



## ORIGINAL ARTICLE /ARTÍCULO ORIGINAL

### DETERMINATION OF SOMATIC ANTIGENS AND EXCRETION-SECRETION OF *LEISHMANIA PERUVIANA* FOR ELECTROBLOTTED USING IGY PRODUCED IN *GALLUS GALLUS* EXPERIMENTALLY IMMUNIZED

### DETERMINACIÓN DE ANTÍGENOS SOMÁTICOS Y DE EXCRECIÓN-SECRECIÓN DE *LEISHMANIA PERUVIANA* POR ELECTROINMUNOTRANSFERENCIA UTILIZANDO IGY PRODUCIDOS EN *GALLUS GALLUS* INMUNIZADOS EXPERIMENTALMENTE

Luis Emilio Carranza-Quispe<sup>1</sup> & Hermes Mario Escalante-Añorga<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Escuela de Medicina, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Regional Autónoma de los Andes, Ambato, Ecuador.

<sup>2</sup>Escuela Académico Profesional de Microbiología y Parasitología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional de Trujillo, Trujillo, Perú.

E-mail: luisemilio36@gmail.com

The Biologist (Lima), 13(2), jul-dec: 349-358.

## ABSTRACT

---

The purpose of this study was to determine the somatic and excretory-secretory antigens by *Leishmania peruviana* electroblotted using IgY antibodies produced by immunized experimental *Gallus gallus*. Antigens were obtained by centrifugation of promastigotes grown at 37 °C for 20 h in Minimum Essential Medium-Eagle (MEM-Sigma), the supernatant containing the excretory-secretory antigens and somatic antigens sediment. For the anti-leishmania antibodies IgY, two hens were immunized first with the excretory-secretory antigens and the second with somatic antigens. When faced with *L. peruviana* antigens with IgY it was noted that somatic antigens produced ten antigenic bands with molecular weights of 10, 12, 17, 20, 31, 38, 69, 87, 93 and 105 kDa; with excretory-secretory antigens nine antigenic bands of molecular weights of 17, 20, 31, 52, 67, 78, 87, 93 and 105 kDa were produced, observing five common antigens 20, 31, 87, 93 and 105. Such somatic and excretory-secretory antigens by promastigotes of *L. peruviana* that have been detected by electroblotting technique could be used in the future for diagnosis of cutaneous leishmaniasis.

---

**Keywords:** excretory-secretory antigens, somatic antigens, IgY, *Leishmania peruviana*, leishmaniasis, promastigotes, Western Blot.

## RESUMEN

---

La finalidad del presente estudio fue determinar los antígenos somáticos y de excreción-secreción de *Leishmania peruviana* por electroinmunotransferencia utilizando anticuerpos IgY producidos en *Gallus gallus* inmunizados experimentalmente. Los antígenos fueron obtenidos por centrifugación de promastigotas cultivados a 37°C por 20 h en Minimum Essential Medium-Eagle (MEM-Sigma), el sobrenadante contenía a los antígenos de excreción-secreción y el sedimento a los antígenos somáticos. Para obtener los anticuerpos IgY anti-leishmania, se inmunizaron dos gallinas, a la primera con antígenos de excreción-secreción y a la segunda con antígenos somáticos. Al enfrentar los antígenos de *L. peruviana* con la IgY se observó que los antígenos somáticos produjeron diez bandas antigénicas con pesos moleculares de 10, 12, 17, 20, 31, 38, 69, 87, 93 y 105 kDa; y los antígenos de excreción-secreción nueve bandas antigénicas de pesos moleculares de 17, 20, 31, 52, 67, 78, 87, 93 y 105 kDa, observándose cinco antígenos comunes de 20, 31, 87, 93 y 105. Dichos antígenos somáticos y excreción-secreción de promastigotas de *L. peruviana* que han sido detectados por la técnica de inmunoelectrotransferencia podrían ser utilizados en un futuro para el diagnóstico de leishmaniasis cutánea.

---

**Palabras clave:** antígenos de excreción-secreción, antígenos somáticos, Ig Y, *Leishmania peruviana*, leishmaniasis, promastigotas, Western Blot.

