ya sea frenando su desarrollo o eliminándolo mediante el estímulo de la respuesta inmune del animal para actuar contra el parásito mediante el uso del inmunógeno (vacuna recombinante **Leish-Tec®**). Es decir, el protocolo de **Doble Defensa** para LVC consiste en utilizar dos herramientas para protección del animal: la protección externa, contra el vector, con producto tópico repelente e insecticida (como el **Vectra 3D®**), y la protección interna, con el uso de una vacuna que estimula la inmunidad celular del perro contra el parásito (**Leish-Tec®**, la única vacuna aprobada en Brasil para este propósito).

VACUNA LEISH-TEC®

Leish-Tec® es una vacuna recombinante contra LVC, siendo considerada una forma efectiva de controlar la enfermedad canina protegiendo al animal de la enfermedad y minimizando el riesgo de que se convierta en un reservorio potencial del parásito y, por lo tanto, en una fuente de infección para los insectos vectores. Es recomendado asociar su uso con otros métodos preventivos contra el vector (como el **Vectra 30® = Double Defense**).

VACUNA RECOMBINANTE

Las vacunas recombinantes son derivadas de modificaciones genéticas en microorganismos y pueden estar compuestas de proteína o virus recombinante y tienen la ventaja de permitir una evaluación detallada de la respuesta inmune inducida por la inmunización. Además, este tipo de tecnología permite el uso de antígenos extremadamente bien caracterizados, en que todas las propiedades inmunogénicas (epítomos) de las diferentes porciones de la molécula puedan ser identificadas y caracterizadas.

De esta forma, se pueden solucionar los inconvenientes de las vacunas constituidas por porciones purificadas directamente del parásito y la presencia de epítomos que pueden estar asociados a mecanismos supresores de la respuesta inmune y la evasión típicas del microorganismo. En ambos casos, se tiene la eliminación del patógeno para dejar espacio a un activo que no tiene relación con la enfermedad, lo que hace que el producto sea altamente seguro y capaz de inducir una respuesta inmunitaria protectora.

La fabricación de vacunas recombinantes implica la manipulación de un microorganismo modificado genéticamente, por lo que es necesario seguir criterios estrictos que cumplan con los Estándares de Bioseguridad y los Estándares de Buenas Prácticas de Fabricación (BPFs).

PROTEINA A2

La proteína A2 es considerada el antígeno de Leishmania mejor caracterizado hasta la fecha, siendo específico del estadio amastigote de varias especies del parásito, inclusive de la *L. infantum chagasi*, lo que es importante debido a la posibilidad de inducción de protección cruzada entre diferentes especies. Se han detectado anticuerpos anti-A2 en muestras de suero de pacientes y perros afectados por LV, lo que demuestra que la proteína A2 es altamente antigénica y por tanto, tiene un gran potencial como antígeno de la vacuna. Se trata de proteína



que representa el primer factor de virulencia amastigotaespecífico, lo que es importante por la posibilidad de inducir respuesta inmune protectora contra la LVC.

FASES DE DESARROLLO DE LA VACUNA

Para el desarrollo de vacunas anti-LVC, es exigido por el Ministerio de Agricultura, Abastecimiento y Ganadería IMAPAI realizar pruebas de seguridad, eficacia, inocuidad, infección e inmunogenicidad de las vacunas, y prueba de los resultados clínicos, realizados a través de ensayos de Fase I, II y III. Así, fué demostrado que la inmunización con el antígeno A2 fue capaz de inducir una protección significativa contra la infección por *L. donovani* y *L. amazonensis* y *L. infantum chagasi* en el estudio de ratones (Fase I), y de manera similar en perros (estudio de fase II y III). La vacuna Leish-Tec® tiene una protección individual del 92 al 96%.

PRESENTACION E INFORMACIONES TECNICAS

La vacuna está compuesta por el activo A2 (proteína recombinante), adyuvante (saponina) y excipiente/conservante (solución salina tamponada/timerosal), lo que constituye el volumen total de 1 ml por dosis.

