



UNIVERSIDAD RICARDO PALMA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

ESCUELA PROFESIONAL DE MEDICINA VETERINARIA

Determinación de la frecuencia de casos de Leishmania en *Canis lupus familiaris* "perro domestico" en la Clínica Veterinaria Sant Antoni -España del 2015 al 2020

TESIS

Para optar el título profesional de Médica Veterinaria

AUTOR(A)

Andrade Iglesias Stefany Roxana

ASESOR(A)

Asesor: MV. MPVM. Samamé Beltrán, Hugo Aldo

Lima, Perú

2023

Metadatos Complementarios

Datos de autor

Andrade Iglesias, Stefany Andrade

Tipo de documento de identidad del AUTOR: DNI

Número de documento de identidad del AUTOR: 47769171

Datos de asesor(a)

Samamé Beltrán, Hugo Aldo

Tipo de documento de identidad del ASESOR: DNI

Número de documento de identidad del ASESOR: 07924494

Datos del jurado

PRESIDENTE: Leguía Puente, Guillermo Manuel

DNI: 06603766

ORCID: 0000-0002-8787-6595

MIEMBRO: Jara Aguirre, Mauricio Rodolfo

DNI: 40213621

ORCID: 0000-0003-4138-5915

MIEMBRO: Alvarez Begazo de Jara, Verónica

DNI: 40140168

ORCID: 0000-0001-5585-5557

Datos de la investigación:

Campo del conocimiento OCDE: 4.03.01

Código del Programa: 841016

DECLARACIÓN JURADA DE ORIGINALIDAD

Yo, Andrade Iglesias Stefany Roxana, con código de estudiante N° 200810091, con (DNI o Carné de Extranjería¹) N° 47769171, con domicilio en Jirón José Galvez 219 Lucyana Carabaylo, distrito Carabaylo, provincia y departamento de Lima.

En mi condición de bachiller en Medicina Veterinaria de la Facultad de Ciencias Biológicas, declaro bajo juramento que:

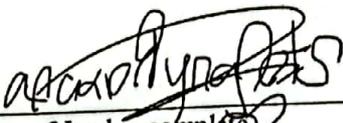
(El/la) presente (tesis/ trabajo de suficiencia profesional/ proyecto de investigación) titulado: "Determinación de la frecuencia de casos de Leishmania en Canis lupus familiaris "perro domestico" en la Clínica Veterinaria Sant Antoni -España del 2015 al 2020" es de mi única autoría, bajo el asesoramiento del docente Mg. Hugo Aldo Samamé Beltrán, y no existe plagio y/o copia de ninguna naturaleza, en especial de otro documento de investigación presentado por cualquier persona natural o jurídica ante cualquier institución académica o de investigación, universidad, etc; (el/la) cual ha sido sometido (a) al antiplagio Turnitin y tiene el 25% de similitud final.

Dejo constancia que las citas de otros autores han sido debidamente identificadas en el(la) (tesis/ trabajo de suficiencia profesional/ proyecto de investigación), el contenido de estas corresponde a las opiniones de ellos, y por las cuales no asumo responsabilidad, ya sean de fuentes encontradas en medios escritos, digitales o de internet.

Asimismo, ratifico plenamente que el contenido íntegro del(la) (tesis/ trabajo de suficiencia profesional/ proyecto de investigación) es de mi conocimiento y autoría. Por tal motivo, asumo toda la responsabilidad de cualquier error u omisión en el(la) (tesis/ trabajo de suficiencia profesional/ proyecto de investigación) y soy consciente de las connotaciones éticas y legales involucradas.

En caso de falsa declaración, me someto a lo dispuesto en las normas de la Universidad Ricardo Palma y a los dispositivos legales nacionales vigentes.

Surco, 9 de mayo de 2023



(Nombre completo)
(DNI o Carné de Extranjería N°) _____



Se debe colocar la opción que corresponda, realizar lo mismo en todo el texto del documento.

Determinación de la frecuencia de casos de Leishmania en Canis lupus familiaris "perro domestico" en la Clínica Veterinaria Sant Antoni -España del 2015 al 2020

ORIGINALITY REPORT

25 %
SIMILARITY INDEX

24 %
INTERNET SOURCES

1 %
PUBLICATIONS

4 %
STUDENT PAPERS

PRIMARY SOURCES

1	eprints.ucm.es Internet Source	20 %
2	Submitted to Universidad Ricardo Palma Student Paper	1 %
3	Submitted to Universidad de León Student Paper	1 %
4	ojs.studiespublicacoes.com.br Internet Source	1 %
5	hdl.handle.net Internet Source	1 %
6	www.madrid.org Internet Source	<1 %
7	Submitted to Universidad Nacional de Colombia Student Paper	<1 %
8	zagan.unizar.es Internet Source	<1 %

9	uvadoc.uva.es Internet Source	<1 %
10	pdfcookie.com Internet Source	<1 %
11	repodigital.unrc.edu.ar Internet Source	<1 %
12	ddd.uab.cat Internet Source	<1 %
13	dehesa.unex.es Internet Source	<1 %
14	Rivas Estanga, Aruanai Kalú, Universitat Autònoma de Barcelona. Departament de Medicina i Cirurgia Animals. "Clinical and epidemiological aspects of feline and canine leishmaniosis in Venezuela /", 2019 Internet Source	<1 %

Exclude quotes On
Exclude bibliography On

Exclude matches < 25 words

DEDICATORIA

A Dios por darme la vida y permitirme avanzar un peldaño más hacia mi escalera de
conocimiento.

Dedico con todo mi corazón esta tesis a mi madre, pues sin ella no lo hubiese logrado.
Tu bendición a diario a lo largo de mi vida y tu apoyo incondicional han sido el pilar en
mi vida para seguir esforzándome por cumplir todos mis sueños y metas trazadas,
agradezco tu paciencia y amor madre mía, Te amo.

A mi abuela por todo su amor y haberme criado como alguien que no deja de soñar,
gracias por estar a mi lado siempre y haber dado muchos años de tu vida a mi cuidado,
gracias a tu apoyo incondicional, te amo.

A mi padre y toda mi familia por siempre estar a mi lado en los buenos y malos
momentos y animarme a seguir adelante.

Y a Alex mi novio, una persona muy importante en mi vida, mi apoyo en los peores
momentos y mi empuje a seguir adelante.

AGRADECIMIENTOS

Al Doctor Hugo Samamé, por aceptar ser quien me guie en esta tesis y tenerme la
paciencia suficiente para sacarla adelante a pesar de estar lejos y con horarios
totalmente distintos.

A los Doctores Carlos Pulido y Carlos Gálvez por permitirme realizar este trabajo en su
veterinaria y por la confianza puesta en mí.

A la Doctora Alicia Bertolín por permitirme aprender de toda su gran experiencia en
felinos, de la que aprendí más de lo que esperaba, gracias por apoyarme con mucha
información valiosa en cuanto a conocer esta enfermedad, guiarme ante lo nuevo en este
país y ser una gran compi y amiga.

ÍNDICE

I.	INTRODUCCIÓN	9
II.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	12
	2.1 DESCRIPCIÓN DEL PROBLEMA.....	13
III.	JUSTIFICACIÓN.....	14
IV.	OBJETIVOS.....	16
	4.1 OBJETIVO GENERAL.....	16
	4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	16
V.	MARCO TEÓRICO.....	17
	5.1 PARÁSITO DE LEISHMANIA	17
	5.1.1 <i>Etiología</i>	17
	5.2 FLEBÓTOMOS	19
	5.3 FLEBÓTOMO <i>P. PERNICIOSUS</i>	22
	5.4 CICLO DE VIDA DEL FLEBÓTOMO	23
	5.5 CICLO BIOLÓGICO DE <i>LEISHMANIA INFANTUM</i>	24
	5.6 OTRAS FORMAS DE TRANSMISIÓN.....	25
	5.7 INMUNOPATOLOGÍA.....	26
	5.7.1 <i>Sistema Inmunitario del Canino</i>	26
	5.7.2 <i>Respuesta inmunitaria innata</i>	27
	5.7.3 <i>Respuesta Inmunitaria Adaptativa</i>	29
	5.7.3.1 <i>Respuesta inmunitaria Celular</i>	30
	5.7.3.2 <i>Respuesta Inmunitaria Humoral</i>	31
	5.8 ESTADIOS EVOLUTIVOS	31
	5.8.1 <i>Amastigotes</i>	31
	5.8.2 <i>Promastigotes</i>	32
	5.9 RESERVORIO.....	32
	5.10 OTROS RESERVORIOS DESCRITOS.....	33
	5.11 EPIDEMIOLOGÍA	34
	5.12 FACTORES QUE INTERVIENEN EN LA APARICIÓN DEL VECTOR	36
	5.12.1 <i>Factores medioambientales</i>	36
	5.13 FACTORES DEL RESERVORIO	37
	5.13.1 <i>Edad</i>	37
	5.13.2 <i>Especie</i>	37
	5.13.3 <i>Raza</i>	37
	5.13.4 <i>Tamaño</i>	38
	5.14 MANIFESTACIONES CLÍNICAS	38
	5.15 ALTERACIONES LABORATORIALES.....	41
	5.15.1 <i>Proteínas séricas y proteinograma</i>	41
	5.15.2 <i>Hemograma</i>	41
	5.15.3 <i>Perfil bioquímico/urianálisis</i>	42
	5.16 ESTADIOS CLÍNICOS	43
	5.17 INFECCIÓN O ENFERMEDAD.....	45
	5.18 DIAGNÓSTICO	46
	5.18.1 <i>ELISA (Enzimoimmunoensayo)</i>	46
	5.18.2 INFORMACIÓN SOBRE LA MUESTRA A UTILIZAR PARA EL TEST ELISA DE LEISHMANIA	47
	5.19 TRATAMIENTO	48
	5.19.1 <i>Miltefosina</i>	51
	5.19.2 <i>Alopurinol</i>	52
	5.19.3 <i>Domperidona</i>	53
VI.	ANTECEDENTES	56

VII.	HIPÓTESIS.....	59
	7.1 HIPÓTESIS GENERAL.....	59
	7.2 HIPÓTESIS ESPECÍFICAS	59
VIII.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	59
	8.1 LUGAR DE EJECUCIÓN	60
	8.2 TIPO Y DISEÑO DE INVESTIGACIÓN	60
	8.3 OPERACIONALIZACIÓN DE LA VARIABLE	61
	8.4 MUESTREO	62
	8.5 TAMAÑO DE MUESTRA	62
	8.6 INSTRUMENTOS DE RECOLECCIÓN DE DATOS.....	62
	8.7 PROCEDIMIENTO DE PRUEBA.....	63
	8.8 ASPECTO ÉTICO.....	63
IX.	RESULTADOS	64
X.	DISCUSIÓN.....	70
XI.	CONCLUSIONES	76
XII.	RECOMENDACIONES	78
XIII.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	80
I.	ANEXOS	112
	ANEXO #1. LATEST TRENDS IN LEISHMANIA INFANTUM INFECTION IN DOGS IN SPAIN, PART I: MAPPED SEROPREVALENCE AND SAND FLY DISTRIBUTIONS, 2020.....	112
	ANEXO #2. FLEBÓTOMO P. PERNICIOSUS OBSERVACIÓN DE SUS CARACTERÍSTICAS ANATÓMICAS.	113
	ANEXO #3. SE MUESTRA AL FLEBÓTOMO <i>P. PERNICIOSUS</i> TODAVÍA EN PROCESO DE INGERIR SU RACIÓN DE SANGRE DE UN HUMANO EL CUAL ES VISIBLE A TRAVÉS DEL ABDOMEN DISTENDIDO Y TRANSPARENTE.....	113
	ANEXO #4. CICLO DEL MOSQUITO FLEBÓTOMO (<i>PHLEBOTOMUS PERNICIOSUS</i>).....	114
	ANEXO #5. CICLO BIOLÓGICO DE LOS PARÁSITOS DEL GÉNERO LEISHMANIA, RESPONSABLES DE LA LEISHMANIOSIS. .	114
	ANEXO #6. OTROS MODOS POCO FRECUENTES DE TRANSMISIÓN DE LEISHMANIA INFANTUM.....	115
	ANEXO #7. REPRESENTACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNITARIA REGULADA POR LINFOCITOS T COLABORADORES Y LINFOCITOS T CITOTÓXICOS EN LA LCAN.	115
	ANEXO #8. LESIÓN DE OREJA DE UN CANINO CON LEISHMANIOSIS OBSERVADA EN LA CLÍNICA VETERINARIA SANT-ANTONI EN ESPAÑA	116
	ANEXO #9. FORMAS PROMASTIGOTES DE LEISHMANIA	117
	ANEXO #10. PACIENTE CANINO DE LA CLÍNICA VETERINARIA SANT ANTONI EN PRIMERA CONSULTA POR LESIONES EXTERNAS COMPATIBLES CON LEISHMANIOSIS	118
	ANEXO #11. CONSENTIMIENTO INFORMADO	119
	ANEXO #12. PROGRAMA WIN VET USADO PARA LA EXTRACCIÓN DE LA BASE DE DATOS	121
	ANEXO #13 PRUEBA ELISA DE LEISHMANIA CANINA.....	122
	ANEXO #14. TABLA DE TODAS LAS RAZAS ESPECIFICAS DENTRO DE LA POBLACIÓN DE ESTE ESTUDIO.....	123
	ANEXO #15 TABLA DE ANÁLISIS DE REGRESIÓN LOGÍSTICA MÚLTIPLE EN CANINOS POSITIVOS A <i>LEISHMANIA</i> POR EDAD. .	126
	ANEXO #16. TABLA DE ANÁLISIS DE REGRESIÓN LOGÍSTICA MÚLTIPLE EN CANINOS POSITIVOS A <i>LEISHMANIA</i> POR RAZA. .	127
	ANEXO #17. TABLA DE ANÁLISIS DE REGRESIÓN LOGÍSTICA MÚLTIPLE EN CANINOS POSITIVOS A <i>LEISHMANIA</i> POR SEXO. .	127
	ANEXO #18. TABLA DE ANÁLISIS DE REGRESIÓN LOGÍSTICA MÚLTIPLE EN CANINOS POSITIVOS A <i>LEISHMANIA</i> POR TAMAÑO.	127
	ANEXO # 19. TABLA DE ANÁLISIS DE REGRESIÓN LOGÍSTICA MÚLTIPLE EN CANINOS POSITIVOS A <i>LEISHMANIA</i> POR ESTACIONES.....	128

ÍNDICE DE TABLA

Tabla 1: Frecuencia de animales testados que dieron positivos a Leishmania en la Clínica Veterinaria Sant Antoni durante el periodo 2015-2020.....	64
Tabla 2: Frecuencia de casos positivos a Leishmaniosis según la edad de la población estudiada de caninos durante el periodo 2015-2020.....	65
Tabla 3: Frecuencia de casos positivos a Leishmaniosis según la raza de la población estudiada de caninos durante el periodo 2015-2020.....	66
Tabla 4: Frecuencia de casos positivos a Leishmaniosis según el sexo en la población estudiada de caninos durante el periodo 2015-2020.....	66
Tabla 5: Frecuencia de casos positivos a Leishmaniosis según el tamaño en la población estudiada de caninos durante el periodo 2015-2020.....	67
Tabla 6: Frecuencia de casos positivos a Leishmaniosis según la estacionalidad en el municipio de Puzol, provincia de Valencia-España durante el periodo 2015-2020.....	68
Tabla 7: Evaluación de los factores asociados al diagnóstico de Leishmaniosis canina usando Regresión Logística Múltiple.....	69

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Porcentaje de casos positivos a Leishmaniosis Canina por año.	129
Gráfico 2: Porcentaje de casos positivos de la población total del estudio.	130
Gráfico 3: Porcentaje de casos positivos a Leishmaniosis Canina según la edad.	130
Gráfico 4: Porcentaje de casos positivos a Leishmaniosis Canina según la raza.	131
Gráfico 5: Casos positivos a Leishmaniosis Canina según el tipo de raza.	131
Gráfico 6: Porcentaje de casos positivos a Leishmaniosis Canina según el sexo.	132
Gráfico 7: Porcentaje de casos positivos a Leishmaniosis Canina según la estacionalidad.	132
Gráfico 8: Porcentaje de casos positivos a Leishmaniosis Canina según el mes.	133
Gráfico 9: Porcentaje de casos positivos a Leishmaniosis Canina según tamaño.	133

RESUMEN

La leishmaniosis es una enfermedad zoonótica y antroponótica causada por protozoos del género *Leishmania*, transmitida por la picadura del flebótomo o mosquito simúlido hembra. El propósito de esta investigación fue determinar la frecuencia de casos positivos a *Leishmania* en pacientes caninos mediante la prueba de ELISA en la Clínica Veterinaria Sant Antoni, Puzol-Valencia (España) en el periodo de 2015 al 2020, con el fin de establecer la relación de dicha frecuencia con la edad, sexo, raza, tamaño y estacionalidad. De un total de 1300 animales, de los cuales resultaron 275 con diagnóstico positivo de leishmaniosis. El nivel de investigación fue descriptivo correlacional, presentando los resultados por medio de tablas y gráficos, en tanto para el análisis estadístico se realizaron pruebas de asociación estadística. Con respecto a las variables de estudio se obtuvo frecuencias relativas, siendo los de mayor frecuencia de casos positivos a *Leishmania* los caninos adultos 215/854 (25,18%) OR=, machos 169/727 (23,25%) OR=, de raza no definida 103/407 (25,31%) OR=, tamaño grande 130/493 (26,37%) OR= y en verano 97/375 (25,87%) OR=. La frecuencia de casos de Leishmaniosis es de 21,15% lo que demuestra la importancia de la enfermedad y fuente de infección endémica en el área de estudio y su potencial zoonótico.

Palabras Clave: Leishmaniosis canina, Zoonosis, Antroponótica y Flebótomo.

ABSTRACT

Leishmaniasis is a zoonotic and anthroponotic disease caused by protozoa of the genus *Leishmania*, transmitted by the bite of the phlebotomine sandfly or female simuliid mosquito. The purpose of this research was to determine the frequency of positive cases to *Leishmania* in canine patients by ELISA test in the Veterinary Clinic Sant Antoni, Puzol-Valencia (Spain) in the period from 2015 to 2020, in order to establish the relationship of such frequency with age, sex, breed, size and seasonality. From a total of 1300 animals, 275 were diagnosed positive for leishmaniasis. The level of research was descriptive-correlational, presenting the results by means of tables and graphs, while for the statistical analysis statistical association tests were performed. With respect to the study variables, relative frequencies were obtained, with the highest frequency of positive cases of *Leishmania* in adult canines 215/854 (25.18%) OR=, males 169/727 (23.25%) OR=, undefined breed 103/407 (25.31%) OR=, large size 130/493 (26.37%) OR= and in summer 97/375 (25.87%) OR=. The frequency of cases of Leishmaniasis is 21.15%, which demonstrates the importance of the disease as an endemic source of infection in the study area and its zoonotic potential.

Keywords: Canine Leishmaniosis, Zoonosis, Anthroponotic and Phlebotomus.