## INTRODUCCIÓN

---

Las especies del género *Leishmania* son los agentes causales del grupo de enfermedades denominadas leishmaniasis, que tienen una variada gama de manifestaciones clínicas. Estas pertenecen al grupo de protozoarios que pueden causar enfermedad a los animales y al hombre, siendo transmitidos por mosquitos vectores denominados flebotominos (Reithinger *et al.* 2007). Globalmente se ha estimado que existe de 1,5 a 2 mill de nuevos casos y 70000 mueren cada año, además 350 mill de personas se encuentran en riesgo de ser infectadas y contraer la enfermedad (WHO 2010).

La infección con leishmania típicamente es por vía vectorial, por mosquitos *Phlebotomus* spp. (En Europa, Norte de África, Medio Oriente y

Asia) o *Lutzomyia* spp. (Desde el sur de USA hasta el norte de Argentina) (Killick-Kendrick 1999). La transmisión no vectorial es rara pero se da en forma experimental o accidental en laboratorios (Herwaldt 2001). El ciclo de transmisión se adaptando al ambiente peridoméstico y se está extendiendo a zonas no endémicas como resultado de la urbanización y deforestación, teniendo como potenciales reservorios a animales domésticos, donde la transmisión puede ser antroponótica o zoonótica. Esta interacción entre el cambio ambiental urbano y los mosquitos vectores son requisito previo para la enfermedad (WHO 2002).

Las Leishmanias tienen como hospederos específicos al mosquito vector, que en el intestino se desarrolla la forma móvil flagelada denominada promastigotes, y a los macrófagos de mamíferos, donde crecen intracelularmente como amastigotes con flagelado

indiferenciado. La leishmaniasis es el resultado de una carrera evolutiva entre el sistema inmunitario del huésped y los mecanismos de evasión del parásito que garanticen la supervivencia y la transmisión en la población. El espectro de las manifestaciones de la enfermedad y la severidad refleja la interacción entre el genoma del huésped y la del parásito, y la patología es causada por una combinación de acogida y las moléculas del parásito (Handman *et al.* 2005).

La leishmaniasis cutánea es endémica en más de 70 países del mundo, el 90% de casos ocurren en Afganistán, Argelia, Brasil, Pakistán, Perú, Arabia Saudita y Siria (Desjeux 2004). La prevalencia de la leishmaniasis cutánea incrementa con la edad a partir de los 15 años, la infección puede continuar hacia el grupo familiar, debido al corto rango de vuelo del vector (Killick-Kendrick 1999), así como la transmisión antroponótica (Brooker *et al.* 2004) y la susceptibilidad genética (Castellucci *et al.* 2005). Anualmente se presentan 1,5 mill de nuevos casos, de las cuales sólo alrededor de 600 000 infecciones son oficialmente registradas. Se estima que 12 mill de personas en todo el mundo actualmente infectadas (WHO 2010). El mejor diagnóstico y la notificación de los casos hacen que los registros estadísticos vayan aumentando. Además la asociación con infecciones oportunistas (VIH/SIDA) y la emergencia de la resistencia a las drogas antileishmaniasicas van aumentando debido al deficiente control vectorial y control de reservorios (WHO 2000).

El aumento del riesgo de infección es mediada a través de malas condiciones de vivienda y saneamiento ambiental, la falta de medidas de protección personal y conducido económicamente la migración y el empleo que dan los ejércitos no inmune en contacto con moscas de arena infectadas. La pobreza está asociada con la malnutrición y otras

enfermedades infecciosas, que aumentan el riesgo que una persona (una vez infectados) manifieste clínicamente la enfermedad (Alvar *et al.* 2006).

El primer signo de la infección es un típico eritema pequeño en donde el mosquito infectado pica al hospedero, luego el eritema se desarrolla en una pápula, luego en un nódulo que se ulcera progresivamente en un periodo de dos semanas a seis meses hasta llegar a ser la lesión característica de la LCL. Las lesiones de LCL varían en severidad, en apariencia clínica y tiempo de cura. Cuando los nódulos son diseminados y no ulcerativos desde el inicio de la infección es LCD. Cuando afecta a las mucosas es LMC que trae una serie de complicaciones con *L. braziliensis* ya que pueden desfigurar al paciente (Peters & Killick-Kendrick 1987).