La vacuna estimula el sistema inmunológico (respuesta celular, debido a la presencia de proteína A2) para combatir el parásito si el flebotoma infectado pica al perro, es decir, como cualquier vacuna, el propósito es mejorar la respuesta inmunitaria del animal contra el agente, pero no previene su infección por el vector, ya que no tiene acción repelente/insecticida. Por ello, se recomienda utilizarlo siempre asociado a un producto contra el vector (**Vectra 3D®**).

Se debe enfatizar la intención de la vacunación con Leish-Tec® es la promoción del estímulo inmunológico apropiado para que el perro desarrolle una respuesta inmune adecuada para eliminar el parásito o al menos prevenir/minimizar la posible aparición de manifestaciones clínicas de Leishmaniasis. Además, al promover la estimulación predominante de la respuesta celular, no hace que la serología del animal después de la vacunación sea positiva por solo inducir la producción de anticuerpos anti-A2 (no detectados en las serologías convencionales disponibles para el diagnóstico de la enfermedad).

Leish-Tec® está indicado para perros a partir de los 4 meses de edad asintomáticos y seronegativos para LVC (por cualquier método serológico).

PROTOCOLO DE LA VACUNACIÓN

Para los perros que inicien la vacunación con **Leish-Tec®** se deberá respetar el siguiente protocolo: vacunación primaria en perros a partir de los 4 meses de edad, con 3 (tres) dosis de la vacuna a intervalos de 21 días entre dosis, por vía subcutánea.

Si el retraso o anticipación en **una de las dosis** de la vacunación primaria (3 dosis en total) es de hasta 7 días (1 semana), no es necesaria ninguna dosis adicional de la vacuna. Si el retraso en **una de las dosis** de la primera vacunación supera los 7 días y un máximo de 4 semanas), se recomienda administrar una 4ª dosis adicional de la vacuna. En los casos en los que el retraso en **una de las dosis** sea superior a 4 (cuatro) semanas, se recomienda reiniciar el protocolo de vacunación completo (3 dosis). Por tanto, el retraso o anticipación de hasta 7 días solo es válido para **una de las dosis de la primera vacunación**.

El certificado de vacunación debe ser firmado por el responsable del perro al iniciar el protocolo de vacunación, individualmente para cada animal, que debe ser obtenido en el sitio [web **http://leishtec.com.br/**](http://leishtec.com.br/) por el veterinario. Es necesario conservar el certificado durante al menos 3 años, según lo recomendado por MAPA.

En la revacunación anual, se debe aplicar una dosis de **Leish-Tec®** (por vía subcutánea, siendo que debe contar **1 (un) año desde la fecha de la primera dosis de vacuna administrada en la primera vacunación** (NO desde la 3ª dosis). En caso de retraso, puede ser hasta 4 (cuatro) semanas, manteniéndose la indicación de dosis única en este caso, pero se recomienda rehacer el protocolo completo (3 dosis) con un retraso superior a 4 (cuatro) semanas desde la fecha ideal de revacunación anual.



POSIBLES REACCIONES ADVERSAS

Al igual que con cualquier producto biológico, las manifestaciones clínicas pueden surgir de reacciones de hipersensibilidad, que deben tratarse inmediatamente de acuerdo con la orientación de un médico veterinario.

La saponina tiene una acción importante en la estimulación de la respuesta inmune, pero eventualmente puede promover manifestaciones clínicas transitorias en el sitio de aplicación, particularmente: dolor, pápula/nódulo, edema, cambio de color de la piel, hipotricosis/alopecia o incluso reacciones de hipersensibilidad alérgica con la posibilidad de picor, eritema y/o placas cutáneas, fiebre y, en raras ocasiones, vómitos, diarrea, angioedema o incluso anafilaxia.