I. INTRODUCCIÓN

La leishmaniosis es una enfermedad zoonótica producida por protozoos del género *Leishmania* que afecta en Europa a la mayor parte de los países de la cuenca mediterránea de forma endémica, siendo el perro el principal reservorio. En el sur de Europa y en España, solo se observa la producida por *Leishmania infantum* (Encinas *et al.*, 2006).

La infección por *Leishmania infantum* se describió por primera vez en 1908 por Nicolle y Comte en Túnez, permitiendo expandir a partir de entonces el conocimiento de la Leishmaniosis Canina (Solano-Gallego *et al.*, 2009).

Los flebótomos, y más específicamente *Phlebotomus perniciosus* y *Phlebotomus ariasi* son los únicos vectores biológicos demostrados de *Leishmania infantum* (Encinas *et al.*, 2006).

La leishmaniosis canina (Lcan) afecta a todas las razas de perros, se sabe que todos los perros que presentan esta enfermedad van a mostrar síntomas, mientras que los perros portadores pueden tener Leishmaniosis en su organismo, pero no desarrollar la enfermedad, incluso parece ser que hay individuos que son resistentes a ella que podría ser por el sistema inmune del canino (Miró Corrales, G., Molina Moreno, R., 2006).

En la actualidad, se calcula que hay 15 millones de perros infectados en todo el mundo y más de 2,5 millones de ellos presentan signos clínicos de esta enfermedad (Miró *et al.*, 2020).

Esta enfermedad tiene un diagnóstico complejo, que puede pasar desapercibida y se manifiesta de formas muy distintas (Solano- Gallego *et al.*, 2009).

El parásito provoca distintos síntomas en cada perro y afecta a órganos distintos todo dependerá del sistema inmune que presente el animal (Alvar *et al.*, 2004; Reithinger *et al.*, 2007).

Los animales con adecuada respuesta inmunitaria celular van a poder eliminar el parásito. Si esta respuesta inmune no es adecuada, el parásito invadirá células como los macrófagos (otras células del sistema inmune) donde se multiplicará para después invadir la médula ósea, ganglios linfáticos, bazo e hígado, entonces se desarrollará una respuesta humoral en la que se fabricaran una gran cantidad de anticuerpos. En estos casos la infección progresará hasta la instauración de los distintos cuadros clínicos de Leishmaniosis (Alvar *et al.*, 2004; Reithinger *et al.*, 2007).

Los caninos contraen la enfermedad por la picadura de un mosquito infectado con el parásito de la Leishmania y este completa su ciclo de vida en dos huéspedes, un mosquito del género flebótomo, que alberga los promastigotes extracelulares y un mamífero, donde se desarrollan las formas intracelulares del parásito, los amastigotes. (Gálvez *et al.*, 2010a).

Los perros son infectados por promastigotes de Leishmania depositados en la piel durante las picaduras de los flebótomos, los promastigotes invaden las células huésped y se replican como amastigotes intracelulares (Holzmuller *et al.*, 2006).

El periodo de incubación de la enfermedad antes de la aparición de los signos clínicos puede durar meses o años (Koutinas y Koutinas, 2014), durante el cual, el parásito se disemina desde la piel por todo el cuerpo del huésped, con preferencia de algunos órganos como los riñones (Rallis *et al.*, 2005; Reis *et al.*, 2006a).

Se conocen como mínimo 21 especies patogénicas para el ser humano, con diferencias a nivel de presentación clínica, ciclos de transmisión y patrones de resistencia farmacológica. La infección se traduce principalmente en 3 formas clínicas: la visceral o sistémica, que puede resultar fatal en ausencia de tratamiento. La cutánea y la mucocutánea (Mercuriali *et al.*, 2022).

Durante el periodo 2005-2017, España tuvo una tasa de incidencia de 0,62 casos humanos por 100.000 habitantes, con una distribución heterogénea, afectando principalmente a la región mediterránea (Comunidad Valenciana, Cataluña, Baleares y Andalucía) (Humanes-Navarro *et al.*, 2021).

Según la Organización Mundial de la Salud (WHO, 2010) la leishmaniosis es endémica en 98 países, la mayoría de ellos en vías de desarrollo, la incidencia anual se estima entre 1,5 y 2 millones de casos, la prevalencia en 12 millones y se estima que 350 millones de personas están en riesgo de contraerla (Maroli *et al.*, 2013) (véase anexo #1).

En consecuencia, analizar la casuística de *Leishmania spp* en caninos es necesario debido a que debe darse a conocer la problemática real del tema tanto para la salud animal como la salud humana manteniendo un enfoque One Health y también fomentar las formas para el control de dicha enfermedad.

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La Leishmaniosis canina (Lcan) causada por *Leishmania infantum* es una enfermedad zoonótica de distribución mundial y de gran impacto por su gravedad (Alvar *et al.*, 2006), afecta enormemente a la calidad de vida del canino infectado pudiendo provocar incluso su muerte (WHO, 2010).

Siendo la leishmaniosis una zoonosis metaxénica de declaración obligatoria (Aránguez *et al.*, 2014), el humano puede ser infectado y enfermar, aunque no puede contagiarse directamente por el perro, la infección en caninos significa un riesgo (Solano-Gallego *et al.*, 2009), ante la posibilidad de que el flebótomo responsable de la transmisión de la leishmaniosis se infecte en el entorno del perro y pueda transmitir la infección si pica a una persona.

Los caninos son los principales reservorios domésticos de la infección por *L. infantum* (Gállego (2004), Gramiccia y Gradoni, 2005), razón por la cual han sido el principal objetivo en la mayoría de los programas de control en diversos países. Aunque la Leishmaniosis canina (Lcan) se considera endémica en varios países, principalmente en América del Sur y en la cuenca mediterránea.

En los últimos años la leishmaniosis se ha ampliado por todo Europa (Hotez & Gurwith, 2011) este hecho se atribuye a los cambios de distribución de los vectores a causa del cambio climático, el aumento de los viajes y los traslados de animales infectados, este último también ha contribuido al cambio epidemiológico de la enfermedad en otras áreas del país y países vecinos (Lucientes *et al.*, 2005).

El creciente aumento de la incidencia de Leishmaniosis canina (Lcan) en países donde no es endémica supone un reto para los propietarios de perros, los veterinarios y las autoridades sanitarias (Maia & Cardoso, 2015).

Lo más importante es que se presume que la enfermedad viaja con perros subclínicamente infectados (Miró *et al.*, 2007), por lo que, en ausencia de medidas profilácticas, la introducción de perros infectados en áreas previamente libres de Lcan y con la presencia de vectores eficientes, puede resultar en el establecimiento persistente de *L. infantum* (Maia & Cardoso, 2015).

Debido a lo cual los animales importados de zonas endémicas también suelen contribuir a la expansión de esta enfermedad hacia otros países fuera de la Unión Europea (Antoniou *et al.*, 2013).

En consecuencia, analizar la casuística de *Leishmania infantum* en caninos y determinar su frecuencia es necesario debido a que debe darse a conocer la problemática real del tema tanto para la salud animal como la salud humana manteniendo un enfoque One Health y también fomentar las formas para el control de dicha enfermedad

2.1 Descripción del problema

¿Cuál es la frecuencia de casos de Leishmaniosis en perros atendidos en la veterinaria Sant Antoni- España en los años 2015 al 2020?

III. JUSTIFICACIÓN

La leishmaniosis es una enfermedad endémica en España con climas tropicales o subtropicales, es de declaración obligatoria en todo el territorio desde el 2015 a través de la Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica (RENAVE).

Esta enfermedad afecta varias especies de vertebrados incluidos los roedores, los cánidos y los humanos, siendo el principal reservorio de dicha enfermedad los perros, afortunadamente los humanos sólo suelen ser portadores asintomáticos de la enfermedad, aunque, en algunas ocasiones, la enfermedad puede ser grave, especialmente en individuos inmunodeprimidos (Martín-Sánchez *et al.*, 2007; Navarro *et al.*, 2010; Millán *et al.*, 2011).

En el 2017 hubo aumento de casos en humanos y el mayor número correspondió al 89,9% de casos en la Comunidad Valenciana, Comunidad de Madrid, Cataluña, Baleares y Andalucía. (**Boletín Epidemiológico Semanal** eISSN:2173-9277 Centro Nacional de Epidemiología. Instituto de Salud Carlos III).

Los datos del último informe epidemiológico de Enfermedades Transmitidas por Vectores de 2018 de la Conselleria de Sanitat confirma que los casos en personas han pasado de 87 en 2013 a 420 / 356 en el 2017 y 2018 respectivamente, siendo la tasa de incidencia de esta enfermedad, en la Comunidad Valenciana es siete veces superior a la media nacional (3,52 casos por cada 100.000 habitantes por menos de 0,5) (Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica (RENAVE)).

Un reciente mapa de seroprevalencia de Leishmaniosis Canina en España sitúa las regiones de Andalucía, Baleares, Murcia, Valencia, parte de Cataluña y las provincias de Ourense y Cáceres como las más castigadas, con porcentajes de perros seropositivos por encima del 17% (véase anexo 1) (Gálvez *et al.*, 2020).

En la comunidad valenciana se considera que están infectados de un 5 a un 10% de la población canina, valor que se ha mantenido constante durante varios años, mientras que en toda España unos 785.000 perros son afectados.

En base a estas proporciones conocer la prevalencia de Lcan en la Comunidad Valenciana es un parámetro útil ya que nos permitirá describir un fenómeno de salud, identificar la frecuencia poblacional del mismo y generar hipótesis explicatorias.

Además, esta enfermedad ya es una preocupación para países no endémicos (Antoniou *et al.*, 2013) donde las enfermedades importadas constituyen un problema los cuales ya cuenta con muchos casos de leishmaniosis por animales importados sin tener una gran difusión e investigación de dicha enfermedad (Maia & Cardoso, 2015).

Por lo cual, el presente estudio tiene la finalidad de determinar la frecuencia de los casos de leishmaniosis canina por su impacto en medicina veterinaria y también en la salud humana, se utilizarán pruebas rápidas para la detección de dicha enfermedad en caninos con o sin síntomas y se compartirá el conocimiento de esta enfermedad pudiendo dirigir el uso de medidas de prevención y ayudar a la estimación de la probabilidad de infección en perros que visitan o habitan en otros países.

IV. OBJETIVOS

4.1 Objetivo General

- Determinar la frecuencia de casos de Leishmaniosis canina en la Clínica Veterinaria Sant Antoni Valencia- España en los últimos 5 años: 2015-2020.

4.2 Objetivos Específicos.

- Determinar la frecuencia de casos positivos a Leishmaniosis en pacientes caninos que fueron testados mediante la prueba de ELISA.
- Establecer la frecuencia de caninos positivos a Leishmania según la raza.
- Establecer la frecuencia entre los casos positivos de leishmaniosis canina y la estacionalidad.
- Establecer la frecuencia de caninos positivos a Leishmania según la edad.
- Establecer la frecuencia entre los casos positivos a Leishmania y el sexo.
- Establecer la frecuencia de caninos positivos a Leishmania según el tamaño.

V. MARCO TEÓRICO

5.1 Parásito de Leishmania

5.1.1 Etiología

La leishmaniosis canina es una enfermedad parasitaria causada por el protozoo intracelular *Leishmania infantum* que es difásico y completa su ciclo de vida en huéspedes como el mosquito y mamíferos siendo los caninos el principal, es el agente etiológico de la leishmaniosis tanto visceral como cutánea y está presente en toda la cuenca Mediterránea. (Gaglio *et al.*, 2014).

Es transmitida a humanos y animales mediante la picadura de las hembras de flebótomos, siendo el perro (*Canis lupus familiaris*) tanto un hospedador natural como el principal reservorio (Molina, 2005).

Las manifestaciones clínicas de la infección por *L. infantum* en el perro son muy variables, desde una infección subclínica crónica hasta una enfermedad grave, que puede ser fatal (Solano- Gallego *et al.*, 2009).

Menos de 50 de las cerca de 1.000 especies de flebótomos son vectores competentes de *Leishmania* en el mundo (Antoniou *et al.*, 2013). Las hembras del género *Phlebotomus* son los vectores aptos para la inoculación de los promastigotes en la piel del hospedador (Miró & Molina, 2006).

Tabla 1

Especies conocidas de Leishmania, especie de hospedador vertebrado a la que infectan y zonas en las que han sido detectadas hasta la fecha

Especie de Leishmania	Reservorios	Región geográfica
<i>L. amazonensis</i>	Roedores	América del Sur
<i>L. braziliensis</i>	Roedores	América central hasta el norte de Argentina
<i>L. donovani</i>	Humanos	Kenia, Sudán, India, Pakistán, China
<i>L. ethiopica</i>	Mamíferos del género Hyrax	Montañas de Etiopía y Kenia
<i>L. garnhami</i>	Desconocido	Venezuela
<i>L. guayanensis</i>	Perezosos y osos hormigueros	Guyana, Surinam, cuenca septentrional del Amazonas
<i>L. infantum</i>	Carnívoros domésticos y silvestres	Cuenca Mediterránea, Oriente Medio, Asia central, América central y del sur
<i>L. major</i>	Roedores (géneros Psammomys, Meriones y Gerbillus)	Norte de África, Oriente Medio, Asia central, subcontinente indio. Sur de Texas, México y porciones de América central
<i>L. mexicana</i>	Roedores	Panamá, Costa Rica, Colombia
<i>L. panamensis</i>	Perezosos	Perú y montañas de Argentina
<i>L. peruviana</i>	Desconocido	Venezuela

<i>L. tropica</i>	Humanos	Norte de África, Oriente Medio, Asia central, subcontinente indio
<i>L. venezuelensis</i>	Desconocido	Venezuela

Fuente: Extraído del libro 159 preguntas sobre las que siempre habías querido una respuesta, Roura *et al.*, 2018)

5.2 Flebótomos

Los flebótomos son una subfamilia de dípteros nematóceros de la familia *Psychodidae* son hematófagos y su picadura es el medio de transmisión de la leishmaniosis entre otras enfermedades siendo solo la hembra las hematófagas.

Estos necesitan unas temperaturas relativamente altas para sobrevivir y completar su ciclo. Prefieren los climas de tipo Mediterráneo, con temperaturas medias anuales por encima de los 18°C. Su presencia no está limitada por la precipitación porque, al ser especies adaptadas a los entornos esteparios, no suelen tener limitaciones por la humedad. Suelen estar activos entre marzo y septiembre, aunque tales fechas están limitadas por la duración del invierno y por la llegada del otoño, las cuales están obviamente condicionadas por la geografía. (Munstermann, 2005; Miró & Molina, 2006)

Por ejemplo, en las regiones septentrionales, la actividad comenzará más tarde y cesará antes en el año, habiendo además un menor número de noches con condiciones ideales para la actividad de los flebótomos (Tarallo *et al.*, 2010; Dantas-Torres *et al.*, 2014; Gaglio *et al.*, 2014).

En el sur, por el contrario, el periodo de actividad, y por lo tanto de transmisión de *Leishmania*, será considerablemente más largo. También siguen ciclos nictemerales, por lo que están activos preferentemente durante la noche.

La máxima actividad diaria de los flebótomos comienza después de la puesta de sol y continúa durante las primeras horas de la noche, siempre que la temperatura no descienda por debajo de los 17- 18°C ni supere los 40°C, no haya lluvia ni viento, y la altitud sea de 1000 m o inferior, por debajo de los 10°C el desarrollo de los flebótomos se retrasa mucho y las temperaturas bajo cero son letales (Miró *et al.*, 2011a).

Los flebótomos hacen movimientos cortos y silenciosos, caracterizados por pequeños saltos en zigzag (100 - 200 metros). Pueden desplazarse hasta 2 o 3 km y esto aumenta su capacidad de transmisión de la infección por *Leishmania* (Miró *et al.*, 2020).

En España existen dos géneros de flebótomos: *Sergentomyia* y *Phlebotomus*, que incluyen hasta la fecha unas 12 especies (Aransay & Col., 2004).

El primero de los géneros afecta casi exclusivamente a los reptiles, el género *Phlebotomus* incluye a las especies que transmiten *Leishmania* en España, algunas de las especies más importantes en la cuenca mediterránea son *P. perniciosus*, *P. papatasi*, *P. ariasi*, *P. perfiliewi* y *P. sergenti* (Antoniou *et al.*, 2013).

En España hay dos especies involucradas en la transmisión de la enfermedad, *P. ariasi* y *P. perniciosus*, siendo esta última la más prevalente, debido a su abundancia y dispersión por la mayor parte de la geografía española (Martín-Sánchez *et al.*, 1994; Gálvez *et al.*, 2010a).

Tabla 2

Distribución de vectores (género Phlebotomus, subgénero Larroussius) de leishmaniosis canina en países europeos

Especies de flebótomo	Distribución geográfica en Europa
<i>P. ariasi</i> (D)	España, Francia, Italia, Portugal
<i>P. langeroni</i> (D)	España
<i>P. neglectus</i> (D)	Albania, Chipre, Croacia, Eslovenia, Grecia, Italia, Kosovo, Macedonia, Montenegro, Rumania, Turquía, Ucrania.
<i>P. perfiliewi</i> (D)	Albania, Chipre, Croacia, Grecia, Italia, Macedonia, Malta, Rumania, Turquía.
<i>P. perniciosus</i> (D)	Chipre, Croacia, España, Francia, Italia, Kosovo, Malta, Mónaco, Montenegro, Portugal, Turquía.
<i>P. tobbi</i> (D*)	Albania, Chipre, Croacia, Grecia, Italia (Sicilia), Líbano, Siria, Turquía.
<i>P. kyelakii</i> (p)	Armenia, Azerbaiyán, Georgia.
<i>P. longicuspis</i> (p)	España
<i>P. syriacus</i> (p)	Grecia, Turquía.

D: vector demostrado; p: vector probable.
*Condiciones experimentales.

Fuente: (Killick-Kendrick, 1999; Maroli et al., 2013)

5.3 Flebótomo *P. perniciosus*

El flebótomo, transmisor de la Leishmania, es un insecto de pequeño tamaño (aproximadamente 2,5 – 3mm de largo), con dos alas, pero que a diferencia de otros mosquitos no emite zumbido al volar. Su color es marrón claro, el cuerpo lo tiene cubierto de pelo y cuando va a picar salta con las alas erguidas sobre el perro (Miró & Molina, 2006) (véase anexo #2).

Se considera que los únicos vectores de Leishmania para el perro en España son el *P. perniciosus* y *P. ariasi* (Molina *et al.*, 1994) siendo el *P. perniciosus* el transmisor más eficaz del protozoo a los perros (Alfonso *et al.*, 2007; Maia *et al.*, 2013).

Estos se reproducen en suelos húmedos y protegidos, en paredes, mampostería deteriorada, grietas húmedas, etc. (Munstermann, 2005). Su hábitat favorito son los cuartos oscuros y frescos (Sharma & Singh, 2008).

El insecto adulto tiene una vida inferior a 2 semanas, es activo durante el atardecer y la noche, son atraídos por la luz (fototropismo) (Lucientes *et al.*, 2005; Sharma & Singh, 2008).

Busca su alimento en un perímetro de 50 m de los lugares donde se reproduce (Munstermann, 2005).