Dependiendo de la especie de *Leishmania*, la resistencia a la infección es generalmente asociadas a la respuesta inmune del tipo T helper 1 que activa a los macrófagos para destruir intracelularmente a la *Leishmania* a través del óxido nítrico-dependiente, estimulados por el IFN  $\gamma$  y IL-2 (Soong 2008). Por el contrario, la progresión de la enfermedad se asocia generalmente con una respuesta de tipo T helper 2 que activa la inmunidad humoral, estimuladas por la IL-4, IL-10 (Qi *et al.* 2001). Estudios actuales han demostrado un papel perjudicial del IFN dado que los parásitos *Leishmania* preferentemente infectan y se replican dentro de los macrófagos activando la respuesta inmune celular favoreciendo la replicación del parásito y la infección de nuevos macrófagos, lo que podría promover la progresión de la enfermedad en lugar de controlar la infección (Xin *et al.* 2010).

Las investigaciones diagnósticas tradicionales se basan en la identificación de amastigotes por histología o la microscopía directa, y el crecimiento de promastigotes en cultivo.

Diagnóstico por la reacción en cadena de la polimerasa parece estar acercándose a un "estándar de oro" con una especificidad del 100% compatible con el aumento de la sensibilidad que se sitúa entre 92% y 98% (Vega-López 2003).

Los antígenos ya sean somáticos y/o de excreción-secreción de distintos microorganismos vienen siendo estudiado y evaluados para ser usados en diagnóstico o posibles vacunas de enfermedades parasitarias, como las producidas por *Leishmania chagasi* Nicolle, 1908 (Vale *et al.* 2009), *Trypanosoma cruzi* (Chapas, 1909) (Berrizbeitia *et al.* 2006), *Dirofilaria immitis* (Leidy, 1856) (Duménigó-Ripoll *et al.* 1991), *Gnathostoma binucleatum* Almeyda-Artigas, 1991 (Caballero-García *et al.* 2005), *Toxoplasma gondii* (Nicolle & Manceaux, 1908) (Meira *et al.* 2008), *Taenia solium* Linnaeus, 1758 (Escalante *et al.* 2001), *Hymenolepis nana* (Von Siebold, 1852) Blanchard, 1892 (Chávez-Salas *et al.* 2007), así como para el inmunodiagnóstico de Mycobacterias (Matsuo *et al.* 1990).

Los anticuerpos obtenidos de yema de huevo de gallina, tienen diversas aplicaciones, entre ellas se destaca su empleo en inmunoterapia oral (Larsson *et al.* 1993), así como en la producción de kits de diagnóstico. Además las inmunoglobulinas de las aves son análogas a la de mamíferos: IgA, IgM e IgG (Carlander 2002). Sin embargo, al comparar la estructura de la inmunoglobulina G aviar y mamífera se observan diferencias en la masa molecular, siendo de 200 kDa en las aves y de 160 kDa en los mamíferos (Tizard 1982). Por otra parte, la inmunoglobulina G aviar posee gran similitud en su secuencia de ADN con la IgG humana (Shimizu *et al.* 1992). Estas características permiten que ambas IgG no presenten reacción cruzada (Friendscho 1994). Producto de estas diferencias la inmunoglobulina IgG aviar fue denominada IgY (Camenisch *et al.* 1999).

La IgY es transportada por vía transplacentaria desde el suero del ave a la yema del huevo, ya este fecundado o no fecundado. La concentración de IgY en el suero de la gallina es de aproximadamente 5-7 mg/ml (Carlander 2002), en tanto la IgY en la yema de huevo es en promedio de 15 mg/ml. Por lo tanto, una yema de huevo de un volumen aproximado de 15 ml contiene más de 100 mg de IgY; luego, desde una gallina en postura que produce aproximadamente 20 huevos por mes, se podrían aislar desde la yema más de 2 g de IgY (Carlander 2002), cantidad comparable con la producción de grandes mamíferos, como equinos y bovinos (Tizard 1982). Además, la obtención de anticuerpos a partir de la yema de huevo no representa un procedimiento invasivo, como el sangrado en conejos, evitando de esta manera el estrés y el sufrimiento animal (Broderon 1989).