FACTORES QUE PUEDEN INTERFERIR EN LA RESPUESTA A LA VACUNA

- El calor por sí solo no interferiría con la respuesta a la vacuna, la única advertencia sería el nivel de estrés del animal (que podría disminuir la efectividad de la vacuna);
- En cuanto al embarazo, la recomendación es evitar vacunar a la perra en esta etapa. La vacunación no debe causar ningún daño al feto ni a la hembra gestante, ya que no hay replicación en el animal y, por tanto, es completamente segura. La explicación es que si ocurre una reacción alérgica o anafiláctica (rara, pero posible), el animal debe ser tratado y esto podría causar algún daño al feto;
- En el caso de las hembras lactantes, se recomienda esperar al período de lactancia, no porque comprometa a los cachorros, sino porque podría disminuir la eficacia de la vacunación (si el perro está estresado o debilitado).

CONTRAINDICACIONES

- NO apto para uso en felinos;
- NO se recomienda vacunar con el uso concomitante de antiinflamatorios no esteroides o esteroides durante un período prolongado. porque pueden interferir con la respuesta a la vacuna, especialmente los esteroides cuando se administran en una dosis inmunosupresora;
- NO se recomienda vacunar a los animales que están en terapia con antibióticos sistémicos, porque se están administrando y porque el animal tiene alguna enfermedad subyacente *, que puede interferir con la respuesta a la vacuna.

* **NOTA:** la recomendación es vacunar siempre a los animales SANOS.