Al posarse colocan sus alas en un ángulo de 45°, las campanas contra las larvas de estos insectos no son fáciles de llevar a cabo porque se encuentran en el suelo, con un hábitat muy disperso (Munstermann, 2005; Miró & Molina, 2006) (véase anexo #3).

5.4 Ciclo de Vida del Flebótomo

Su ciclo pasa por 4 estados: huevo, larva (con cuatro estadios larvarios sucesivo), pupa y adulto, este ciclo puede demorar en completarse unos dos meses en condiciones favorables (Munstermann, 2005) (véase anexo #4).

Las hembras adultas de los flebótomos se alimentan de la sangre de mamíferos y aves, y son oportunistas porque pican al hospedador más accesible. Sin embargo, prefieren el perro a otros posibles hospedadores, incluidas las personas (Miró *et al* 2020).

La hembra pone entre 40 y 100 huevos en la tierra. Estos huevos son alargados y de un color marrón brillante (Munstermann, 2005).

La larva es semejante a una oruga, es pequeña, de unos 0,5 mm de longitud, por otro lado, la pupa es de color amarillo pálido y tiene la cutícula antigua de la larva pegada al extremo del abdomen. (Sharma & Singh, 2008)

Existe una alta especificidad entre las especies de *Leishmania* y las especies de flebótomos, de forma que cada una de ellas está adaptada tan solo a una o unas pocas especies de vectores (Alvar *et al.*, 2000).

5.5 Ciclo Biológico de *Leishmania Infantum*

La *Leishmania* comienza con los promastigotes que se encuentran en el aparato digestivo y las probóscides del vector, *Phlebotomus*. Esta es una forma parasitaria flagelada, y por lo tanto móvil, que se transmite a la piel y sangre del hospedador cuando *Phlebotomus* se alimentan. Después de la inoculación, los promastigotes son ingeridos por los macrófagos circundantes, transformándose en unas estructuras ovaladas intracelulares, llamadas amastigotes (Solano-Gallego, 2013). Estos se encuentran dentro de unas estructuras llamadas fagolisosomas donde se van multiplicando por división binaria, finalmente destruyendo las células, e infectando a otras células reticuloendoteliales (Holzmuller *et al.*, 2006). Los amastigotes se distribuyen por conductos linfáticos y sistema vascular, infectando más células mononucleares por todo el sistema reticuloendotelial (Sharma & Singh, 2008).

Este ciclo se cierra cuando una hembra de *Phlebotomus* ingiere células parasitarias. Una vez el aparato digestivo del *Phlebotomus*, los amastigotes sufren una serie de cambios en diferentes estados intermedios, flagelados, convirtiéndose, al final, en promastigotes infectivos (Walker *et al.*, 2014).

La repetición de este proceso lleva a la diseminación de los amastigotes y a su presencia en varios tejidos de los perros infectados, entre los que incluyen la piel, bazo, médula ósea y los linfonodos, entre otros (Solano-Gallego *et al.*, 2011) (véase anexo #5).

5.6 Otras formas de Transmisión

Aunque la *L. infantum* se transmite de forma natural a través de las picaduras de flebótomos infectados (transmisión vectorial), se han descrito otros modos menos habituales de transmisión en caninos (Silva *et al.*, 2009; Pangrazio *et al.*, 2009).

Desde hace mucho tiempo se sospecha de una transmisión no vectorial en áreas donde los vectores están ausentes. Los modos de transmisión no vectoriales demostrados incluyen la infección a través de transfusiones de sangre (Owens *et al.*, 2001; Giger *et al.*, 2002) o de derivados procedentes de donantes infectados (de Freitas *et al.*, 2006; Tabar *et al.*, 2011) y venérea (Silva *et al.*, 2009) (véase anexo #6).

En zonas no endémicas sin un artrópodo vector competente, como Francia, Alemania y Estados Unidos, la transmisión vertical es la vía más extendida. Mientras que otros describen la transmisión por vía sexual y de perro a perro (Miró *et al.* 2020).

Por lo cual los modos de transmisión antes mencionados no relacionados con el flebótomo probablemente sólo tengan un papel marginal en la historia natural y la epidemiología de las infecciones por *L. infantum* en perros (Yeagley *et al.*, 2009).

5.7 Inmunopatología

5.7.1 Sistema Inmunitario del Canino

El sistema inmune está formado por un conjunto de mecanismos que protegen al organismo de infecciones. Trabaja identificando y eliminando a los agentes patógenos (de Almeida *et al.*, 2003).

Los glóbulos blancos, sustancias químicas y proteínas en la sangre forman parte de este sistema. Los linfocitos son un tipo de glóbulos blancos, dentro de ellos, los linfocitos B y T son una de las clases principales (Teixeira *et al.*, 2006).

Los linfocitos B producen anticuerpos, estos se adhieren a un antígeno específico y facilitan su destrucción por parte de las células inmunitarias. Es la respuesta inmune humoral. Los linfocitos T atacan los antígenos directamente y ayudan a controlar la respuesta inmunitaria. Es la respuesta inmune celular (Santos-Gomes *et al.*, 2000; Teixeira *et al.*, 2006).

La respuesta inmunitaria individual de cada perro es también un factor sumamente importante que influye en la infección o no del perro, ya que esta respuesta inmunitaria determinará: primero, si el macrófago evita o no la replicación del parásito en su interior; segundo, si se produce una diseminación de esta infección; y tercero, si se establece una infección permanente en ese perro (Solano-Gallego *et al.*, 2000).

Una vez que el parásito *Leishmania infantum* se localiza en la dermis del hospedador, es fagocitado por macrófagos tisulares. A partir de ese punto, la progresión de la infección depende principalmente de la eficiencia de la respuesta inmunitaria del hospedador (Alvar *et al.*, 2004), Si el perro es capaz de desarrollar una respuesta inmunitaria efectiva, la infección se controla y el perro permanece infectado, pero sin desarrollar signos clínicos

ni lesiones (infección subclínica) (Laskay *et al.*, 2003; van Zandbergen *et al.*, 2004). Por el contrario, cuando el perro desarrolla una respuesta inmunitaria que no es efectiva la infección progresa y el perro desarrolla los clásicos signos clínicos de la enfermedad.

La leishmaniosis canina es por tanto una enfermedad en la cual infección no es sinónimo de enfermedad clínica (Solano-Gallego *et al.*, 2001; Baneth *et al.*, 2008).

5.7.2 Respuesta inmunitaria innata

La inmunidad o respuesta innata es la respuesta inmediata, y es activada a través de receptores codificados en una línea germinal llamado receptores de reconocimiento de patrones (PRRs), los cuales reconocen patrones moleculares conservados a través de la evolución en una gran gama de patógenos. Estas moléculas llamadas patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs), estimulan la señalización celular, la expresión de genes y, por lo tanto, la activación de funciones inflamatorias y antimicrobianas (Janeway y Medzhitov, 2002; Tuon *et al.*, 2008).

Cuando un hospedador vertebrado es picado por el flebótomo y se produce la inoculación intradérmica ésta produce una reacción inflamatoria cutánea local, en la que intervienen células centinelas de la piel, como las células dendríticas (CD), linfocitos T, Delta Δ y macrófagos (Teixeira *et al.*, 2006). Durante este proceso se liberan una serie de quimioquinas que inducen el reclutamiento de neutrófilos y células natural killer (NK), seguidos de una oleada de macrófagos, iniciando la cascada de la respuesta inmunitaria innata para combatir los parásitos en el lugar de la infección (Santos-Gomes *et al.*, 2000., Teixeira *et al.*, 2006).

Los neutrófilos son las primeras células en llegar al punto de inoculación y predominan durante los primeros días post-infección, se infectan y pueden destruir los parásitos o ser fagocitados por los macrófagos cutáneos (de Almeida *et al.*, 2003).

Los macrófagos son los segundos en llegar al punto de entrada de *Leishmania*. Entre sus muchas funciones logra destacar su papel como: células diana para la replicación del parásito, presentadoras de antígenos (CPA) y son fuente de citoquinas moduladoras de la respuesta inmune mediada por linfocitos T (LT). Asimismo, tras ser activadas por LTh1 son capaces de provocar la muerte parasitaria intracelular (Teixeira *et al.*, 2006).

Las células *Natural Killer* NK tras la inoculación llegan al punto de entrada 24 horas después (Müller *et al.*, 2001).

Las CD de la piel, potentes CPA, también se infectan, debido a que los parásitos son inoculados en la dermis, donde se encuentran estas células. Mediante una activación regulada por el CMH I y II, las CD transportan los parásitos desde la piel infectada hasta los LN presentándose a LT antígeno- específicos (Moll, 2000).

Tanto los CD como las CL, al igual que los macrófagos, transportan los amastigotes a los LN regionales para presentar sus antígenos a los LT, a través de moléculas del CMH, que en perros resistentes están muy implicadas en el desarrollo de la inmunidad celular (Ferrer, 2002; Sacchi *et al.*, 2006).

Los promastigotes metacíclicos deben evadir en primer lugar la lisis mediada por el complemento, para posteriormente adherirse a los receptores de los macrófagos. Posteriormente, son fagocitados y localizados en el interior de una vacuola parasitófora (Tittig & Bogdan, 2000; Ferrer, 2002; Bañuls *et al.*, 2007).

Los macrófagos transportan los parásitos, primero a los linfonodos regionales (LN), y después al resto del organismo. Esta diseminación va a depender de la resistencia que presente el hospedador, de manera que en caninos susceptibles la diseminación puede ocurrir en horas, mientras que en caninos resistentes pueden permanecer confinados en la piel y LN regionales (Ferrer, 2002).

La respuesta innata, además de ejercer una rápida línea de defensa contra la infección, al mismo tiempo inicia el proceso que permite el eventual desarrollo de la respuesta inmune adaptativa y el establecimiento de la memoria inmunológica (Fariñas, 2011).

La respuesta inmune se puede dividir en dos tipos: la que se presenta al inicio, intentando contener al patógeno rápidamente, de manera inespecífica, estereotipada e incapaz de presentar memoria (Respuesta inmune innata), y aquella que es capaz de montar toda una serie de estrategias particulares y sumamente específicas para eliminar al agente invasor y crear memoria (Respuesta inmune adaptativa) (Fariñas, 2011).

5.7.3 Respuesta Inmunitaria Adaptativa

En esta respuesta inmune adaptativa puede predominar una respuesta Th1 de tipo celular, con producción de altos niveles de citoquinas del tipo IFN- γ , Il-12 y TNF- α y producción de inmunoglobulina IgG2a, mientras que una respuesta de predominio humoral será Th2

con producción de citoquinas IL-4, IL-10 e IL-5 y producción de inmunoglobulinas A, E y IgG, o bien respuestas mixtas Th1/Th2 (Fariñas, 2011).

5.7.3.1 Respuesta inmunitaria Celular

La resistencia del perro a la infección por *Leishmania* depende del desarrollo de una potente respuesta inmune celular, en la cual participan activamente los linfocitos CD4+ de tipo Th1, mediante la síntesis y liberación de citoquinas como la IL-2, IL-12 y el interferón gamma (IFN- γ), necesarios para la activación macrofágica, la respuesta efectora de los linfocitos T CD8+ citotóxicos y la actividad citotóxica de las células asesinas naturales (del inglés *natural killer*, *Nk*), que dan lugar a la destrucción del parásito. La actividad leishmanicida es debida al aumento de la capacidad de los macrófagos de producir oxígeno tóxico y radicales de nitrógeno (NO) en respuesta al IFN- γ . Sin embargo, si la respuesta es protagonizada por las células CD4+ de tipo Th2, productoras de IL-4 y IL-10, esta respuesta puede predisponer a un cuadro clínico de mayor gravedad (Fariñas, 2011).

Una buena respuesta inmunitaria celular parece ser esencial para controlar la infección y no desarrollar la enfermedad (Holzmuller *et al.*, 2006).

Normalmente, estos perros se caracterizan por presentar una respuesta inmunitaria humoral ausente o leve. Por el contrario, los perros enfermos con una enfermedad moderada a grave se caracterizan por presentar una reducida respuesta inmunitaria celular y una exagerada respuesta humoral que no es eficaz para controlar esta infección (Baneth *et al.*, 2008).

5.7.3.2 Respuesta Inmunitaria Humoral

Tanto en caninos como en humanos frente a leishmaniosis, se han observado incrementos policlonales y a veces también monoclonales de inmunoglobulinas por sobreactivación de linfocitos B. Estos anticuerpos no son protectivos e incluso sus niveles están asociados positivamente con la presencia y severidad de la enfermedad.

La leishmaniosis clínica en el perro se asocia a una marcada producción de anticuerpos, principalmente inmunoglobulinas G (IgG), mientras que las IgM, IgE e IgA se producen en mucha menor cantidad (Fariña, 2011). Los niveles de anticuerpos anti-Leishmania detectados en perros enfermos son superiores a los detectados en perros infectados sanos. Existe una correlación positiva entre los niveles de anticuerpos anti-Leishmania, la carga parasitaria y el grado de enfermedad (Solano-Gallego *et al.*, 2009) (véase anexo #7).

5.8 Estadios Evolutivos

5.8.1 Amastigotes

Los amastigotes son organismos intracelulares, es una forma inmóvil, viven dentro de vacuolas lisosomales de células fagocíticas, carecen de flagelo y presentan una forma ovalada o redonda y miden de 2 a 4 μm por 1,5 a 2,5 μm , posee núcleo, generalmente excéntrico y adyacente a este se encuentra el kinetoplasto. Su pH es de 4-5 y temperatura óptima de desarrollo es 37 ° C esto significa que están adaptados a la temperatura corporal y al medio ácido de los fagolisomas de los macrófagos (Maia *et al.*, 2010; Martínez-Subiela *et al.*, 2011) (véase anexo #8).

5.8.2 Promastigotes

Es la forma móvil extracelular su morfología es alargada, presenta un núcleo central y un Kinetoplasto terminal o subterminal, en la parte anterior del parásito, se origina un flagelo, casi de igual tamaño de cuerpo. Metabólicamente, utilizan aminoácidos y azúcares como fuente principal en condiciones aeróbicas. Su pH es de 7 y su temperatura de crecimiento es de 25°-27°C. En este estadio del parásito, expresamente se parece a las condiciones biológicas del intestino del insecto (Rosypal *et al.*, 2005a; Rodríguez-Cortés *et al.*, 2007a; Fernández-Cotrina *et al.*, 2013) (véase anexo #9).

5.9 Reservorio

Un hospedador reservorio es aquel infectado por el agente causante de una enfermedad que puede actuar como una fuente de infección para los seres humanos y otros hospedadores (Dantas- Torres *et al.*, 2012). En los países o regiones donde la leishmaniosis es endémica, como España, los perros infectados son el principal reservorio de *L. infantum*. Debido a su densidad relativamente alta los perros parecen ser los únicos animales domésticos capaces de mantener, naturalmente, los parásitos de la especie *L. infantum* (Ash-Ford, 2000).

En la leishmaniosis muchos animales, entre domésticos y silvestres, actúan como reservorio, como lo son el perro, gato, conejos, ratas, caballos entre otros, pero el perro (*Canis lupus familiaris*) es el principal reservorio peridoméstico de la infección por *L. infantum*, debido al elevado número de individuos presentes en el nicho ecológico y su estrecha relación con el vector (Alvar *et al.*, 2004).

De acuerdo con la definición de la OMS el canino presenta todas las características de un reservorio perfecto, por presentar infección crónica con una fase subclínica prolongada, accesible al vector y el estrecho contacto que tiene con los humanos (WHO, 2010).

En áreas endémicas se ha documentado la infección en otros animales domésticos, incluyendo gatos (Martín-Sánchez *et al.*, 2007; Navarro *et al.*, 2010; Millán *et al.*, 2011), caballos (Solano-Gallego *et al.*, 2003a; Rolão *et al.*, 2005; Fernández-Bellon *et al.*, 2006), cerdos (Morales-Silva *et al.*, 2006), vacas (Lobsiger *et al.*, 2010), ovejas y cabras (Fisa *et al.*, 1999), que actuarían como hospedadores paraténicos, aunque no se conoce su papel epidemiológico. Los animales mantenidos en cautividad en zoológicos en áreas urbanas endémicas están bajo un riesgo elevado de infección, pudiendo suponer un riesgo para otras especies susceptibles, incluyendo los humanos (Jusi *et al.*, 2011; Souza *et al.*, 2014).

La creciente descripción de casos de leishmaniosis felina en la literatura hace pensar que los gatos pueden desempeñar un papel en la epidemiología de la Leishmaniosis, de forma que en áreas endémicas de Leishmaniosis Canina (Lcan), lejos de ser un reservorio meramente accidental, podría actuar como un reservorio secundario de la enfermedad (Gramiccia y Gradoni, 2005; Martín- Sánchez *et al.*, 2007; Solano-Gallego *et al.*, 2007b). No obstante, las infecciones felinas subclínicas son comunes en áreas endémicas de Lcan, aunque los casos de leishmaniosis clínica en gatos son poco frecuentes (Miró *et al.*, 2014).

5.10 Otros Reservorios Descritos

Existen diversas especies de mamíferos en las que se ha identificado *Leishmania* debido al alto número de individuos presentes en el nicho ecológico y a su estrecha interacción con el vector (Alvar y Col., 2004). Existe además un periodo selvático de la infección por

L. infantum que es mantenido por canidos silvestres como el zorro, el lobo o el chacal (Gramiccia y Gradoni, 2005). En la Península ibérica se indicó la infección por *L. infantum* en carnívoros silvestres como por ejemplo lince, gineta, mangosta o tejón (Sobrino *et al.*, 2008), incluyendo primates en Brasil (Malta *et al.*, 2010) marsupiales en Australia y España (Rose *et al.*, 2004; Dougall *et al.*, 2009; Miró *et al.*, 2013; Ramírez *et al.*, 2013), liebres, nutrias, lince, hurones domésticos, mapaches, murciélagos, todo tipo de roedores y lagomorfos en España (García *et al.*, 2014; Molina *et al.*, 2012; Moreno *et al.*, 2014a), roedores en Portugal y Grecia (Papadogiannakis *et al.*, 2010b; Helhazar *et al.*, 2013), murciélagos en Brasil, Venezuela y Etiopía (De Lima *et al.*, 2008; Savani *et al.*, 2010; Kassahun *et al.*, 2015) y tamandúas en Brasil (De Araújo *et al.*, 2013). También se ha descrito la infección en aves (Alexander *et al.*, 2002; Otranto *et al.*, 2010b).

Entre otros reservorios secundarios también se han notificado casos de leishmaniosis clínica en équidos (primero en Brasil y posteriormente en la cuenca mediterránea, Alemania y Suiza) (Pradella, *et al.*, 2020).

5.11 Epidemiología

La Leishmaniosis engloba a un grupo de enfermedades causadas por más de 20 especies y subespecies de protozoos flagelados pertenecientes al género *Leishmania*, que afectan tanto al ser humano como a otros vertebrados. Es una zoonosis de importancia mundial en salud pública y actualmente constituye la tercera enfermedad humana más importante de las transmitidas por vectores, tras la malaria y la filariasis, y la novena enfermedad infecciosa más grave a nivel mundial (Alvar *et al.*, 2006).