Conociendo el desarrollo de la tecnología de anticuerpos de yema de huevo que no representa un procedimiento invasivo y sangre dependiente de animales, además de la urgente necesidad de llevar a cabo actividades de investigación en diagnóstico, prevención y control de la leishmaniasis: La finalidad del presente trabajo de investigación fue determinar los antígenos somáticos y de excreción-secreción de promastigotes de *Leishmania peruviana* Velez, 1913 cepa MHOM/PE/84/LC26 por la técnica de electroinmunotransferencia utilizando IgY producidos en *Gallus gallus* (Linnaeus, 1758) inmunizados experimentalmente, con la posibilidad que en un futuro sean aplicados para el diagnóstico de la leishmaniosis cutánea.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Objeto de estudio

En el presente estudio se utilizó un cultivo de promastigotes de *L. peruviana* cepa

MHOM/PE/84/LC26 y dos especímenes de *G. gallus*.

#### Métodos y técnicas

Para la determinación de los antígenos somáticos y de excreción-secreción de *L. peruviana* se realizó por electroinmunotransferencia, para lo cual se utilizó anticuerpos IgY producidos en *G. gallus*, que fueron inmunizados experimentalmente. Los antígenos fueron obtenidos por centrifugación de promastigotas cultivados a 37°C por 20 h en Minimun Essential Medium-Eagle (MEM-Sigma), el sobrenadante contenía a los antígenos de excreción-secreción y el sedimento a los antígenos somáticos. A los antígenos somáticos se le sometieron a sonicación a 60 hertz por un minuto (tres veces); ambos tipos de antígenos fueron conservados a -20°C hasta su uso.

Para obtener los anticuerpos IgY anti-leishmania, se inmunizaron dos gallinas, a la primera con antígenos de excreción-secreción y a la segunda con antígenos somáticos. Posteriormente se enfrentó los antígenos de *L. peruviana* con la IgY para observar y determinar pesos moleculares de los antígenos.

Los aspectos éticos considerados para el presente trabajo en gallinas, son que los anticuerpos utilizados para la electroinmunotransferencia fueron obtenidos de la yema de los huevos, lo que no representa un procedimiento invasivo, como el sangrado de animales, evitando de esta manera el estrés y el sufrimiento animal.

### RESULTADOS

Utilizando IgY producidos en *G. gallus* inmunizados experimentalmente se detectaron

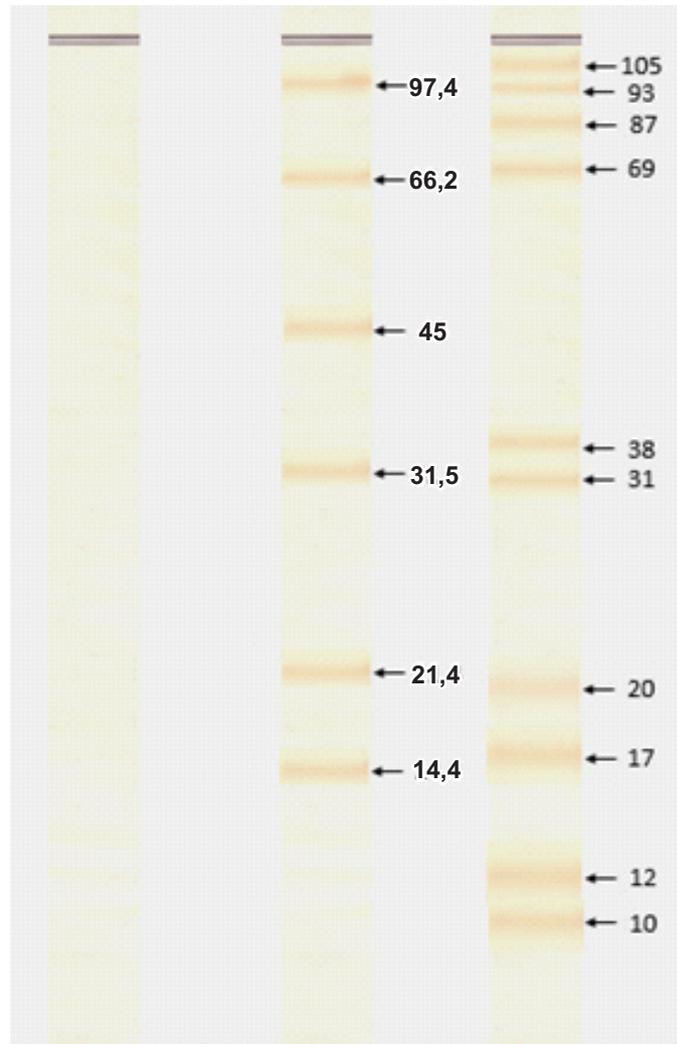
diversas bandas antigénicas para los antígenos somáticos y de excreción-secreción de promastigotas de *L. peruviana* cepa MHOM/PE/84/LC26. Para los antígenos somáticos se detectaron diez bandas con pesos moleculares de 10, 12, 17, 20, 31, 38, 69, 87, 93 y 105 kDa. (Fig. 1) y para los antígenos de excreción-secreción nueve bandas antigénicas con pesos moleculares de estos antígenos son 17, 20, 31, 52, 67, 78, 87, 93 y 105 kDa (Fig. 2). Además se detectaron cinco bandas antigénicas comunes con pesos moleculares de 105, 93, 87, 69, 31 y 20 kDa. Las IgY preinmunes no originaron bandas antigénicas.