REFERENCIAS

- BRASILEISH - Grupo de estudio de Leishmaniasis animal. Directrices para el diagnóstico, estadificación, tratamiento y prevención de la Leishmaniasis canina, 16p., 2018. Disponible en: <http://brasileish.com.br/diretrizes.html>. Accedido e 11/10/2019.
- COELHO, E.A.; TAVARES, C.A.; CARVALHO, F.A.; CHAVES, K.F.; TEIXEIRA, K.N.; RODRIGUES, R.C. Las respuestas inmunes inducidas por el antígeno A2 de Leishmania (Leishmania) donovani, pero no por el antígeno LACK, protegen contra la infección, la infección y la inmunidad experimentales por Leishmania (Leishmania) amazonensis., V. 71, n. 7, p. 3988-3994, 2003.
- FERNANDES, A.P.; COSTA, M.M.S.; COELHO, E.A.F.; MICHALICK, M.S.M.; FREITAS, E.; MELO, M.N.; TAFURI, W.L.; RESENDE, O.M.; HERMONT, V.; ABRANTES, C.F.; GAZZINELLI, R.T. Inmunidad protectora frente al desafío con Leishmania (Leishmania) chagasi en perros beagle vacunados con proteína A2 recombinante. Vacuna. v. 26, p. 5888-5895, 2008.
- FERNANDES, A.P.; COELHO, E.A.; MACHADO-COELHO, G.L.; GRIMALDI Jr., G.; GAZZINELLI, R.T. Elaboración de una vacuna anti-amastigota para la Leishmaniasis visceral: racional, actualización y perspectivas. Opinión actual en microbiología, v. 15, p. 476-485, 2012
- GHEDIN, E.; CHAREST, H.; MATLASHEWSKI, G. A2rel: un gen de Leishmania expresado constitutivamente vinculado a un gen específico de la etapa de amastigote. Parasitología molecular y bioquímica, v. 93, n. 1, p. 23-29, 1998.
- MARCONDES, M. Leishmaniose. In: LARSSON, C.E.; LUCAS, R. Tratado de Medicina Externa: Dermatología Veterinaria. 1. ed., pp. 313-344, 2016.
- MELENDEZ-LAZO, A.; ORDEJX, L.; PLANELLAS, M.; PASTOR, J.; SOLANO-GALLEGO, L. Hallazgos clínico-patológicos en perros enfermos naturalmente infectados con Leishmania infantum: Comparación de cinco sistemas de clasificación clínica diferentes. Investigación en Ciencias Veterinarias, v. 117, p. 18-27, 2018.
- PALTRINIERI, S.; GRADONI, L.; ROURA, X.; ZATELLI, A.; ZINI, E. Pruebas de laboratorio para el diagnóstico y seguimiento de la Leishmaniasis canina. Patología Clínica Veterinaria, v. 4, p. 552-578, 2016.
- PALTRINIERI, S.; SOLANO-GALLEGO, L.; FONDATI, A.; LUBAS, G.; GRADONI, L.; CASTAGNARO, M.; CROTTI, A.; MAROLI, M.; OLIVA, G.; ROURA, X.; ZATELLI, A.; ZINI, E. Directrices para el diagnóstico y clasificación clínica de la Leishmaniasis en perros. Revista de la Asociación Americana de Medicina Veterinaria, v. 236, p.1184-1191, 2010.
- REGINA-SILVAS: FERES, A.M.L.T.; FRANCO, J.C.; DIAS, E.S.; MICHALSKY, E.M.; ANDRADE, H.M.; COELHO, E.A.F.; RIBEIRO, G.M.; FERNANDES, A.P.; MACHADO-COELHO, G.L.L. Ensayo de campo aleatorizado para evaluar la eficacia de la vacuna Leish-Tec® contra la Leishmaniasis visceral canina en una zona endémica de Brasil. Vacuna, v. 34, n. 19, p. 2233-2239, 2016.
- SOLANO-GALLEGO, L.; KOUTINAS, A.; MIRO, G.; CARDOSO, L.; PENNISI, M.G.; FERRER, L.; BOURDEAU, P.; OLIVA, G.; BANETH, G. Instrucciones para el diagnóstico, estadificación clínica, tratamiento y prevención de la leishmaniosis canina. Parasitología veterinaria, v. 165, p. 1-18, 2009.
- SOLANO-GALLEGO, L.; MIRO, G.; KOUTINAS, A.; CARDOSO, L.; PENNISI, M.; FERRER, L.; BOURDEAU, P.; OLIVA, G.; BANETH, G. Directrices LeishVet para el tratamiento práctico de la leishmaniosis canina. Parásitos y vectores, v. 4, n. 86, p. 1-16, 2011.
- TESTASICCA, M.C.; dos SANTOS, M.S.; MACHADO, L.M.; SERUFO, A.V.; DORO, D.; AVELAR, D.; TIBURCIO, A.M.; ABRANTES, C.F.; MACHADO-COELHO, G.L.; GRIMALDI, G. Jr.; GAZZINELLI, R.T.; FERNANDES, A.P. Respuestas de anticuerpos inducidas por Leish-Tec®. una vacuna de base A2 para la Leishmaniasis visceral, en una población canina heterogénea. Parasitología veterinaria, v. 204, n. 3-4, p. 169-176, 2014.
- TOEPP, A.; LARSON, M.; GRINNAGE-PULLEY, T.; BENNETT, C.; ANDERSON, M.; PARRISH, M.; FOWLER, H.; WILSON, G.; GHARPURE, R.; COTTER, C.; PETERSEN, C. Análisis de seguridad de la vacuna contra Leishmania utilizada en un ensayo de inmunoterapia/vacuna canina aleatorizado. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, en línea, 2018.
- ZANIN, F.H.C.; COELHO, E.A.; MARQUES-DA-SILVA, E.; SILVA COTA, M.M.; REZENDE, S.A.; GAZZINELLI, R.T.; FERNANDES, A.P. Evaluación de las respuestas inmunitarias y la protección inducida por las vacunas de ADN A2 y nucleósido hidrolasa (NH) frente a infecciones experimentales de Leishmania chagasi y Leishmania amazonensis. Microbios e infección. v. 9, n. 9, p.1070-1077, 2007.



Representado en Paraguay por:

cedivep S.R.L.
CENTRO DE DIAGNOSTICO VETERINARIO DEL PARAGUAY

 San Lorenzo N° 467 / San Lorenzo, Paraguay

 (595 21) 584 085 (R.A.)

 0981) 576 667 TIGO *2334 (CEDI)

 www.cedivep.com.py