La mayoría de los estudios epidemiológicos de la infección por *Leishmania* en poblaciones caninas se han basado en la detección de anticuerpos específicos en estudios

transversales. La seroprevalencia en el sur de Europa varía del 5% hasta más del 30%. Basándose en datos serológicos de Italia, Francia, España y Portugal, se ha estimado que, al menos, 2,5 millones (de 15 millones) de perros están infectados en estos países (Moreno y Alvar, 2002).

Prevalente en regiones tropicales que albergan moscas del género *Phlebotomus* (hemisferio oriental-viejo mundo) o del género *Lutzomyia* (hemisferio occidental-nuevo mundo) (Killick-Kendrick., 1999).

Tabla 3

Seroprevalencia de la infección por Leishmania infantum en perros. Ejemplos de algunos países europeos donde la leishmaniosis canina es endémica

País (región)	Perros (n)	Seroprevalencia (rango)	Referencia
España	1.100	15,7 % (0,0-46,6)	Miró <i>et al.</i> (2013)
Francia (sur)	3.922	12,4 % (3,0-28)	Marty <i>et al.</i> (2007)
Grecia (Atenas)	2.620	19,5 % (2,1-30,1)	Athanasiou <i>et al.</i> (2012)
Italia (norte)	4.456	26,4 % (14,0- 60,5)	Zaffaroni <i>et al.</i> (1999)
Portugal	3.974	6,3 % (0,9-17,4)	Cortés <i>et al.</i> (2012)

Fuente: Extraído del libro leishmaniosis una revisión actualizada, Solano-Gallego (2013)

5.12 Factores que intervienen en la aparición del vector

5.12.1 Factores medioambientales

La leishmaniosis en el perro se está extendiendo a zonas nuevas por el impacto del cambio climático, que permite la aparición de nuevos microclimas donde los flebótomos pueden sobrevivir, además de por el aumento de los desplazamientos de animales y personas (Gálvez, 2010).

Los cambios climáticos pueden afectar la distribución de leishmaniosis directamente, por el efecto del aumento de la temperatura media sobre el desarrollo del parásito y la competencia del vector o indirectamente, por el efecto de las variaciones ambientales sobre la variedad y la abundancia de los flebótomos (Sharma y Singh, 2008).

Las actividades humanas que resulten en causar un impacto ambiental como cambios demográficos y el calentamiento global de la tierra pueden incrementar la población de flebótomos, y, por lo tanto, el número de casos de Leishmaniosis (Gálvez *et al.*, 2010b; Vilas *et al.*, 2012; Arce *et al.*, 2013).

Debido al calentamiento global, en Europa se ha desplazado hacia el norte la latitud máxima a la cual los flebótomos sobreviven y se reproducen (Maroli *et al.*, 2008).

En los últimos años, varios informes han demostrado la emergencia de casos autóctonos de Leishmaniosis canina (Ballart *et al.*, 2011) y humana (Cenderello *et al.*, 2013) en nuevas regiones, junto con un aumento significativo del número de perros infectados en áreas endémicas a causa de los factores ambientales.

En España los flebótomos tienen una actividad estacional que va generalmente de mayo a octubre siendo este el final de la primavera y el inicio del verano. Sin embargo, en los últimos años este periodo se ha extendido debido al aumento de las temperaturas (AEMET, 2020).

5.13 Factores del Reservorio

5.13.1 Edad

La edad parece ser un factor de riesgo importante ya que se ha detectado una distribución bimodal de prevalencia de la enfermedad: en edades tempranas hasta los 3-4 años y a partir de los 7-8 años (Cardoso *et al.*, 2004; Miranda *et al.*, 2008; Gálvez *et al.*, 2010b; Miró *et al.*, 2012).

5.13.2 Especie

Mayor cantidad de casos en caninos siendo el reservorio principal (Solano-Gallego *et al.*, 2009).

5.13.3 Raza

Algunas razas de perros como Bóxer, Cocker Spaniel, Rottweiler y Pastor Alemán, parecen ser más susceptibles al desarrollo de la enfermedad (França-Silva *et al.*, 2003).

Otras razas como las autóctonas, como lo son el Podenco ibicenco y los perros mestizos de áreas endémicas, tienen más probabilidad de presentar inmunidad celular protectora

(Solano-Gallego *et al.*, 2000) y raramente presentan signos clínicos de leishmaniosis (Chicharro *et al.*, 2005).

Se han descrito otros factores que predispondría al reservorio a ser infectado y que llegue a enfermar, pero aún no están descritos completamente, entre los que se mencionan están el estado nutricional, la situación inmunológica por inmunosupresión, enfermedades concomitantes y predisposición genética (Quinnell *et al.*, 2003b; Sánchez-Robert *et al.*, 2005; 2008).

5.13.4 Tamaño

El tamaño es considerado en algunos estudios como una variable epidemiológica relacionada con la infección por *L. infantum*, de manera que se han observado seroprevalencias más elevadas en razas grandes que en razas pequeñas (Martín-Sánchez *et al.*, 2009; Gálvez *et al.*, 2010b; Miró *et al.*, 2012).

5.14 Manifestaciones Clínicas

Los signos clínicos que aparecen más frecuentemente son los cutáneos, que se observan en aproximadamente el 80% de los perros enfermos (Roura; Miró; Sainz; Estrada; Solano *et al.*, 2015) (véase anexo #10).

La linfadenomegalia está presente en un 70-80%, y los signos clínicos generales (apatía, adelgazamiento y atrofia muscular) que están presentes en un 40-60% siendo también muy frecuentes *Leishmania* (Solano-Gallego *et al.*, 2001b; Baneth *et al.*, 2008).

En la tabla #4 se puede observar muchos otros signos clínicos muy amplios que se indican a continuación.

Tabla 4*Signos clínicos más comunes de la leishmaniosis canina*

Generales	Disminución o aumento del apetito, Estado nutritivo deficiente hasta la caquexia, atrofia muscular, letargo, mucosas pálidas, epistaxis, linfadenomegalia generalizada, hepato-esplenomegalia, cojera o inflamación articular, fiebre, poliuria y polidipsia, vómitos, diarreas y alteraciones/ desequilibrios vasculares.
Cutáneos o mucocutáneos	Dermatitis exfoliativa (localizada o general), dermatitis ulcerativa (uniones mucocutáneas, cojinetes o callos de apoyo), dermatitis papular, dermatitis nodular, lesiones en la trufa (similar a pénfigo-lupus), onicopatías, hiperqueratosis nasodigital
Oculares	Lesiones palpebrales, lesiones conjuntivales difusas o nodulares, lesiones corneales (queratitis nodular, queratoconjuntivitis p queratitis seca), lesiones de la esclera (epiescleritis o escleritis difusa o nodular), uveítis anterior difusa o granulomatosa, uveítis posterior (coriorretinitis, hemorragia o desprendimiento de retina), glaucoma, panoftalmia, lesiones de la órbita (granulomas o miositis)
Otros	Renales, gastrointestinales, cardíacos, reproductivos o neurológicos

Fuente: (Roura; Miró; Sainz; Estrada; Solano *et al.*, 2015)

Tabla 5

Porcentaje de aparición de signos clínicos presentes en perros con Leishmaniosis por L. Infantum

Signos clínicos	%
Generales:	
-Linfadenomegalia generalizada	
-Pérdida de peso	49-90
-Caquexia	2-78
-Astenia	3-48
-Palidez de membranas mucosas	8-33
-Esplenomegalia	10-58
-Poliuria y polidipsia	10-56
-Fiebre	4-12
-Vómitos	4-36
-Diarrea	10
	13
Cutáneos:	
-Dermatitis exfoliativa no prurítica, con o sin alopecia	39,6-73,1
-Dermatitis erosiva-ulcerativa	15,3-40
-Dermatitis nodular	2-17
-Dermatitis papular	0-1,6
-Dermatitis pustular	2-13
-Hiperqueratosis nasal	0-27,5
-Hiperqueratosis plantar	0-31
-Onicogriphosis	8-71,1
-Pioderma bacteriana	24
Oculares:	
-Blefaritis	12
-Queratoconjuntivitis (común o seca)	10-20
-Uveítis anterior	4-8

Epistaxis	6-10
Articulares	1-16
Atrofia muscular	25
Alteraciones vasculares (vasculitis, tromboembolismo arterial)	No cuantificado
Alteraciones neurológicas	No cuantificado

Fuente: Información extraída de: Ciaramella *et al.*, 1997; Koutinas *et al.*, 1999; Blavier *et al.*, 2001; Koutinas *et al.*, 2001; Solano-Gallego *et al.*, 2001c; Baneth *et al.*, 2008; Manna *et al.*, 2009; Shaw *et al.*, 2009; Noli y Saridomichelakis, 2014 y Saridomichelakis y Koutinas, 2014.

5.15 Alteraciones Laboratoriales

5.15.1 Proteínas séricas y proteinograma

- Hiperglobulinemia
- Hipoalbuminemia.
- Reducción del cociente albúmina/globulinas.

5.15.2 Hemograma

- Anemia no regenerativa (leve o moderada).
- Leucocitosis, linfopenia o leucopenia.
- Trombocitopenia.
- Trombocitopenia.
- Alteraciones de la hemostasia secundaria y fibrinólisis.

Tabla 6

Porcentaje de aparición de alteraciones clinicopatológicas en la Lcan

Alteración clinicopatológica	(%)
Anemia	22-73
Leucocitosis	24
Neutrofilia	24
Linfopenia	44
Trombocitopenia	22-44
Hiperproteinemia	49-73
Hipoalbuminemia	28-68
Hiperglobulinemia	30-71
Reducción ratio albúmina/globulinas	63-76
Azotemia	12-24
Incremento de enzimas hepáticas	16-26
Proteinuria	46-72

Fuente: Información extraída de (Ciaramella *et al.*, 1997; Koutinas *et al.*, 1999; Koutinas *et al.*, 2001; Solano-Gallego *et al.*, 2001c; Baneth *et al.*, 2008; Shaw *et al.*, 2009)

5.15.3 Perfil bioquímico/urianálisis

- Proteinuria (de leve a grave).
- Azotemia renal.
- Elevación de la actividad de las enzimas hepáticas.

5.16 Estadios Clínicos

Tabla 7

Estadio clínico de la leishmaniosis canina basado en el resultado serológico, signos clínicos, alteraciones laboratoriales y pronóstico

Estadio Clínico	Serología	Signos clínicos	Alteraciones de laboratorio	Pronóstico
Estadio I Enfermedad leve	De negativos a bajos niveles de anticuerpos.	Perros con signos clínicos leves, como linfadenomegalia periférica, dermatitis papular.	Por lo general, sin alteraciones clínico-patológicas observadas. Perfil renal normal: creatinina <1,4 mg/dl, sin proteinuria (UPC<0,5).	Bueno.
Estadio II Enfermedad moderada	De bajos a elevados niveles de anticuerpos.	Perros que, además de los signos que se enumeran en el estadio Clínico I, pueden presentar: lesiones cutáneas difusas o simétricas, como dermatitis exfoliativa, Onicogriphosis, ulceraciones (plano nasal, almohadillas,	Alteraciones clínico-patológicas, como leve anemia no regenerativa, Hiperglobulinemia o hipoalbuminemia. Subestadios: Perfil renal normal: creatinina <1,4 mg/dl, sin proteinuria (UPC <0,5).	De bueno a grave.

Estadio III Enfermedad grave	De medios a elevados niveles de anticuerpos.	<p>prominencias óseas, uniones mucocutáneas), anorexia, pérdida de peso, fiebre y epistaxis.</p> <p>Perros que, además de los signos clínicos que figuran en los estadios I y II, pueden presentar signos clínicos originados por las lesiones producidas por el depósito de inmunocomplejos: vasculitis, artritis, uveítis y glomerulonefritis.</p>	<p>Creatinina <1,4 mg/dl. UPC= 0,5-1.</p> <p>Alteraciones clínico-patológicas enumeradas en el estadio clínico II junto con aquellas propias de la enfermedad renal crónica en estadio I (UPC >1) O II (creatinina 1,4-2 mg/dl) de IRIS* (IRIS, 2006).</p>	De reservado a grave.
Estadio IV Enfermedad muy grave	De medios a elevados niveles de anticuerpos.	<p>Perros con los signos clínicos que figuran en el estadio III, así como tromboembolismo pulmonar, o síndrome nefrótico y enfermedad renal terminal.</p>	<p>Alteraciones clínico-patológicas enumeradas en el estadio III junto con aquellas propias de la enfermedad renal crónica en estadio III (creatinina 2-5 mg/dl) o IV (creatinina > 5</p>	Grave

mg/dl) de IRIS
(IRIS, 2006).
Síndrome
nefrótico:
marcada
proteinuria (UPC
> 5).

*Sociedad Internacional de Interés Renal (www.iris-kidney.com)

Fuente: (Solano-Gallego *et al.*, 2009)

5.17 Infección o Enfermedad

En la Leishmaniosis canina, la infección no equivale a enfermedad, dada la alta prevalencia de infecciones subclínicas. Es decir, en un área endémica, la presencia de perros infectados es alta (una prevalencia cercana al 60%) comparada con el número de perros realmente enfermos de Leishmaniosis (aproximadamente una prevalencia del 10-30%) (Solano-Gallego *et al.*, 2014).

Un perro infectado por *Leishmania* sano es aquel en el que podemos demostrar la presencia del parásito y que generalmente tiene un nivel bajo de anticuerpos pero que clínicamente está sano (sin ninguna alteración de laboratorio y sin signos clínicos) o con signos clínicos o patológicos asociados a otras enfermedades concomitantes (Miró *et al.*, 2013).

Un perro enfermo es aquel en el que se puede demostrar la presencia del parásito y generalmente tiene un nivel medio-alto de anticuerpos, pero además tiene signos clínicos

o de laboratorio directamente asociados a la presencia de *Leishmania* (Solano-Gallego *et al.*, 2001b; Baneth *et al.*, 2008).

5.18 Diagnóstico

El diagnóstico de la leishmaniosis canina es muy complejo, por la diversidad de signos clínicos, el extenso rango de alteraciones clinicopatológicas inespecíficas y las diferentes respuestas inmunitarias del canino frente a la infección (Solano-Gallego *et al.*, 2011). Por lo cual es necesario el uso integrado de todos los resultados que deben incluir los datos epidemiológicos, signos clínicos compatibles, alteraciones clinicopatológicas, diagnóstico diferencial, así como el uso de más de una prueba diagnóstica específica para demostrar la infección (citología, técnicas moleculares, cultivo, histopatología e inmunohistoquímica) y la presencia de anticuerpos específicos IgG (serología) (Noli & Saridomichelakis, 2014).

Se han descrito muchas formas de poder identificar a los animales infectados, pero en este estudio se usará el método Enzimoimmunoensayo (ELISA) (Rodríguez-Cortés *et al.*, 2013; Solano-Gallego *et al.*, 2014) por lo cual se explicará a continuación.

5.18.1 ELISA (Enzimoimmunoensayo)

Es una prueba específica cuya sensibilidad es superior a la técnica de Inmunofluorescencia indirecta (IFI) (Rodríguez-Cortés *et al.*, 2013; Solano-Gallego *et al.*, 2014). La sensibilidad y especificidad pueden oscilar entre 80 y 99,5% y entre 81 y 100%, respectivamente (Marcondes *et al.*, 2011a).

Sus principales ventajas son la automatización, lo que permite procesar un gran número de muestras simultáneamente, así como una lectura espectrofotométrica objetiva y, al igual que la técnica de IFI, permite cuantificar títulos de anticuerpos específicos.

Se han desarrollado diversas variantes del método clásico (ELISA competitivo, Dot-ELISA, FAST-ELISA) que son de gran utilidad en los estudios de campo por su simplicidad, rapidez de ejecución y sensibilidad, y en los estudios epidemiológicos en áreas endémicas de Lcan.

5.18.2 Información sobre la muestra a utilizar para el test ELISA de Leishmania

Las muestras deberán estar a temperatura ambiente (18-25°C) antes de iniciarse el procedimiento de prueba.

En esta prueba se puede utilizar suero o plasma, ya sea fresco o que haya estado congelado o almacenado a 2-8°C.

El suero o plasma puede almacenarse hasta por 7 días a 2-8°C. Para un almacenamiento por más tiempo, la muestra debe congelarse (20°C o menor temperatura).

EDTA o heparina en el plasma no afectará los resultados.

El procedimiento que se realizó para obtener los datos de los caninos positivos o negativos fueron:

Realizar la extracción de sangre del paciente canino que ingresó a la veterinaria San Antoni para luego transferir 2 gotas de la muestra obtenida (sangre entera, suero o plasma) a un tubo de muestra.

El siguiente paso será mantener el frasco en posición vertical, añadir 6 gotas de conjugado al tubo de muestra y tapar el tubo de muestra, mezclarlo bien invirtiendo el tubo de 3 a 5 veces.

Luego se colocará el dispositivo sobre una superficie plana y se añadirá el contenido del tubo de muestra a la cubeta de muestra.

La muestra fluirá a través de la ventanilla de resultados llegando al círculo de activación en 30 a 60 segundos aproximadamente.

Cuando comience a aparecer color en el círculo de activación se pulsará firmemente el activador hasta que esté a nivel con el cuerpo del dispositivo.

Y finalizará Leyendo el resultado de la prueba a los 6 minutos (véase anexo #13).

5.19 Tratamiento

Hasta el momento no se han encontrado principios activos totalmente eficaces frente a la Leishmaniosis canina. En la mayoría de los perros, tras el tratamiento, mejora el cuadro clínico, pero no se produce la “curación parasitológica”, y en muchos casos pueden aparecer recaídas (Noli y Auxilia, 2005).

El principal objetivo del tratamiento de la Leishmaniosis canina es mejorar y/o reducir la gravedad del cuadro clínico; el segundo, y no menos importante, es reducir la carga parasitaria para intentar fomentar una mejor respuesta inmunitaria por parte del perro enfermo (Oliva *et al.*, 2010; Miró *et al.*, 2011a; Otranto y Dantas-Torres, 2013).

Además, el tratamiento permite reducir la transmisión, ya que los perros tratados dejan de ser infectantes, al menos durante un periodo de tiempo (Miró *et al.*, 2014).

En estudios realizados sobre el tratamiento y la transmisión de la enfermedad demuestran que, tras el tratamiento (antimoniales solos, en combinación con alopurinol o formas liposomadas), el poder infectante de los perros se reduce o anula durante un periodo no inferior a 4 meses (Guarga *et al.*, 2002; Ribeiro *et al.*, 2008; Miró *et al.*, 2011a; Da Silva *et al.*, 2012).

La combinación de glucantime y alopurinol posee una acción sinérgica, observándose una mayor eficacia, permitiendo administrar dosis inferiores y durante menos tiempo, lo que favorece la tasa de curaciones y que las recaídas ocurran más tarde y espaciadas (Baneth y Shaw, 2002; Noli y Auxilia, 2005; Manna *et al.*, 2015). En el estudio de seis años de duración llevado a cabo por Manna *et al.* (2015), en los nueve perros tratados con esta combinación se produjo una mejoría clínica y una reducción significativa de la carga parasitaria en LN a los 30 días post-tratamiento, y tan sólo se observó una recidiva en un perro tratado con esta combinación, a los 12 meses post-tratamiento.