### DISCUSIÓN

La inmunización de las gallinas fue por vía subcutánea, tomando como referencia estudios realizados para la obtención de anticuerpos desde huevos de gallina ya que resultan más inmunogénica (Carlander 2002) a comparación de la vía intramuscular (Sunwoo *et al.* 2002) y endovenosa (Patterson *et al.* 1962) por permitir al inóculo permanecer mayor tiempo en contacto con la piel, existiendo mayor estimulación de células presentadoras de antígeno para la activación de la respuesta humoral (Gatica *et al.* 2004).

El proceso de inmunización fue bien tolerado como lo reportan algunos autores (Gassmann *et al.* 1990), quienes informan que el adyuvante completo es bien tolerado y no produce reacciones inflamatorias. El estrés al que fueron sometidas las gallinas por las inmunizaciones condujo a una disminución en la producción de huevos. Al respecto, Carlander *et al.* (2001), indica que el transporte de IgY desde el suero a la yema de huevo no decrece al producirse una interrupción en la postura de los huevos.

Las inmunizaciones se realizaron en cuatro oportunidades, una inoculación cada 10 días

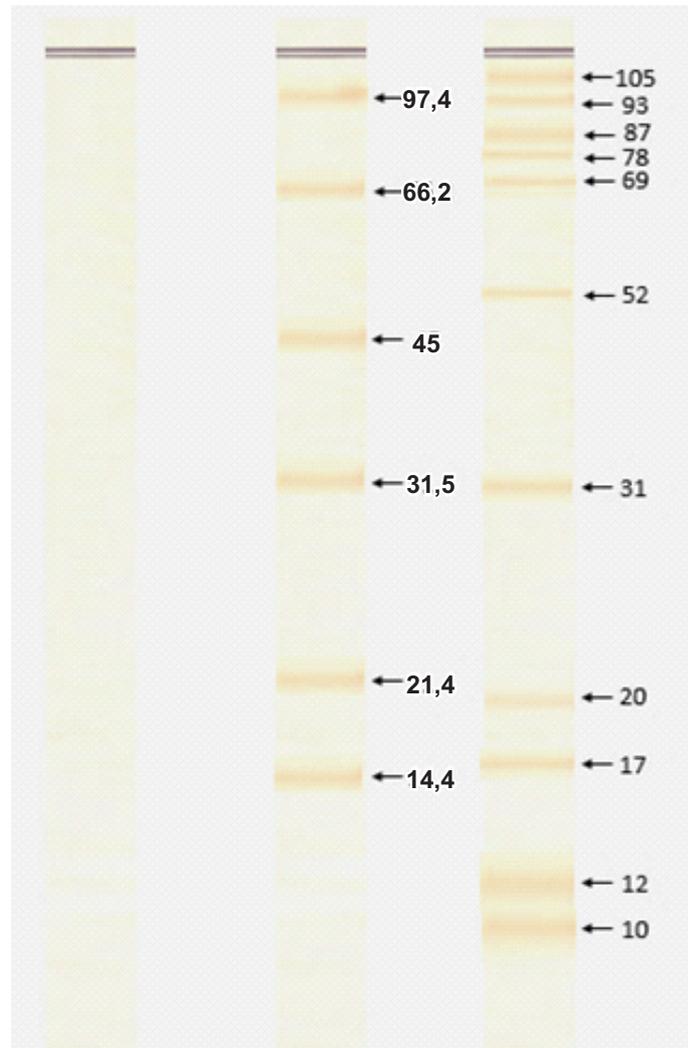


**Figura 1.** Bandas antigénicas y pesos moleculares de los antígenos somáticos de promastigotas de *Leishmania peruviana* cepa MHOM/PE/84/LC26 detectados por electroinmunotransferencia utilizando IgY producidos en *Gallus gallus* inmunizados experimentalmente. (A) Suero preinmune. (B) Marcador de peso molecular (PM) en Kilodaltons (kDa). (C) Antígenos somáticos de promastigotas de *L. peruviana*.

por 40 días, de acuerdo con Patterson *et al.* (1962) quienes determinaron que los anticuerpos aparecen en la yema ocho días después de la inoculación primaria, obteniéndose el máximo nivel a partir del día 12. Para aumentar la producción de IgY anti-promastigotas de *L. peruviana* utilizando adyuvante completo e incompleto de Freud, logró concentraciones de antígeno de 44  $\mu\text{g}/\text{mL}$  para los antígenos de excreción-secreción y 107  $\mu\text{g}/\text{mL}$  para los antígenos