Además, se consigue disminuir la presencia del parásito en la piel, reduciendo así el poder infectante de los perros a los flebótomos (João *et al.*, 2006; Miró *et al.*, 2011a). En perros tratados únicamente con glucantime también se ha observado mediante xenodiagnóstico un porcentaje muy reducido de flebótomos infectados (Guarga *et al.*, 2002). A su vez, Ribeiro *et al.* (2008) detectaron una elevada reducción de la capacidad infectante de los perros sobre *L. longipalpis*, cinco meses tras el tratamiento con una formulación liposomada de antimoniato de n-metilglucamina.

La combinación de moléculas leishmanicidas con alopurinol (leishmanioestático) es hoy por hoy el tratamiento de elección de los perros enfermos de Leishmaniosis, siendo los antimoniales pentavalentes, seguidos de la miltefosina, los protocolos reconocidos como más eficaces en las guías prácticas editadas para veterinarios clínicos (Solano-Gallego *et al.*, 2011).

El alopurinol como monoterapia se utiliza en algunos casos, aunque la información relativa a su eficacia es controvertida, sobre todo porque, al no ejercer un efecto leishmanicida, no existe nunca un aclaramiento del parásito, siendo posible su detección en todo momento (Bourdeau *et al.*, 2014).

De entre todos los fármacos disponibles, los leishmanicidas más utilizados son los antimoniales pentavalentes (Glucantime® y Pentostam ®), seguidos de la miltefosina (Milteforán®). La Anfotericina B en su estado natural o en su forma lipídica (Fungizona® y AmBisome®, respectivamente), son muy poco utilizados en medicina veterinaria tanto por su elevado precio como por su modo de aplicación (vía endovenosa). El leishmanioestático por excelencia es, por su inocuidad y eficacia, el alopurinol (Zyloric®) (Miró y Molina, 2006).

Para realizar un tratamiento adecuado es preciso evaluar clínicamente al perro y establecer una clasificación clínica en función de la gravedad de los signos clínicos y/o alteraciones clínico-patológicas que nos permitan decidir el tipo de intervención a realizar.

5.19.1 Miltefosina

La miltefosina es una alquilfosfocolina, perteneciente al grupo de los alquilfosfolípidos, que son análogos sintéticos de la lisofosfocolina. Originariamente se desarrolló como agente antineoplásico, el cual demostró capacidad parasiticida *in vitro* e *in vivo* tanto frente a los promastigotes como a los amastigotes de varias especies de *Leishmania* (Farca *et al.*, 2012).

La miltefosina posee una vida media de eliminación larga en perros (6,7 días), lo que conlleva una gran acumulación del fármaco en plasma tras la administración oral diaria repetida (Woerly *et al.*, 2009). En perros, la capacidad metabólica para transformar la miltefosina en metabolitos diferentes es baja y no existe una primera fase de metabolización en el hígado (Bianciardi *et al.*, 2009).

Los mecanismos de acción antitumoral y leishmanicidas de la miltefosina no son del todo conocidos. Una hipótesis se basa en que la miltefosina se incorpora a la bicapa lipídica de la membrana plasmática del parásito, por sus características anfipáticas, aumentando la permeabilidad y alterando el metabolismo de los alquil-lípidos (Lux *et al.*, 2000). Otra hipótesis sugiere que provoca alteraciones de la membrana flagelar de los promastigotes y defectos en la síntesis de fosfolípidos (Santa-Rita *et al.*, 2000). En cualquier caso, termina produciendo la muerte celular por apoptosis (Paris *et al.*, 2004).

Los efectos adversos de la miltefosina incluyen disorexia, vómitos y diarreas leves y autolimitantes (Woerly *et al.*, 2009; Miró, 2013a). Debido a su baja nefrotoxicidad, la miltefosina se ha recomendado para tratar perros con leishmaniosis e IRC, en lugar de los antimoniales (Bianciardi *et al.*, 2009). De hecho, en el estudio llevado a cabo por Miró *et al.* (2009) con perros con niveles elevados de creatinina, urea y ratio UPC, toleraron el

tratamiento con miltefosina a la dosis recomendada y no mostraron empeoramiento de estos parámetros.

5.19.2 Alopurinol

El alopurinol es un análogo estructural de la hipoxantina, que es metabolizado por los parásitos de *Leishmania* para producir un análogo inactivado de inosina. Éste es incorporado en el ARN de *Leishmania* causando la formación de sustancias tóxicas que conllevan un error en la síntesis proteica, actuando como parasitostático (Baneth y Shaw, 2002).

La dosis habitual empleada es de 10-20 mg/kg/día (v.o.), repartida en 2 tomas como terapia de mantenimiento a largo plazo, entre 6 y 18 meses. La duración del tratamiento con alopurinol no está bien definida (Solano-Gallego *et al.*, 2011). Recomiendan interrumpir la dosis de alopurinol cuando se consiguen las condiciones siguientes: 1) Una recuperación física y clinicopatológica completa al menos durante un año desde el inicio del tratamiento, y 2) una reducción marcada del título de anticuerpos.

Este compuesto se utiliza ampliamente en Europa, ya que es seguro, económico, se administra por vía oral y no se emplea para tratar la leishmaniosis humana (Torres *et al.*, 2011). El interés en el uso del alopurinol reside sobre todo en la prevención de las recidivas, ya que cuando se administra por periodos superiores a 5 meses, la probabilidad de recidivas es mucho menor que cuando se administra únicamente antimonio de n-metilglucamina (4-11% frente a 32-100%) (Noli y Auxilia, 2005).

A pesar de que los efectos adversos causados por el uso de alopurinol son poco frecuentes, la función hepática y renal deben monitorizarse durante su uso prolongado, ya que puede producirse xantineria y la formación de urolitos de xantina en aproximadamente el 12% de los perros tratados (Torres *et al.*, 2011). No obstante, haciendo urianálisis periódicos, llevando una alimentación equilibrada y asegurando una correcta hidratación se previenen episodios de urolitiasis (Torres *et al.*, 2011), y en perros con tratamientos prolongados se pueden monitorizar las posibles nefrolitiasis con ecografía abdominal (Miró, 2013).

5.19.3 Domperidona

Es un fármaco procinético gástrico y antiemético con actividad anti-D2 (antagonista de la dopamina). Estimula la producción de serotonina, la cual incrementa la secreción de prolactina (Berczi *et al.*, 2000). La prolactina tiene la capacidad de estimular la respuesta inmune celular mediada por linfocitos Th1 CD4+, con la liberación de IL-2, IL-12, IFN- γ y FNT- α . Esto induce una activación de macrófagos y células NK, seguida de una reducción de LTh2 CD4+ y FNT- β (Hinterberger-Fischer, 2000; Matera y Mori, 2000).

Sabaté *et al.* (2014) investigaron la eficacia de la domperidona en la prevención y el tratamiento de la Lcan a la dosis recomendada (0,5 mg/kg/12 horas durante 30 días, v.o., cada 4 meses). Para ello compararon dos grupos de perros seronegativos, uno tratado con domperidona y otro sin tratar, residentes en una zona altamente endémica de *L. infantum*. Durante 21 meses de seguimiento observaron una tasa de prevención del 77% en los animales tratados, y una reducción del riesgo de presentar signos clínicos de Leishmaniosis 7 veces inferior al de los no tratados. En comparación, la vacuna actualmente comercializada en España (CaniLeish®, Virbac), bajo condiciones similares presenta una reducción de riesgo de padecer Lcan de 4 veces en animales vacunados (Bongiorno *et al.*, 2013).

En cuanto a los efectos adversos que se han descrito para la domperidona son poco frecuentes, leves y autolimitantes, como galactorrea a los 7-9 días del inicio del tratamiento y diarrea leve (Sabaté *et al.*, 2014). No se han descrito alteraciones neurológicas asociadas a la domperidona puesto que no atraviesa la barrera hematoencefálica (Matera y Mori, 2000).

Tabla 8

Relación de los principios activos y posología recomendados en el tratamiento de la leishmaniosis canina, así como los principales efectos adversos relacionados con su uso.

Principio activo	Posología	Vía de administración	Efectos adversos
Antimoniato de meglumina	75-100 mg/kg al día durante 4-6 semanas (siempre con alopurinol)	Subcutánea	Leve azotemia ** Abscesos cutáneos/ celulitis
Miltefosina	2 mg/kg al día durante 4 semanas (siempre con alopurinol)	Oral (junto con la comida)	Trastornos digestivos (disorexia, vómitos, diarreas)
Alopurinol*	10 mg/kg/12 horas, durante mínimo 12 meses en la mayoría de los casos	Oral	Xantinuria Nefrolitiasis por xantina
Domperidona***	0,5 mg/kg/24h durante 4 semanas	Oral	Galactorrea

*Producto no registrado en la Unión Europea para uso veterinario

* Puede incrementar levemente la urea y/o creatinina, pero generalmente es reversible al interrumpir temporalmente el tratamiento

*** Inmunomodulador estudiado en estadios leves de la enfermedad.

Fuente: (Solano-Gallego et al., 2009 y 2011; Oliva *et al.*, 2010)

Tabla 9*Principales protocolos de tratamiento empleados en la Leishmaniosis canina*

Protocolos	Fármacos y posología
Primera elección	Antimoniato de meglumina (75-100 mg/kg al día, 4-6 semanas) + Alopurinol (10 mg/kg/12 horas, 12 meses)
Segunda elección	Miltefosina (2 mg/kg al día, 4 semanas) + Alopurinol sólo (10 mg/kg/12 horas, 12 meses)
Alternativos	Alopurinol solo (10 mg/kg/12 horas, 12 meses) Domperidona sola (0,5 mg/kg/24 horas, 4 semanas) Otras opciones: antibióticos y otros

Fuente: (Solano-Gallego *et al.*, 2009 y 2011; Oliva *et al.*, 2010)

VI. ANTECEDENTES

Gálvez y Montoya (2020) realizaron un reciente mapa de seroprevalencia de leishmaniosis canina en España sitúa las regiones de Andalucía, Baleares, Murcia, Valencia, parte de Cataluña y las provincias de Ourense y Cáceres como las más castigadas, con porcentajes de perros seropositivos por encima del 17% (véase anexo #1).

Según Miró *et al.*, (2012) La edad parece ser un factor de riesgo importante ya que se ha detectado una distribución bimodal de prevalencia de la enfermedad: en edades tempranas hasta los 3-4 años y a partir de los 7-8 años.

Otros estudios como el de Cortés *et al.*, (2012) muestran una menor tasa de infección en perros menores de dos años, mientras que los perros con edades comprendidas entre 5-8 años, mientras que Miró *et al* (2007b) indica que los mayores de 7 años son los que se infectan con más frecuencia. De forma similar, Cardoso *et al.*, (2004) observaron un riesgo de seropositividad en los animales de 9-11 años, dos veces superior al de los perros menores de dos años.

Schallig *et al.*, (2013) manifestó que el sexo por lo general no se considera un factor determinante. Sin embargo, algunos autores como Miranda *et al.*, (2008) señalan una mayor prevalencia en machos, lo cual podría atribuirse a su mayor comportamiento itinerante.

Cortés *et al.* (2012) observaron que los perros mestizos eran menos propensos a la infección, mientras que los perros de razas exóticas puras poseían mayor riesgo. A su vez, Franca-Silva *et al.*, (2003) ha descrito un mayor riesgo en los perros de pelo corto, lo que facilita la picadura de los flebótomos.

Solano-Gallego *et al.*, (2000) sugiere que, aunque en teoría, todas las razas son susceptibles a la infección por *L. infantum*, algunas razas autóctonas como el Podenco Ibicenco y mestizos de dicha raza se consideran más resistentes a la infección y Chicharro (2005) expresa que no suelen presentar signos clínicos.

En una investigación realizada por Miranda (2008) sobre las razas indica que el Caniche o el Yorkshire terrier parecen presentar porcentajes significativamente más bajos de infección comparados con las poblaciones de referencia.

Por el contrario, Quilez *et al.*, (2012) sugiere que, en perros de raza Bóxer, Cocker Spaniel, Rottweiler, Doberman y Pastor Alemán parecen ser más susceptibles a padecer la enfermedad.

Martín-Sánchez *et al.*, (2009) expresa que asociada a la raza se encuentra el tamaño del animal, el cual es considerado en algunos estudios como una variable epidemiológica relacionada con la infección por *L. infantum*, de manera que se han observado seroprevalencias más elevadas en razas grandes que en razas pequeñas. Mientras que Miró *et al.*, (2011b) indica que una posible explicación sería que una mayor masa corporal conlleva una mayor superficie expuesta a la picadura del vector, como se ha sugerido para otras enfermedades transmitidas por vectores en perros, como la thelaziosis.

Miró (2013) señala que este hecho también podría estar relacionado con la aptitud del perro, ya que los perros de talla media/grande son los más frecuentemente utilizados en actividades de pastoreo o guarda, pasando periodos de tiempo más largos en el exterior y estando, por tanto, más tiempos expuestos a los flebótomos.

Reisen (2010) expresa que, la temperatura condiciona la supervivencia de los flebótomos y la velocidad de desarrollo de cada una de las etapas de su ciclo biológico, tal como lo

expone El-Badry *et al.*, (2008), tanto los adultos como los estadios larvarios del vector son muy sensible a las altas temperaturas y a la escasez de humedad, lo cual pone en manifiesto que la cantidad de flebótomos en un área está influenciada por las condiciones climáticas y los factores físicos medioambientales, lo que facilita la estimación del riesgo de brotes de leishmaniosis.

Alam *et al.*, 2009; Chelbi *et al.*, 2009 y Martín-Sánchez *et al.*, 2009 revelaron que, la cercanía de los perros seropositivos y de las clínicas veterinarias con mayor incidencia de Lcan a los focos de DAP del vector, confirman que las densidades del vector se encuentran estrechamente correlacionadas con la infección por *L. infantum*. Por tanto, las densidades de los vectores podrían ser utilizadas como un indicador del riesgo de aparición de la Lcan en un área determinada.

Castillejo (2007) declara que, *P. perniciosus* presenta una fluctuación de tipo difásica, con una elevación hacia el mes de julio (verano) y otra hacia el mes de septiembre (otoño), mientras que *P. ariasi* presentó una sola elevación de actividad en el mes de agosto, mientras que, Gálvez (2011) en su estudio doctoral indicó que, los máximos de actividad de ambos vectores tuvieron lugar siempre entre los dos máximos de lluvias, en primavera y otoño, esto orienta a saber durante que épocas del año el riesgo de transmisión es mucho más elevado.

VII. HIPÓTESIS

7.1 Hipótesis General

- ❖ Ho: La frecuencia de casos de Leishmaniosis en la Clínica Veterinaria Sant Antoni- España en el periodo de 2015 a 2020 es igual o menor al 17%.
- ❖ Ha: La frecuencia de casos de leishmaniosis en la Clínica Veterinaria Sant Antoni- España en el periodo de 2015 a 2020 es mayor al 17%.

7.2 Hipótesis Específicas

- ❖ Ha: La frecuencia de Leishmaniosis en los perros que ingresaron a la clínica veterinaria es mayor al 17%.
- ❖ Ha: La raza es un factor de riesgo para la infección de Leishmania en caninos.
- ❖ Ha: Hay mayor incidencia de casos en caninos menores de 3 años y mayores de 8 años.
- ❖ Ha: La edad es un factor de riesgo para la infección de Leishmania en caninos.
- ❖ Ha: La estacionalidad es un factor de riesgo para la infección de Leishmania en caninos.
- ❖ Ha: El tamaño es un factor de riesgo para la infección de Leishmania en caninos.
- ❖ Ha: El sexo es un factor de riesgo para la infección de Leishmania en caninos.

VIII. MATERIALES Y MÉTODOS

8.1 Lugar de Ejecución

El presente estudio se realizó en el Centro Clínico Veterinario Sant Antoni que se encuentra en el municipio de Puçol dentro de la ciudad de Valencia en España con dirección en Avda. Alfinach, 8 46530 Puzol.

Página Web: <http://www.clinicasantantoni.com>

GPS: Latitud: 39.616132 (39° 36' 58.08" N) Longitud: -0.310575 (0° 18' 38.07" W).

8.2 Tipo y Diseño de Investigación

El presente estudio es de tipo descriptivo y retrospectivo analizándose la información desde enero del 2015 a enero del 2020.

Esta investigación descriptiva se encuentra orientada en detallar las características de grupos o fenómenos. El objetivo de utilizar una investigación descriptiva es de analizar la frecuencia de casos de Leishmaniosis canina en la Clínica Veterinaria Sant Antoni en Valencia-España. Los informes de cada canino más sus resultados ante la prueba de ELISA fueron utilizados como base para saber cuántos casos positivos de Leishmaniosis se obtuvieron a lo largo de 5 años en la Clínica Veterinaria.

Variables independientes

- Sexo de los canino
- Edad de los caninos

- Raza de los caninos
- Tamaño de los caninos
- Estacionalidad

Variable dependiente

- Test de *Leishmania*

8.3 Operacionalización de la variable

Variable	Escala de Medida	Definición Operacional	Dimensiones	Indicadores
Edad	Nominal	Conocer las edades de los caninos testados	Meses y años	<ol style="list-style-type: none"> 1. Cachorros: 0 a 1 año 2. Adultos 2 a 7 años 3. Geriátricos de 8 años en adelante
Raza	Nominal	Raza definida y raza no definida	Genética	<ol style="list-style-type: none"> 1. Raza no definida 2. Raza definida
Estacionalidad	Ordinal	Especificar las estaciones del año con más casos	Tiempo	<ol style="list-style-type: none"> 1. Primavera 2. Verano 3. Otoño 4. Invierno
Sexo	Nominal	Género de los pacientes caninos	Sexo	<ol style="list-style-type: none"> 1. Hembra 2. Macho
Tamaño	Ordinal	Conocer el tamaño de los caninos	Tamaño	<ol style="list-style-type: none"> 1. Pequeño 2. Mediano

				3. Grande
Teste ELISA (Leishmania)	Binomial	Observación de los resultados en la prueba	Colorimétrico	1. Positivo 2. Negativo

8.4 Muestreo

La población en la que se realizó el presente estudio está conformada por todas las historias clínicas de caninos positivos a la prueba diagnóstica de Leishmania en la Clínica Veterinaria Sant Antoni en los últimos 5 años.

8.5 Tamaño de Muestra

El tamaño de la muestra son todas las historias clínicas de caninos a los que se les realizó la prueba de Leishmania en la Clínica Veterinaria Sant Antoni en los últimos 5 años.

8.6 Instrumentos de Recolección de Datos

La información se obtuvo a través de la observación y revisión de los informes clínicos de todos los caninos a los que se les realizó la prueba de Leishmania en la Clínica Veterinaria Sant Antoni. El instrumento que se utilizó para la recolección de datos es el programa Win Vet del cual se observó y se extrajo la información necesaria transfiriéndola a una hoja de datos elaborada en Microsoft Excel®.

8.7 Procedimiento de Prueba

El estudio comprende la revisión de la base de datos del programa Win Vet (véase anexo #12) en el cual cada paciente luego de haber sido sometido al descarte de Leishmania pasaron a ser registrados en el programa antes mencionado indicando si fueron positivos o negativos y del cual se extrajo la información y fue ingresada al programa Excel en el cual se realizaron las fichas y tablas correspondientes.

El análisis que se realizó es descriptivo-correlacional, presentando los resultados por medio de tablas y gráficos.

Las variables de estudio se realizaron con pruebas de asociación estadística, como lo es la prueba de chi-cuadrado (χ^2) utilizada para determinar la existencia o no de independencia entre variables y la Razón de probabilidades (Odds Ration) como herramienta estadística/epidemiológica para comunicar los resultados de asociación que indica la fortaleza en la relación entre dos variables.

8.8 Aspecto Ético

Para realizar esta investigación, los propietarios de la Clínica Veterinaria San Antoni firmaron un documento el cual acredita el permiso para realizar dicha investigación. Todos los informes clínicos obtenidos y evaluados en los pacientes caninos que llegaron a la Clínica Veterinaria Sant Antoni durante los últimos 5 años (2015-2020), serán utilizados única y netamente de forma confidencial, que tiene como fin el desarrollo del presente estudio. (véase anexo #11).

IX. RESULTADOS

A lo largo del periodo de estudio comprendido entre los años 2015 – 2020 en la Clínica Veterinaria Sant Antoni en el municipio de Puzol, provincia de Valencia-España, se revisaron un total de 1300 registros de caninos a los que se les realizó el descarte de ELISA para leishmaniosis, de los cuales 275 registros de caninos fueron positivos a leishmaniosis canina y 1025 negativos, siendo la población analizada en este estudio, así pues fueron distribuidos en 5 variables como lo son, casos positivos según edades, casos positivos según raza, casos positivos según estacionalidad, sexo y tamaño.

Tabla 1

Frecuencia de animales testados que dieron positivos a Leishmania en la Clínica Veterinaria Sant Antoni durante el periodo 2015-2020.

PERIODOS	n	POSITIVOS	%	NEGATIVOS
2015	128	50	39,06	78
2016	210	57	27,14	153
2017	191	30	15,71	161
2018	236	42	17,80	194
2019	275	57	20,73	218
2020	260	39	15,00	221
Total	1300	275	21,15	1025

Fuente: Elaboración Propia – 2023

Los resultados obtenidos para la frecuencia de animales testados que dieron positivos a Leishmania en la Clínica Veterinaria Sant Antoni durante el periodo 2015-2020 se observó que, en la información reunida de 6 años, se obtuvieron un total de 1300 pacientes, de los cuales 275 (21,15%) fueron positivos a la prueba de Leishmania. Siendo

el 2015 el año con mayor proporción de animales positivos 39,06% (50/78), seguido por el año 2016 con una proporción de casos positivos del 27,14% (57/153), estos valores se encuentran reflejados en la tabla 1.

Tabla 2

Frecuencia de casos positivos a Leishmaniosis según la edad de la población estudiada de caninos durante el periodo 2015-2020.

EDAD	POSITIVO	%	TOTAL
Cachorro	43	15,03%	286
Adulto	215	25,18%	854
Geriátrico	17	10,63%	160
TOTAL	275	21,15 %	1300

Fuente: Elaboración Propia – 2023

Prueba χ^2 : $\alpha=0,05$ $gl=2$. $p < 0,005$.

Con respecto a la variable edad, se evidencia que de la población canina positivos a Leishmania, los caninos adultos son la población con mayor proporción de casos positivos 25,18% (215/854) en comparación con la proporción de los cachorros con 15,03% (43/286) de casos positivos y los geriátricos siendo esta última la población con menor proporción de caninos positivos a Leishmania 10,63% (17/160), los resultados se recogen en la tabla 2.

Tabla 3

Frecuencia de casos positivos a Leishmaniosis según la raza de la población estudiada de caninos durante el periodo 2015-2020.

RAZA	POSITIVOS	%	TOTAL,
Definida	172	19,26	893
No definida	103	25,31	407
TOTAL	275	21,15	1300

Fuente: Elaboración Propia – 2023

Prueba χ^2 : $\alpha=0,05$ $gl=1$ $p < 0,025$

En cuanto a la raza, se puede considerar que hubo mayor proporción de casos positivos a Leishmania en los caninos de raza no definida 25,31% (103/407) frente a los de raza definida 19,26% (172/893), evidentes en la tabla 3.

Tabla 4

Frecuencia de casos positivos a Leishmaniosis según el sexo en la población estudiada de caninos durante el periodo 2015-2020.

SEXO	POSITIVO	%	TOTAL
Hembra	106	18,50	573
Macho	169	23,25	727
TOTAL	275	21,15	1300

Fuente: Elaboración Propia – 2023

Prueba χ^2 : $\alpha=0,05$ $gl=1$ $p < 0,05$

Con respecto al sexo, se observó que de la población positiva de caninos hubo una mayor proporción de casos positivos a Leishmania en Machos 23,25% (169/727) a diferencia de las hembras 18,50 % (106/573), estos resultados se exponen en la tabla 4.

Tabla 5

Frecuencia de casos positivos a Leishmaniosis según el tamaño en la población estudiada de caninos durante el periodo 2015-2020.

TAMAÑO	POSITIVO	%	TOTAL, GENERAL
Pequeño	37	10,19	363
Mediano	108	24,32	444
Grande	130	26,37	493
TOTAL	275	21,15	1300

Fuente: Elaboración Propia – 2023

Prueba χ^2 . $\alpha=0,05$ $gl=2$ $p < 0,005$

Continuando con el análisis de los resultados, acerca del tamaño se observó que la mayor frecuencia de casos positivos a Leishmania se encontró en la población de caninos de tamaño grande 26,37% (130/493), seguido por el tamaño mediano 24,32% (108/444), siendo el tamaño pequeño 10,19% (37/363) la población con menor frecuencia de casos positivos la cual se detalla en la tabla 5.

Tabla 6

Frecuencia de casos positivos a Leishmaniosis según la estacionalidad en el municipio de Puzol, provincia de Valencia-España durante el periodo 2015-2020.

ESTACIONES	POSITIVO	%	TOTAL, GENERAL
INVIERNO (21 de diciembre al 20 de marzo)	37	14,68%	252
PRIMAVERA (20 de marzo al 21 de junio)	90	22,22%	405
VERANO (21 de junio al 23 de septiembre)	97	25,87%	375
OTOÑO (23 de septiembre al 21 de diciembre)	51	19,03%	268
TOTAL	275	21,15%	1300

Fuente: Elaboración Propia – 2023

Prueba χ^2 . $\alpha=0,05$ gl =3 $p <0,01$

Por último, en cuanto a las estaciones, se observó que hubo mayor frecuencia de casos positivos a Leishmania entre verano 25,87 % (97/375), primavera 22,22 % (90/405) y otoño 19,03% (51/268) respectivamente, siendo invierno la estación con menor frecuencia de casos positivos a Leishmania 14,68 % (37/252) como se demuestra en la tabla 6.

Tabla 7*Evaluación de los factores de riesgo asociados al diagnóstico de Leishmaniosis canina*

FACTOR	χ^2	<i>p</i>	OR	IC-OR al 95%
EDAD				
Adulto -(Geriatrico + Cachorro)	24,14	<0,005**	2,16	1,59 ; 2.94**
RAZA				
Indefinida - Definida	6,13	0,025>p>0,01*	1,42	1,08 ; 1,87 *
SEXO				
Macho - Hembra	4,33	0,05>p>0,025*	1,33	1,02 ; 1,74 *
TAMAÑO				
Pequeño – (Grande + Mediano)	36,28	<0,005**	3	2,09 ; 4,28 **
ESTACIONALIDAD				
(Primavera + verano) - (Otoño + Invierno)	9,3	< 0.005**	1,55	1,16 ; 2,05 *

Fuente: Elaboración Propia – 2023

En esta última tabla se muestra un resumen acerca de la evaluación de los factores de riesgo asociados al diagnóstico de *Leishmaniosis* canina, en el cual podemos observar los valores de chi cuadrado, probabilidad, Odds ratio y el intervalo de confianza al 95% para cada factor mencionado anteriormente.

X. DISCUSIÓN

El objetivo principal de esta investigación fue conocer la frecuencia de los casos positivos de Leishmaniosis Canina y determinar si existe asociación con la edad, raza, tamaño, estacionalidad y sexo respectivamente, en la Clínica Veterinaria Sant Antoni en el municipio de Puçol, provincia de Valencia-España en el periodo 2015-2020, y tomar en consideración que es una enfermedad de Salud Pública.

Partiendo de los 1300 caninos registrados, a los que se les encontró en su ficha que fueron diagnosticados con la prueba de Leishmaniosis Canina en el periodo 2015-2020, fueron negativos 1025 caninos registrados, mientras que 275 (21,15%) fueron los casos registrados como positivos en la población canina.

Los resultados obtenidos demostraron que Valencia siendo una ciudad portuaria, ubicada en la costa sureste de España (Mediterráneo), tiene un porcentaje de caninos positivos del 21, 15% (275/1300) analizada en una sola Clínica; estos datos guardan relación con lo sostenido por Gálvez y Montoya (2020) quienes evidencian, en el mapa de seroprevalencia que realizaron, un porcentaje de perros seropositivos por encima del 17%, siendo esta una región hiperendémica, por lo que podríamos relacionar el aumento del porcentaje debido a factores como el aumento de las cantidades del vector en la zona y el alargamiento de las estaciones con temperaturas cálidas para el vector. Por otra parte se conoce que es una zoonosis "descuidada" la cual sigue sin tener la visibilidad que necesita, también se podría atribuir al hecho de que el cambio climático aumenta la proliferación del flebótomo (Patz *et al.*, 2000; Sutherst, 2004; Jacob, 2008; Slenning,

2010), debido a esto los perros se encuentran en mayor riesgo permanente de contraer la infección, aumentando las probabilidades al estar en área rural e hiperendémica de Leishmaniosis. Por otro lado podría deberse al poco cuidado que reciben algunos caninos con respecto a la protección antiparasitaria y repelentes, asimismo fueron caninos a los que se les realizó el examen como rutinario, independientemente de si tenían signos clínicos o no.

En los resultados de Miro *et al.*, (2012) expuso que la edad parece ser un factor de riesgo importante en la prevalencia de la enfermedad siendo las edades tempranas hasta los 3-4 años y a partir de los 7-8 años. Sin embargo Cortés *et al.*, (2012) muestra una menor tasa de infección en perros menores de dos años, y mayor tasa de infección en perros con edades comprendidas entre 5-8 años, los cuales guardan completa relación con este estudio el cual tuvo como resultado que los animales adultos (2 -7 años) fueron los caninos con un mayor frecuencia de casos positivos 25,18% (215/854) a comparación con los otros grupos etarios en los cuales encontró que los cachorros (0 - 1 año) mostraban una menor proporción de casos, Miró *et al.*, (2007b) indica que los animales mayores de 7 años son los que se infectan con más frecuencia y de forma similar Cardoso *et al.*, (2004) que también observo que el riesgo en animales de 9-11 años era dos veces superior a los cachorros, lo cual difiere con los resultado de este estudio el cual indica que los animales geriátricos (8 años en adelante) fueron los caninos con menor riesgo de infección que los cachorros, esto podría deberse a que los caninos en la edad adulta son animales que suelen ser sacados a pasear con mayor frecuencia y suelen estar en los chalets o durmiendo en el exterior, a comparación de los caninos cachorros al estar en proceso de vacunación y ser pequeños se les protege un poco más y en caninos geriátricos tiene menor exposición a la calle y permanecen dentro de casa.

Por otro lado, con respecto a los casos positivos en relación a la raza, no es acorde con los resultados mencionados por Cortés *et al.*, (2012) en el que se expuso que los perros mestizos eran menos propensos a la infección, mientras que los perros de razas exóticas puras poseían mayor riesgo, debido a que en este estudio se observó que los de raza no definida fueron quienes obtuvieron la mayor proporción de casos positivos 25,31 % (103/407) en comparación con los de raza definida 19,26% (172/893), esto puede deberse a que fueron caninos de albergue, los cuales fueron recogidos de la calle y no tuvieron una correcta protección antiparasitaria y repelentes, también puede deberse a que algunos albergues no cuentan con las instalaciones correctas con mosquiteras para impedir el ingreso de los flebótomos, pudiendo contraer la infección cuando vivían en la calle o podría deberse al hecho de que los caninos de raza definida estuvo representado por el doble de la población en este estudio mientras que los de raza no definida tuvieron una población menor.

En los resultados de Solano-Gallego *et al.*, (2000) expone que aunque en teoría, todas las razas son susceptibles a la infección por *L.infantum*, el Podenco ibicenco y los mestizos de dicha raza se consideran más resistente, lo cual concuerda con el resultado en este estudio considerándose al Podenco ibicenco con 0 casos positivos, resistente a la infección, esto debido a que desarrollan una mayor respuesta de anticuerpos contra la saliva del flebótomo vector de *Leishmania* y presentan una respuesta inmune específica contra *Leishmania*.

En cuanto a los casos positivos respecto a la raza específica, en este estudio se encontró que las razas puras más susceptibles fueron el Pastor Alemán, Labrador Retriever, Bóxer,

Cocker Spaniel y Rottweiler, estos guardan relación con lo que sugiere Quilez *et al.*, (2012), de igual forma como fueron reportadas por Miranda *et al.*, (2008); Rondon *et al.*, (2008) y Perego *et al.*, (2014) de que estas razas son más susceptibles a la infección, con excepción del Doberman en el cual en este estudio solo se obtuvo 1 registro positivo, esto se podría explicar como una incapacidad de estas razas a no poder emplear una respuesta inmunitaria adecuada para eliminar los parásitos de *L.infantum* (Franca-Silva *et al.*, 2003; Miranda *et al.*, 2008).

Por el contrario, Miranda (2008) sugiere que el Caniche o el Yorkshire terrier parecen presentar porcentajes significativamente más bajos de infección (0,5 %), mostrando concordancia con el resultado encontrado en este estudio el cual el Caniche toy obtuvo un porcentaje del 0% de casos positivos y el Yorkshire terrier fue una de las razas con menos proporción de casos positivos 1,82 %, Esto debido a que algunos autores como Ciaramella *et al.*, (1997) y Miranda *et al.*, (2008) atribuyen esto al hecho de que estos animales viven mayoritariamente en interiores, lo que probablemente reduce sus posibilidades de contacto con el flebótomo.

Con respecto a la frecuencia de positivos respecto al sexo, Schalling *et al.*, (2013) en el resultado de sus estudios expuso que el sexo por lo general no se consideraba un factor determinante. Sin embargo Miranda *et al.*, (2008) señaló una mayor prevalencia en machos, en esto guarda relación con lo obtenido en este estudio siendo los machos el sexo con mayor proporción de casos positivos 23,25% (169/727) y la hembra con 18,50% (106/573) de casos positivos, el cual podría deberse al comportamiento itinerante del macho, hay que considerar que los caninos machos se utilizan más frecuentemente como guardianes en el exterior de los domicilios, quedando así más expuestos a la picadura del

flebótomo como lo sugiere Amusatogui *et al.*, (2003), también puede deberse a la preferencia de las personas por los caninos machos ya que hasta el momento no se indica una posible razón biológica que explique ese comportamiento.

En base a los resultados obtenidos en este estudio con respecto a los casos positivos y el tamaño, se extrajo que los caninos de tamaño grande obtuvieron una mayor frecuencia de casos positivos 26,37% (130/493), mientras que el tamaño mediano obtuvo 24,32% (108/444) de casos positivos y los de tamaño pequeño solo un 10,19% (37/363) de casos positivos, lo cual es congruente con lo mencionado por Martín-Sánchez *et al.*, (2009) quienes expresan que se han observado seroprevalencia más elevada en razas grandes que en pequeñas, esto se sustenta con lo dicho por Miró *et al.*, (2011b) quien explica que una posible explicación sería que una mayor masa corporal conlleva una mayor superficie expuesta a la picadura del vector.

Mientras que Miró (2013), señala en su estudio que este hecho podría estar relacionado a la aptitud del perro, ya que los perros de talla grande/media son los más frecuentemente utilizados en actividades de pastoreo o guarda, pasando tiempos más largos en el exterior y estando, por tanto, más tiempo expuestos a los flebótomos, tal como pasa en este estudio los cuales los perros pasan más tiempo en el exterior por el tipo de casa que tienen en estos pueblos ya que sus propietarios en la mayoría son personas mayores y aún piensan que el perro debe permanecer fuera.

Por último en cuanto a la estacionalidad con respecto a los casos positivos, no se encontró antecedente alguno sobre este, debido a que la mayoría de los estudios están relacionados a estacionalidad con el flebótomo causante de la enfermedad (Vector-Estacionalidad),

mientras que en este estudio se estudia los casos positivos con respecto a la estacionalidad (Reservorio-Estacionalidad), el cual se observó que verano es la estación donde se encontró una mayor proporción de casos positivos 25,87% (97/375), siendo septiembre el mes con mayor porcentaje de casos positivos a Leishmaniosis Canina, seguido por la primavera con 22,22% (90/405) de casos positivos. Esto puede deberse a que el periodo que transcurre desde que se produce el contagio hasta que se muestran los síntomas puede variar mucho o simplemente no presentar síntomas, debido a esto el periodo de incubación no depende en absoluto del momento del año en el que nos encontremos, ni del momento en el que se haya contagiado.

XI. CONCLUSIONES

- ◆ Se determinó que la frecuencia de casos positivos a Leishmaniosis Canina en el periodo 2015-2020 en la Clínica Veterinaria Sant Antoni en el municipio de Puçol, provincia de Valencia-España es de un 21,15 %.
- ◆ Los caninos positivos a Leishmaniosis Canina según el grupo etario más representado estuvo comprendido por los caninos adultos de entre los 2 y 7 años de edad.
- ◆ Los casos positivos a Leishmaniosis Canina fueron en mayor proporción machos siendo significativa en la positividad a la infección.
- ◆ En la totalidad de la población canina infectada, los de raza mestiza fueron los que presentaron un mayor porcentaje de casos positivos, encontrándose asociación significativa entre la raza y la infección.
- ◆ Las razas definidas como el Pastor Alemán, Labrador Retriever, Bóxer, Cocker Spaniel y Rottweiler se encontró una predisposición a la infección destacándose de todas las demás razas.
- ◆ Los caninos de tamaño grande tuvieron un porcentaje superior de casos positivos a Leishmaniosis.

- ◆ La estacionalidad muestra asociación con los casos clínicos positivos, siendo verano el mes con más frecuencia de casos positivos a Leishmaniosis.

- ◆ La edad, el tamaño y la estacionalidad fueron los factores de riesgo con mayor significancia en el estudio.