somáticos, ambos tipos de antígenos obtenidos del cultivo de *L. peruviana* de 20 horas en MEM a 37°C, dichas concentraciones son bajas comparadas con los producidos por parásitos como *T. solium*, larva cisticerco de *T. solium* y *Fasciola hepatica*, que por ser de mayor tamaño y multicelulares producen mayor cantidad de proteínas (Contreras 1990).

Al comparar la Fig. 1 y la Fig. 2. se observa las bandas antigénicas comunes, correspondiente



**Figura 2.** Bandas antigénicas y pesos moleculares de los antígenos de excreción-secreción de promastigotas de *Leishmania peruviana* cepa MHOM/PE/84/LC26 detectados por electroinmunotransferencia utilizando IgY producidos en *Gallus gallus* inmunizados experimentalmente. (A) Suero preinmune. (B) Marcador de peso molecular (PM) en Kilodaltons (kDa). (C) Antígenos de excreción-secreción de promastigotas de *L. peruviana* obtenidos en Minimum Essential Medium Eagle a 37°C por 20h.

a los antígenos de pesos moleculares de 20, 31, 87, 93 y 105 kDa; lo que se puede deber a que durante el proceso sonificado del sedimento no solo se obtuvieron antígenos somáticos, sino que se han podido liberar antígenos de excreción-secreción provenientes de las estructuras internas del parásito. Otra posibilidad es que en el tiempo de incubación algunos parásitos hayan muerto liberándose antígenos somáticos al sobrenadante donde solo han debido de estar los antígenos de excreción-secreción. La débil reacción

observada en algunas bandas antigénicas enfrentadas con la IgY de gallina, posiblemente se debe a la baja concentración de los antígenos, o que estos antígenos son poco inmunogénicos por su bajo peso molecular (García-Tamayo 1987).

Los antígenos somáticos de promastigotas de *L. peruviana* que han sido detectados por la técnica de inmunoelectrotransferencia podrían ser utilizados en un futuro para el diagnóstico de leishmaniosis cutánea.

**REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- Alvar, J.; Yactayo, S. & Bern, C. 2006. Leishmaniasis and poverty. Trends in Parasitology, 22: 552-557.
- Berrizbeitia, M.; Ndao, M.; Bubis, J.; Gottschalk, M.; Aché, A.; Lacouture, S.; Medina, M. & Ward, B. 2006. Purified excreted-secreted antigens from *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes as tools for diagnosis of Chagas disease. Journal of Clinical Microbiology, 44: 291-296.
- Broderson, J.R. 1989. A retrospective review of lesion associated with the use of Freund's adjuvant. Laboratory Animal Science, 39: 400-405.
- Brooker, S.; Mohammed, N.; Adil, K.; Agha, S.; Reithinger, R.; Rowland, M.; Ali, I. & Kolaczinski J. 2004. Leishmaniasis in refugee and local Pakistani populations. Emerging Infectious Diseases, 10: 1681-1684.
- Caballero-García, M.; Almeyda-Artigas, R.J.; Mosqueda-Cabrera, M.A. & Jiménez-Cardoso, E. 2005. *Gnathostoma binucleatum*: excretion-secretion antigen analysis obtained from advanced third-stage larvae *in vitro* culture. Experimental Parasitology, 110: 140-145.
- Camenisch, G.; Tini, M.; Chilov, D.; Kvietikova, I.; Srinivas, V.; Caro, J. Spielmann, P.; Wenger, R.H. & Gassmann, M. 1999. General applicability of chicken egg yolk antibodies: the performance of IgY immunoglobulins raised against the hypoxia-inducible factor 1 alfa. FASEB Journal, 13: 81-88.
- Carlander, D. 2002. *Avian IgY antibody in vitro and in vivo*. Comprehensive Summaries of Uppsala Dissertations from the Faculty of Medicine. Acta Universitatis Upsaliensis 1119. 53 pp.
- Carlander, D.; Wilhelmson, M; Larsson, A. 2001. Limited day to day variation of IgY levels in eggs from individual laying hens. Food and Agricultural Immunology, 13: 87-92.
- Castellucci, L.; Cheng, L.H.; Araujo, C.; Guimarães, L.; Lessa, H.; Machado, P.; Almeida, M.; Oliveira, A.; Ko, U.; Johnson, W.; Wilson, M.; Carvalho, E. & de Jesús, A. 2005. Familial aggregation of mucosal leishmaniasis in northeast Brazil. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 73: 69-73.
- Chávez-Salas, F.; Vásquez, O. & Escalante, H. 2007. Evaluación de la técnica de Western blot para la detección de antígenos de *Hymenolepis nana*. Revista Peruana de Biología, 14: 283-286.
- Contreras, M. 1990. Inmunodiagnóstico de la parasitosis humana. I Generalidades. Boletín Chileno de Parasitología, 45: 13-18.
- Desjeux, P. 2004. Leishmaniasis. Nature Reviews Microbiology, 2: 692-693.
- Duménigó-Ripoll, B.; Espino-Hernández, A.M.; Menéndez-Valonga, M.C. & Finlay-Villalvilla, C. 1991. Excretion-secretion antigens from adult *Dirofilaria immitis* in the diagnosis of human filariasis by solid phase immunoenzyme assay. Revista Cubana de Medicina Tropical, 43: 162-166.
- Escalante, H.; Huamanchay, O. & Davelois, K. 2001. La inmunocromatografía para el diagnóstico de la infección por *Taenia solium* en *Mesocricetus auratus* mediante la detección de coproantígenos. Revista de Medicina Experimental y Salud Pública, 18: 57-62.
- Friendscho, M. 1994. Why IgY? Chicken polyclonal antibody, an appealing alternative. Promega Notes, 46: 11-11.
- García-Tamayo, F. 1997. *Fundamentos de Inmunología*. 1<sup>era</sup> ed. Centro de publicaciones de la Universidad Autónoma de México, México.
- Gassmann, M.; Thommes, P.; Weiser, T.