XII. RECOMENDACIONES

- ◆ Las medidas preventivas ante esta enfermedad son primordiales para el control y una posible erradicación de la Leishmaniosis por lo cual, para evitar la picadura del mosquito es fundamental el uso de productos antiparasitarios externos como repelentes en forma de pipetas, collares, aerosoles entre otros, en todo el año y en especial durante el periodo estacional del mosquito.
- ◆ Otra de las medidas a tomar es evitar que los caninos duerman en el exterior durante la noche, pues los mosquitos suelen tener preferencia por los hábitos nocturnos.
- ◆ En casa colocar mosquiteras y pantallas impregnadas de piretroides o repelentes.
- ◆ La Vacunación de los animales sigue siendo un punto importante como medida preventiva de la enfermedad, por lo cual vacunar contra la leishmaniosis canina para inmunización activa de perros a partir de los 6 meses de edad y que sean negativos a las pruebas diagnósticas frente a *Leishmania* reducen el riesgo de infección en el perro y la sintomatología caso de producirse un contacto posterior con el parásito.
- ◆ Los chequeos preventivos forman parte de las medidas que deben tomarse ante esta enfermedad, recordando que no todos los caninos presentaran sintomatología,

con lo cual los chequeos anuales nos ayudaran a poder diagnosticar la enfermedad a tiempo y ser tratada en el momento correcto.

- ◆ En cuanto a las colectividades que albergan perros abandonados, perros de caza o criaderos deberían establecer programas estrictos de control de enfermedades transmitidas por artrópodos, y, éstos deberían combinarse con medidas de prevención de enfermedades transmitidas por flebótomos o garrapatas y así evitar el riesgo de focos de transmisión endémica.
- ◆ En cuanto a la extensión de la enfermedad de áreas endémicas a las áreas no endémicas, debería evitarse el viaje de los caninos infectados por *Leishmania* a las zonas no endémicas en las que los flebótomos estén presentes.
- ◆ Dada la posibilidad de transmisión vertical de la enfermedad, la esterilización se contempla como una medida profiláctica.
- ◆ Se recomienda no cortar el pelaje a los perros en época de verano ya que se ha observado que los caninos de pelo corto suelen ser los más atacados por los flebótomos.
- ◆ Se recomienda realizar más estudios a profundidad con respecto a factores que indiquen una predisposición a desarrollar leishmaniosis, tal como la estacionalidad frente a los caninos infectados con la enfermedad.

XIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alexander, B., de Carvalho, R.L., McCallum, H., & Pereira, M.H. (2002). *Role of the domestic chicken (Gallus gallus) in the epidemiology of urban visceral leishmaniasis in Brazil. Emerg Infect Dis*, 8, 1480-1485.
<https://doi.org/10.3201/eid0812.010485>
- Alimohammadian, M.H., Jones, S.L., Darabi, H., Riazirad, F., Ajdary, S., Shabani, A., Rezaee, M.A., Mohebbali, M., Hosseini, Z. & Modabber, F. (2012). *Assessment of interferon- γ levels and leishmania skin test results in persons recovered for leishmaniasis. Am.J.Trop.Med.Hyg.*87,70–75.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3391060/>
- Alvar, J., Cañavate, C., Molina, R., Moreno, J. and Nieto, J. (2004). *Canine leishmaniasis. Adv Parasitol*, 57, 1-88. [https://doi.org/10.1016/S0065-308X\(04\)57001-X](https://doi.org/10.1016/S0065-308X(04)57001-X)
- Alvar, J., Yactayo, S., & Bern, c. (2006). *Leishmaniasis and poverty. Trends Parasitol*, 22, 552-557. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2006.09.004>
- Antoniou, M., Gramiccia, M., Molina, R., Dvorak, V. and Volf, P. (2013). *The role of indigenous phlebotomine sandflies and mammals in the spreading of leishmaniasis agents in the Mediterranean region. Euro Surveillance*, 18, 20540.
<https://doi.org/10.2807/1560-7917.es2013.18.30.20540>
- Arce, A., Estirado, A., Ordoñas, M., Sevilla, S., García, N., Moratilla, L., de la Fuente, S., Martínez, A.M., Pérez, A.M., Aránguez, E., Iriso, A., Sevillano, O., Bernal, J., & Vilas, F. (2013). *Re-emergence of leishmaniasis in Spain: community outbreak*

in Madrid, Spain, 2009 to 2012. Euro Surveill, 18, 20546.
<https://doi.org/10.2807/1560-7917.es2013.18.30.20546>

Aránguez, E., Arce, A., Moratilla, L., Estirado, A., Iriso, A., de la Fuente, S., Soto, M., Fuster, F., Ordobás, M., María, A. and Vilas, F. (2014). Análisis espacial de un brote de leishmaniasis en el sur del Área metropolitana de la Comunidad de Madrid. 2009- 2013. *Revista de Salud Ambiental, 14, 39-53.*
https://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1695-61412016000100016

Aransay, A.M., Testa, J.M., Morillas-Marquez, F., Lucientes, J. and Ready, P.D. (2004). *Distribution of sandfly species in relation to canine leishmaniasis from the Ebro Valley to Valencia, northeastern Spain. Parasitol Res, 94, 416-420.*
<https://doi.org/10.1007/s00436-004-1231-4>

Ashford, R.W. (2000). *The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. Int J Parasitol, 30, 1269-1281.* [https://doi.org/10.1016/s0020-7519\(00\)00136-3](https://doi.org/10.1016/s0020-7519(00)00136-3)

Baneth, G., & Shaw, S.E. (2002). *Chemotherapy of canine leishmaniosis. Vet Parasitol, 106, 315-324.* [https://doi.org/10.1016/s0304-4017\(02\)00115-2](https://doi.org/10.1016/s0304-4017(02)00115-2)

Baneth, G., Koutinas, AF., Solano-Gallego, L., Bourdeau, P., Ferrer, L. (2008). *Canine Leishmaniosis- new concept and insights on an expanding zoonosis: part one. Trends in Parasitology 24 pp324 – 30.* <https://doi.org/10.1016/j.pt.2008.04.001>

Bañuls, A.L., Hide, M. and Prugnolle, F. (2007). *Leishmania and the leishmaniasis: a parasite genetic update and advances in taxonomy, epidemiology and*

pathogenicity in humans. Parasitol, 64, 1-109. [https://doi.org/10.1016/S0065-308X\(06\)64001-3](https://doi.org/10.1016/S0065-308X(06)64001-3)

Berczi, I., Bertók, L., & Chow, D.A. (2000). *Natural immunity and neuroimmune host defense. Ann N Y Acad Sci*, 917, 248-257. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2000.tb05390.x>

Bianciardi, P., Brovida, C., Valente, M., Aresu, L., Cavicchioli, L., Vischer, C., Giroud, L., & Castagnaro, M. (2009). *Administration of miltefosine and meglumine antimoniate in healthy dogs: clinicopathological evaluation of the impact on the kidneys. Toxicol Pathol*, 37, 770-775. <https://doi.org/10.1177/0192623309344088>

Bongiorno, G., Paparcone, R., Foglia Manzillo, V., Oliva, G., Cuisinier, A. M., & Gradoni, L. (2013). *Vaccination with LiESP/QA-21 (CaniLeish) reduces the intensity of infection in Phlebotomus perniciosus fed on Leishmania infantum infected dogs—a preliminary xenodiagnoses study. Vet Parasitol*, 197, 691-695. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2013.05.008>

Bossolasco S., Gaiera G., Olchini D., Gulletta m., Martello L., Bestetti A., Bossi L., Germagnoli L., Lazzarin A., Uberti-Foppa C. & Cinque p. (2003). *Real-time PCR assay for clinical management of human immunodeficiency virus-infected patients with visceral leishmaniasis. J. Clin. Microbiol.*, 41, 5080–5084. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC262523/>

Bourdeau, P., Saridomichelakis, M.N., Oliveira, A., Oliva, G., Kotnik, T., Gálvez, R., Foglia Manzillo, V., Koutinas, A.F., Pereira da Fonseca, I., & Miró, G. (2014). *Management of canine leishmaniosis in endemic SW European regions: a*

questionnaire-based multinational survey. Parasit Vectors, 7, 110.
<https://doi.org/10.1186/1756-3305-7-110>

Brandonisio O., Fumarola L., Maggi P., Cavaliere R., Spinelli R. & Pastore G. (2002).
Evaluation of a rapid immunochromatographic test for serodiagnosis of visceral leishmaniasis. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis., 21, 461–464.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC427813/>

Calle, A.I., Marí, R.B., Heras, E.D., Lucientes, J., & Molina, R. (2017). *Cambio climático en España y su influencia en las enfermedades de transmisión vectorial. Revista de Salud Ambiental*, 17, 70-86. <https://www.semanticscholar.org/paper/Cambio-climático-en-España-y-su-influencia-en-las-Calle-Mar%C3%AD/becabf8548864b2d308010f0c736b05cd0162863#references>

Cardoso, L., Rodrigues, M., Santos, H., Schoone, G.J., Carreta, P., Varejão, E., van Benthem, B., Alfonso, MO., Alves-Pires, C., Semião-Santos, S.J., Rodrigues, J., & Schallig, H.D. (2004). *Sero-epidemiological study of canine Leishmania spp. Infection in the municipality of Alijó (Alto Douro, Portugal). Vet Parasitol*, 121,21-32.
<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2004.02.008>

Cenderello, G., Pasa, A., Dusi, A., Dentone, C., Toscanini, F., Bobbio, N., & De Maria, A. (2013). *Varied spectrum of clinical presentation and mortality in a prospective registry of visceral leishmaniasis in a low endemicity area of Northern Italy. BMC Infectious Diseases*, 13 (1), 1-10.

- Chicharro, C., Nieto, J., Moreno, J., Carrillo, E., Cruz, I., Flores, M., Aransay, A., Molina, R., García, E., Bailo, B., Cuadrado, J., Cañavate, C., & Alvar, J. (2005). *Canine leishmaniasis in Ibizaian Hound. A resistant dog breed?* En: *Worldleish 3*, Palermo-Terrasini, Sicily, Italy, p. 129.
- Corrales, G. M. (2007). *Leishmaniosis canina: situación actual en Europa, diagnóstico y control. Acta scientiae veterinariae*, 35(Supl 2), s227-s229. <http://www.ufrgs.br/actavet/35-suple-2/03-ANCLIVEPA.pdf>
- Cortes, S., Vaz, Y., Neves, R., Maia, C., Cardoso, L., & Campino, L. (2012). *Risk factors for canine leishmaniasis in an endemic Mediterranean region. Vet Parasitol*, 189, 189-196. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.04.028>
- Da Silva, S.M., Amorim, I.F., Ribeiro, R.R., Azevedo, E.G., Demicheli, C., Melo, M.N., Tafuri, W.L., Gontijo, N.F., Michalick, M.S., & Frézard, F. (2012). *Efficacy of combined therapy with liposome-encapsulated meglumine antimoniate and allopurinol in treatment of canine visceral leishmaniasis. Antimicrob Agents Chemother*, 56, 2858-2867. <https://doi.org/10.1128/AAC.00208-12>
- Dantas-Torres, F., Solano-Gallego, L., Baneth, G., Ribeiro, V.M., de Paiva-Cavalcanti, M., & Otranto, D. (2012). *Canine leishmaniosis in the Old and New Worlds: unveiled similarities and differences. Trends Parasitol*, 28, 531-538. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2012.08.007>

Dantas-Torres, F., Tarallo, V., Latrofa, M., Falchi, A., Lia, R. and Otranto, D. (2014).

Ecology of phlebotomine sand flies and Leishmania infantum infection in a rural area of southern Italy. Acta Trop, 137, 67-73.

<https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2014.04.034>

De Almeida, M. C., Vilhena, V., Barral, A., & Barral-Netto, M. (2003). *Leishmanial*

infection: analysis of its first steps. A review. Memorias do Instituto Oswaldo Cruz, 98(7), 861-870.

<https://www.scielo.br/j/mioc/a/sKwvkVc8xKvfJhnFs3HjDwR/?format=pdf&lang=en>

De Araújo, V.A., Boité, M.C., Cupolillo, E., Jansen, A.M., & Roque, A.L. (2013). *Mixed*

infection in the anteater Tamandua tetradactyla (Mammalia : Pilosa) from Pará State, Brazil: Trypanosoma cruzi, T. rangeli and Leishmania infantum.

Parasitology, 140, 455-460. <https://doi.org/10.1017/S0031182012001886>

De Freitas, E., Melo, MN., da Costa-Val, AP., y Michalick, MS., (2006). *Transmission*

of Leishmania infantum via blood transfusion in dogs: potential for infection and importance of clinical factors. Vet Parasitol, 137, 159-167.

<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2005.12.011>

De Lima, H., Rodríguez, N., Barrios, M.A., Avila, A., Cañizales, I., & Gutiérrez, S.

(2008). *Isolation and molecular identification of Leishmania chagasi from a bat (Carollia perspicillata) in northeastern Venezuela. Mem Inst Oswaldo Cruz*, 103,

412-414. <https://doi.org/10.1590/s0074-02762008000400018>

- Dougall, A., Shilton, C., Low Choy, J., Alexander, B., & Walton, S. (2009). *New reports of Australian cutaneous leishmaniasis in Northern Australian macropods. Epidemiol Infect*, 137, 1516-1520. <https://doi.org/10.1017/S0950268809002313>
- Farca, A.M., Miniscalco, B., Badino, P., Odore, R., Monticelli, P., Trisciuglio, A., & Ferroglio, E. (2012). *Canine leishmaniosis: in vitro efficacy of miltefosine and marbofloxacin alone or in combination with allopurinol against clinical strains of Leishmania infantum. Parasitol Res*, 110, 2509-2513. <https://doi.org/10.1007/s00436-011-2792-7>
- Fernández-Bellon, H., Solano-Gallego, L., Bardagí, M., Alberola, J., Ramis, A., & Ferrer, L. (2006). *Immune response to Leishmania infantum in healthy horses in Spain. Vet Parasitol*, 135, 181-185. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2005.09.007>
- Fernández-Cotrina, J., Iniesta, V., Belinchón-Lorenzo, S., Muñoz-Madrid, R., Serrano, F., Parejo, J.C., Gómez-Gordo, L., Soto, M., Alonso, C., & Gómez-Nieto, L.C. (2013). *Experimental model for reproduction of canine visceral leishmaniosis by Leishmania infantum. Vet Parasitol*, 192, 118-128. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.10.002>
- Ferrer, L. (2002). *The pathology of canine leishmaniasis. En: Killick-Kendrick R ed. Canine Leishmaniasis: Moving towards a solution. Proceedings of the 2nd International Canine Leishmaniasis Forum, 21-24. Sevilla, Spain, Invervet International BV.*

França-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., & Nascimento, E. (2003). *Epidemiology of canine visceral leishmaniosis in the endemic área of Montes Claros Municipality, Minas Gerais State, Brazil. Vet Parasitol*, 111, 161-173.
[https://doi.org/10.1016/s0304-4017\(02\)00351-5](https://doi.org/10.1016/s0304-4017(02)00351-5)

Gaglio, G., Brianti, E., Napoli, E., Falsone, L., Dantas-Torres, F., Tarallo, V.D., Otranto, D. and Giannetto, S. (2014). *Effect of nighttime-intervals, height of traps and lunar phases on sand fly collection in a highly endemic area for canine leishmaniasis. Acta Trop*, 133C, 73-77.
<https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2014.02.008>

Gálvez, Esteban, R. (2010). *Factores que influyen sobre la epidemiología de la leishmaniosis canina y sus vectores en la Comunidad de Madrid: obtención de modelos predictivos de riesgo mediante sistemas de información geográfica.*

Gálvez, R., Descalzo, M.A., Miró, G., Jiménez, M.I., Martín, O., Dos Santos-Brandao, F., Guerrero, I., Cubero, E. and Molina, R. (2010a). *Seasonal trends and spatial relations between environmental/meteorological factors and leishmaniosis sand fly vector abundances in Central Spain. Acta Trop*, 115, 95-102.

Gálvez, R., Miró, G., Descalzo, M.A., Nieto, J., Dado, DE., Martín, O., Cubero, E., & Molina, R. (2010b). *Emerging trends in the seroprevalence of canine*

leishmaniasis in the Madrid region (central Spain). *Vet Parasitol*, 169, 327-334.

<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.11.025>

Gálvez, R., Montoya, A., Cruz, I., Fernández, C., Martín, O., Checa, R., Chicharro, C., Migueláñez, S., Marino, V., Miró, G. (2020). *Latest trends in Leishmania infantum infection in dogs in Spain, Part I: mapped seroprevalence and sand fly distributions*.

<https://parasitesandvectors.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13071-020-04081-7>

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

<https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2005.07.001>

Guarga, J.L., Moreno, J., Lucientes, J., Gracia, M.J., Peribáñez, M.A., & Castillo, J.A. (2002). *Evaluation of a specific immunochemotherapy for the treatment of canine visceral leishmaniasis*. *Vet Immunol Immunopathol*, 88, 13-20.

[https://doi.org/10.1016/s0165-2427\(02\)00128-9](https://doi.org/10.1016/s0165-2427(02)00128-9)

Gueguen S., Cañavate C. & Gradoni L. (2012). *Evidence for protection against active infection and disease progression in naïve dogs vaccinated with LiESP/QA-21 (CaniLeish®) exposed to two consecutive Leishmania infantum transmission seasons*.

<https://www.vin.com/apputil/content/defaultadv1.aspx?pId=11349&catId=34725&id=5328476>

Gutiérrez Blanco, M., Gómez Doménech, A., Esperanza-Gómez, L., Gutiérrez Orden, J., Bernal Domínguez, G., Miró Corrales, G., Cutuli de Simón, M., Gilbello Prieto, A., Simarro Fernández, I. (2013). Manual gráfico de inmunología y enfermedades infecciosas del perro y gato.

<https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2010.02.009>

Helhazar, M., Leitao, J., Duarte, A., Travares, L., & da Fonseca, I.P. (2013). *Natural infection of synanthropic rodent species Mus musculus and Rattus norvegicus by Leishmania infantum in Sesimbra and Sintra—Portugal. Parasit Vectors*, 6, 88.

<https://doi.org/10.1186/1756-3305-6-88>

Hinterberger-Fischer, M. (2000). *Prolactin as pro-inflammatory cytokine—considerations on consolidated immunotherapy after high dosage therapy. Acta Med Austriaca Suppl*, 52, 16-20.