- Hubscher U. 1990. Efficient production of chicken egg yolk antibodies against a conserved mammalian protein. The FASEB Journal, 4: 2528-2532.
- Gatica, R.; Slebe, J.C.; Ulloa, J. & Yáñez, A.J. 2004. Comparación de dos vías de inoculación en la producción de anticuerpos contra fructosa 1,6-bisfosfatasa en huevos de gallina. Archivos de Medicina Veterinaria, 36: 49-58.
- Handman, E.; Elso, C. & Foote, S. 2005. Genes and susceptibility to leishmaniasis. Advances in Parasitology, 59: 1-75.
- Herwaldt, B.L. 2001. Laboratory-acquired parasitic infections from accidental exposures. Clinical Microbiology Reviews, 14: 659-688.
- Killick-Kendrick, R. 1999. The biology and control of phlebotomine sand flies. Clinics in Dermatology, 17: 279-289.
- Larsson, A.; Balöw, R.; Lindahl, T. & Frosberg, P. 1993. Chicken antibodies: Taking advantage of evolution- A review. Poultry Science, 72: 1807-1812.
- Matsuo, K.; Yamaguchi, R.; Yamazaki, A.; Tasaka, H.; Terasaka, K.; Totsuka, M.; Kobayashi, K.; Yukitake, H. Yamada, T. 1990. Establishment of a foreign antigen secretion system in mycobacteria. Infection and Immunity, 58: 4049-4054.
- Meira, C.S.; Costa-Silva, T.A.; Vidal, J.E.; Ferreira, I.M.; Hiramoto, R.M. & Pereira-Chiocola, V.L. 2008. Use of the serum reactivity against *Toxoplasma gondii* excreted-secreted antigens in cerebral toxoplasmosis diagnosis in human immunodeficiency virus-infected patients. Journal of Medical Microbiology, 57: 845-850.
- Patterson, R.; Youngner, W. & Weigle, F. 1962. Antibody production and transfer to egg yolk in chickens. Journal of Immunology, 89: 272-278.
- Peters, W. & Killick-Kendrick, R. 1987. The leishmaniasis in biology and medicine. Clinical aspects and control, 2: 642-642.
- Qi, H.; Popov, V. & Soong, L. 2001. *Leishmania amazonensis*-dendritic cell interactions *in vitro* and the priming of parasite-specific CD4 T cells *in vivo*. Journal of Immunology, 167: 4534-4542.
- Reithinger, R.; Dujardin, J.C.; Louzir H.; Pirmez, C.; Bruce, A. & Brooker, S. 2007. Cutaneous leishmaniasis. The Lancet Infectious Diseases, 7: 581-96.
- Shimizu, M.; Nagashima, H.; Sano, K.; Hashimoto, K.; Ozeki, M. & Tsuda, K. 1992. Molecular stability of chicken and rabbit immunoglobulin G. Bioscience Biotechnology and Biochemistry, 56: 270-274.
- Soong, L. 2008. Modulation of dendritic cell function by *Leishmania* parasites. Journal of immunology, 180: 4355-4360.
- Sunwoo, H.; Lee, E.; Menninen, K. & Suresh, J.S.I.M. 2002. Growth inhibitory effect of chicken egg yolk antibody (IgY) on *Escherichia coli* 0157:H7. Journal of Food Science, 67: 1486-1494.
- Tizard, I. 1982. *An introduction to veterinary immunology*. 2<sup>nd</sup> Ed. Saunders, W.B. Philadelphia.
- 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. & 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: 41-48.
- Vega-López, F. 2003. Diagnosis of cutaneous leishmaniasis. Current Opinion in Infectious Diseases, 16: 97-101.
- WHO. 2000. Leishmania/HIV co-infection. *South-western Europe 1990-1998*. W H O / L E I S H / 2 0 0 0 . 4 2 <http://www.who.int/wer> leído el 15 de agosto del 2015.
- WHO. 2002. Weekly epidemiological record.

W H O , 7 7 : 3 6 5 - 7 2 .  
<http://www.who.int/wer> leído el 16 de agosto del 2015.

WHO. 2010. The world health report. Changing history. Geneva: WHO. [http://www.who.int/leishmaniasis/burden/magnitude/burden\\_magnitude/en/index.htm](http://www.who.int/leishmaniasis/burden/magnitude/burden_magnitude/en/index.htm). leído el 8 del julio del 2015.

Xin, L.; Vargas-Inchaustegui, D.A.; Raimer,

S.S.; Kelly, B.C.; Hu, J.; Zhu, L.; Sun, J. & Soong, L. 2010. Type I IFN receptor regulates neutrophil functions and innate immunity to leishmania parasites. *Journal of Immunology*, 184:7047-7056.

Received August 29, 2015.  
Accepted December 06, 2015.