Holzmuller, P., Hide, M., Sereno, D. and Lemesre, J.L. (2006). *Leishmania infantum amastigotes resistant to nitric oxide cytotoxicity: Impact on in vitro parasite developmental cycle and metabolic enzyme activities. Infect Genet Evol*, 6, 187-197. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2005.03.003>

Hotez, P.J. and Gurwith, M. (2011). *Europe's neglected infections of poverty. Int J Infect Dis*, 15, e611-619. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2011.05.006>

- Janeway, C.A and Medzhitov, R. (2002). *Innate immune recognition*. *Annu Rev Immunol*, 20, 197-216. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.20.083001.084359>
- João, A., Pereira, M.A., Cortes, S., & 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, 540-545. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0442.2006.00869.x>
- Jusi, M.M., Starke-Buzetti, W.A., Oliveira, T.M., Tenório, M.S., Sousa, L. e. O., & Machado, R.Z. (2011). *Molecular and serological detection of Leishmania spp. in captive wild animals from Ilha Solteira, SP, Brazil*. *Rev Bras Parasitol Vet*, 20, 219-222. <https://doi.org/10.15990/s1984-29612011000300008>
- Kassahun, A., Sadlova, J., Benda, P., Kostalova, T., Warburg, A., Hailu, A., & Votypka, J. (2015). *Natural infection of bats with Leishmania in Ethiopia*. *Acta Tropica*, 150, 166-170. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2015.07.024>
- Killick-Kendrick, R. (1999). *The biology and control of phlebotomine sand flies*. *Clin Dermatol*, 17, 279-289. [https://doi.org/10.1016/S0738-081X\(99\)00046-2](https://doi.org/10.1016/S0738-081X(99)00046-2)
- Koch LK et al (2017). *Modeling the climatic suitability of leishmaniasis vector species in Europe*. *Scientific Reports* 7p 13325. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-13822-1>

- Koutinas, A.F. and Koutinas, C.K. (2014). *Pathologic mechanisms underlying the clinical findings in canine leishmaniasis due to Leishmania infantum/chagasi*. *Vet Pathol*, 51, 527-538. <https://doi.org/10.1177/0300985814521248>
- Laskay, T., Van Zandbergen, G & Solbach, W. (2003). *Neutrophil granulocytes- Trojan horses for Leishmania major and other intracellular microbes? . Trends in microbiology*, 11(5), 210-214.
- Lobsiger, L., Müller, N., Schweizer, T., Frey, C.F., Wiederkehr, D., Zumkehr, B., & Gottstein, B. (2010). *An autochthonous case of cutaneous bovine leishmaniasis in Switzerland*. *Vet Parasitol*, 169, 408-414. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.01.022>
- Lucientes, J., Palmero, J., Guarga, J.L., Gracia, M.J., Peribáñez, M.A., Zárata, J., & Castillo, J.A. (2005). *Risk of transmission of canine leishmaniosis in eastern Spain*. *Vet Rec*, 156, 743-744.
- Lux, H., Heise, N., Klenner, T., Hart, D., & Opperdoes, F.R. (2000). *Ether-lipid (alkyl-phospholipid) metabolism and the mechanism of action of ether—lipid analogues in Leishmania*. *Mol Biochem Parasitol*, 111, 1-14. [https://doi.org/10.1016/s0166-6851\(00\)00278-4](https://doi.org/10.1016/s0166-6851(00)00278-4)
- Maia, C., Nunes, M., Cristóvão, J., & Campino, L. (2010). *Experimental canine leishmaniasis: clinical, parasitological and serological follow-up*. *Acta Trop*, 116, 193-199. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2010.08.001>

- Maia, C., Cardoso, L (2015). *Spread of Leishmania infantum in Europe with dog traveling. Veterinary Parasitology* 213 pp2 – 11.
<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2015.05.003>
- Malta, M.C., Tinoco, H.P., Xavier, M.N., Vieira, A.L., Costa, E.A., & Santos, R.L. (2010). *Naturally acquired visceral leishmaniasis in non-human primates in Brazil. Vet Parasitol*, 169, 193-197. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.12.016>
- Manna, L., Corso, R., Galiero, G., Cerrone, A., Muzj, P., & Gravino, A.E. (2015). *Long-term follow-up of dogs with leishmaniosis treated with meglumine antimoniate plus allopurinol versus miltefosine plus allopurinol. Parasit Vectors*, 8, 289.
<https://doi.org/10.1186/s13071-015-0896-0>
- Marcondes, M., Biondo, A.W., Gomes, A.A., Silva, A.R., Vieira, R.F., Camacho, A.A., Quinn, J., & Chandrashekar, R. (2011a). *Validation of a Leishmania infantum ELISA rapid test for serological diagnosis of Leishmania chagasi in dogs. Vet Parasitol*, 175, 15-19. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.09.036>
- Maroli, M., Rossi, L., Baldelli, R., Capelli, G., Ferroglia, E., Genchi, C., Gramiccia, M., Mortarino, M., Pietrobelli, M., & 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, 256-264.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-3156.2007.01998.x>
- Maroli, M., Feliciangeli, M.D., Bichaud, L., Charrel, R.N. and Gradoni, L. (2013). *Phlebotomine sandflies and the spreading of leishmaniases and other diseases of public health concern. Med Vet Entomol*, 27, 123-147.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2915.2012.01034.x>

- Martínez-Subiela, S., Strauss-Ayali, D., Cerón, J.J., & Baneth, G. (2011). *Acute phase protein response in experimental canine leishmaniasis*. *Vet Parasitol*, 180, 197-202. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.03.032>
- Martín-Sánchez, J., Acedo, C., Muñoz-Pérez, M., Pesson, B., Marchal, O. and Morillas-Márquez, F. (2007). *Infection by Leishmania infantum in cats: epidemiological study in Spain*. *Vet Parasitol*, 145, 267-273. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.11.005>
- Martín-Sánchez, J., Morales-Yuste, M., Acedo-Sánchez, C., Barón, S., Díaz, V., & Morillas-Márquez, F. (2009). *Canine leishmaniasis in southeastern Spain*. *Emerg Infect Dis*, 15, 795-798. <https://doi.org/10.3201/eid1505.080969>
- Matera, L., & Mori, M. (2000). *Cooperation of pituitary hormone prolactin with interleukin-2 and interleukin-12 on production of interferon-gamma by natural killer and T cells*. *Ann N Y Acad Sci*, 917, 505-513. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2000.tb05415.x>
- Millán, J., Zanet, S., Gomis, M., Trisciuglio, A., Negre, N. and Ferroglio, E. (2011). *An investigation into alternative reservoirs of canine leishmaniasis on the endemic island of Mallorca (Spain)*. *Transbound Emerg Dis*, 58, 352-357. <https://doi.org/10.1111/j.1865-1682.2011.01212.x>
- Millán, J., Ferroglio, E., & Solano-Gallego, L. (2014). *Role of wildlife in the epidemiology of Leishmania infantum infection in Europe*. *Parasitology Research* 113(6), 2005 – 2014. <https://doi.org/10.1007/s00436-014-3929-2>

- Miranda, S., Roura, X., Picado, A., Ferrer, L., & Ramis, A. (2008). *Characterization of sex, age, and breed for a population of canine leishmaniosis diseased dogs. Res Vet Sci*, 85, 35-38. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2007.09.003>
- Miró Corrales, G., & Molina Moreno, R. (2006). Leishmaniosis canina: Manejo clínico y situación actual en España. Química Farmacéutica Bayer, 2006. <http://www.ufrgs.br/actavet/35-suple-2/03-ANCLIVEPA.pdf>
- Miró, G., Gálvez, R., Mateo, M., Montoya, A., Descalzo, M.A. and Molina, R. (2007a). *Evaluation of the efficacy of a topically administered combination of imidacloprid and permethrin against Phlebotomus perniciosus in dogs. Vet Parasitol*, 143, 375-379. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.09.014>
- Miró, G., Montoya, A., Mateo, M., Alonso, A., García, S., García, A., Caballero, M.J. and Molina, R. (2007b). *A leishmaniosis surveillance system among stray dogs in the region of Madrid: ten years of serodiagnosis (1996-2006). Parasitol Res*, 101, 253-257. <https://link.springer.com/article/10.1007/s00436-007-0497-8>
- Miró, G., et al (2008). *Canine leishmaniosis, new concepts and insights on an expanding zoonosis: part two. Trends in Parasitology* 24 pp 371 – 377. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2008.05.003>
- Miró, G., Oliva, G., Cruz, I., Cañavate, C., Mortarino, M., Vischer, C., & Bianciardi, P. (2009). *Multicentric, controlled clinical study to evaluate effectiveness and safety of miltefosine and allopurinol for canine leishmaniosis. Vet Dermatol*, 20, 397-404. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3164.2009.00824.x>

- Miró, G., Gálvez, R., Fraile, C., Descalzo, M.A. and Molina, R. (2011a). *Infectivity to Phlebotomus perniciosus of dogs naturally parasitized with Leishmania infantum after different treatments. Parasit Vectors*, 4, 52. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-4-52>
- Miró, G., Montoya, A., Hernández, L., Dado, D., Vázquez, M.V., Benito, M., Villagrasa, M., Brianti, E., & Otranto, D. (2011b). *Thelazia callipaeda: infection in dogs: a new parasite for Spain. Parasit Vectors*, 4, 148. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-4-148>
- Miró, G., Checa, R., Montoya, A., Hernández, L., Dado, D., & Gálvez, R. (2012). *Current situation of Leishmania infantum infection in shelter dogs in northern Spain. Parasit Vectors*, 5, 60. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-5-60>
- Miró, G. (2013). Tratamiento y pronóstico. En: Leishmaniosis. Una revisión actualizada (ed. Servet), 8,151-164. <https://parasitesandvectors.biomedcentral.com/articles/10.1186/1756-3305-4-52>
- Miró, G., Montoya, A., Roura, X., Gálvez, R., & Sainz, A. (2013). *Seropositivity rates for agents of canine vector-borne diseases in Spain: a multicentre study. Parasit Vectors*, 6, 117. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-6-117>
- Miró, G., Rupérez, C., Checa, R., Gálvez, R., Hernández, L., García, M., Canorea, I., Marino, V., & Montoya, A. (2014). *Current status of L. infantum infection in stray*

cats in the Madrid region (Spain): implications for the recent outbreak of human leishmaniosis? Parasit Vectors, 7, 112. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-7-112>

Molina, R., Jiménez, M.I., Cruz, Y., Iriso, A., Martín-Martín, I., Sevillano, O., Melero, S., & Bernal, J. (2012). *The hare (Lepus granatensis) as potential sylvatic reservoir of Leishmania infantum in Spain. Vet Parasitol*, 190, 268-271. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.05.006>

Moll, H. (2000). *The role of dendritic cells at the early stages of Leishmania infection. Adv Exp Med Biol*, 479, 163-173. https://doi.org/10.1007/0-306-46831-X_14

Morales-Silva, E., Antunes, F.R., Rodríguez, M.S., da Silva julião, F., días-Lima, A.G., Lemos-de-Sousa, V., de Alcantara, A.C., Reis, E.A., Nakatani, M., Badaró, R., Reis, M.G., Pontes-de-Carvalho, L., & Franke, C.R. (2006). *Domestic swine in a visceral leishmaniasis endemic área produce antibodies against multiple Leishmania infantum antigens but apparently resist to L. infantum infection. Acta Trop*, 98, 176-182.

Moreno, J., & Alvar, J. (2002). *Canine leishmaniasis: epidemiological risk and the experimental model. Trends Parasitol*, 18, 399-405. [https://doi.org/10.1016/s1471-4922\(02\)02347-4](https://doi.org/10.1016/s1471-4922(02)02347-4)

Moreno, I., Alvarez, J., García, N., de la Fuente, S., Martínez, I., Marino, E., Toraño, A., Gouache, J., Vilas, F., Domínguez, L., & Domínguez, M. (2014a). *Detection of anti-Leishmania infantum antibodies in sylvatic llogomorphs from an epidemic*

area of Madrid using the indirect immunofluorescence antibody test. Vet Parasitol, 199, 264-267. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2013.10.010>

Müller, 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, 73-76. <https://doi.org/10.1007/s004300100084>

Munstermann, L. (2005). *Phlebotomine Sand Flies, the Psychodidae. In: Marquardt, W.C. (Ed.) Biology of disease vectors. Dana Dreibelbis, San Diego, California, USA, 141-151. San Diego, California, USA.*

Navarro, J., Sánchez, J., Peñafiel-Verdú, C., Buendía, A.J., Altimira, J. and Vilafranca, M. (2010). *Histopathological lesions in 15 cats with leishmaniosis. J Comp Pathol*, 143, 297-302. <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2010.03.003>

Noli, C., & Auxilia, S.T. (2005). *Treatment of canine Old World visceral leishmaniasis: a systematic review. Vet Dermatol*, 16, 213-232. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3164.2005.00460.x>

Noli, C., and Saridomichelakis, M.N. (2014). *An update on the diagnosis and treatment of canine leishmaniosis caused by Leishmania infantum (syn. L. chagasi). Vet J*, 202, 425-435. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2014.09.002>

Oliva, G., Roura, X., Crotti, A., Maroli, M., Castagnaro, M., Gradoni, L., Lubas, G., Paltrinieri, S., Zatelli, A., & Zini, E. (2010). *Guidelines for treatment of*

leishmaniasis in dogs. J Am Vet Med Assoc, 236, 1192-1198.
<https://doi.org/10.2460/javma.236.11.1192>

Otranto, D., Testini, G., Buonavoglia, C., Parisi, A., Brandonisio, O., Circella, E., Dantas-Torres, F., & Camarda, A. (2010b). *Experimental and field investigations on the role of birds as hosts of Leishmania infantum, with emphasis on the domestic chicken. Acta Trop*, 113, 80-83. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2009.09.014>

Otranto, D., & Dantas-Torres, F. (2013). *The prevention of canine leishmaniasis and its impact on public health. Trends Parasitol*, 29, 339-345.
<https://doi.org/10.1016/j.pt.2013.05.003>

Owens, SD., Oakley, DA., Marryott, K., Hatchett, W., Walton, R., Nolan, TJ., Newton, A., Steurer, F., Schantz, P., y Giger U. (2001), *Transmission of visceral leishmaniasis through blood transfusions from infected English foxhounds to anemic dogs. J Am Vet Med Assoc*, 219, 1076-1083.
<https://doi.org/10.2460/javma.2001.219.1076>

Papadogiannakis, E., Spanakos, G., Kontos, V., Menounos, P.G., Tegos, N., & Vakalis, N. (2010b). *Molecular detection of Leishmania infantum in wild rodents (Rattus norvegicus) in Greece. Zoonoses Public Health*, 57, e23-25.
<https://doi.org/10.1111/j.1864-2378.2009.01264.x>

Paradies, P., Capelli, G., Cafarchia, C., de Caprariis, D., Sasanelli, M., & Otranto, D. (2006). *Incidences of canine leishmaniasis in an endemic area of southern Italy.*

J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health, 53, 295-298.
<https://doi.org/10.1111/j.1439-0450.2006.00964.x>

Paris, C., Loiseau, P.M., Bories, C., & Bréard, J. (2004). *Miltefosine induces apoptosis-like death in Leishmania donovani promastigotes. Antimicrob Agents Chemother*, 48, 852-859. <https://doi.org/10.1128/AAC.48.3.852-859.2004>

Poepl, W., Obwaller, A.G., Weiler, M., Burgmann, H., Mooseder, G., Lorentz, S., Rauchenwald, F., Aspöck, H., Walochnik, J., & Naucke, T.J. (2013). *Emergence of sandflies (Phlebotominae) in Austria, a Central European country. Parasitol Res*, 112, 4231-4237. <https://doi.org/10.1007/s00436-013-3615-9>

Pradella, G.D., Escobar, T.A., Duarte, C.A., Lübeck, I., Góss, G.C., Lagreca, L.F.J., & Romero, B.G. (2020). *Identification of Leishmania spp. in horses and dog from rural areas of Uruguaiana, Rio Grande do Sul, Brazil. Semina: Ciências Agrárias*, 41(6), 2687-2694. <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2020v41n6p2687>

Proceedings of the WSAVA / FECAVA / BSAVA (World Small Animal Veterinary Association / Federation of European Companion Animal Veterinary Associations / British Small Animal Veterinary Association) World Congress, Birmingham, UK, 11–15 April 2012, p. 529–530. <https://wsava.org>

Quilez, J., Martínez, V., Woolliams, J.A., Sanchez, A., Pong-Wong, R., Kennedy, L.J., Quinnell, R.J., Ollier, W.E., Roura, X., Ferrer, L., Altet, L., & Francino, O.

(2012). *Genetic control of canine leishmaniasis: genome-wide association study and genomic selection analysis*. PLoS One, 7, e35349. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035349>

Quinnell, R.J., Kennedy, L.J., Barnes, A., Courtenay, O., Dye, C., Garcez, L.M., Shaw, M.A., Carter, S.D., Thomson, W., & Ollier, W.E. (2003b). *Susceptibility to visceral leishmaniasis in the domestic dog is associated with MHC class II polymorphism*. *Immunogenetics*, 55, 23-28. <https://doi.org/10.1007/s00251-003-0545-1>

Rallis, T., Day, M.J., Saridomichelakis, M.N., Adamama-Moraitou, K.K., Papazoglou, L., Fytianou, A. and Koutinas, A.F. (2005). *Chronic hepatitis associated with canine leishmaniosis (Leishmania infantum): a clinicopathological study of 26 cases*. *J Comp Pathol*, 132, 145-152. <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2004.09.004>

Ramírez, J.A., Peñafiel-Verdú, C., Altimira, J., García-González, B., & Vilafranca, M. (2013). *Naturally acquired visceral leishmaniosis in a captive Bennett's wallaby (Macropus rufogriseus rufogriseus)*. *Vet Pathol*, 50, 188-190. <https://doi.org/10.1177/0300985812446155>

Ready, PD (2008). *Leishmaniasis emergence and climate change*. *Rev Sci Tech* 27 pp 399 – 412. [https://scholar.google.es/scholar?q=Ready,+PD+\(2008\).+Leishmaniasis+emergence+and+climate+change.+Rev+Sci+Tech+27+pp+399+-+412.&hl=es&as_sdt=0&as_vis=1&oi=scholar](https://scholar.google.es/scholar?q=Ready,+PD+(2008).+Leishmaniasis+emergence+and+climate+change.+Rev+Sci+Tech+27+pp+399+-+412.&hl=es&as_sdt=0&as_vis=1&oi=scholar)

- Reis, A.B., Teixeira-Carvalho, A., Giunchetti, R.C., Guerra, L.L., Carvalho, M.G., Mayrink, W., Genaro, O., Corrêa-Oliveira, R. and Martins-Filho, O.A. (2006b). *Phenotypic features of circulating leukocytes as immunological markers for clinical status and bone marrow parasite density in dogs naturally infected by Leishmania chagasi*. *Clin Exp Immunol*, 146, 303-311. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2006.03206.x>
- Reithinger, R., Dujardin, J.C., Louzir, H., Pirmez, C., Alexander, B. and Brooker, S. (2007). *Cutaneous leishmaniasis*. *Lancet Infect Dis*, 7, 581-596. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(07\)70209-8](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(07)70209-8)
- Ribeiro, R.R., Moura, E.P., Pimentel, V.M., Sampaio, W.M., Silva, S.M., Schettini, D.A., Alves, C.F., Melo, F.A., Tafuri, W.L., Demicheli, C., Melo, M.N., Frézard, F., & Michalick, M.S. (2008). *Reduced tissue parasitic load and infectivity to sand flies in dogs naturally infected by Leishmania (Leishmania) chagasi following treatment with a liposome formulation of meglumine antimoniate*. *Antimicrob Agents Chemother*, 52, 2564-2572. <https://doi.org/10.1128/AAC.00223-08>
- Rodríguez-Cortés, A., Ojeda, A., López-Fuertes, L., Timón, M., Altet, L., Solano-Gallego, L., Sánchez-Robert, E., Francino, O., & Alberola, J. (2007a). *A long term experimental study of canine visceral leishmaniasis*. *Int J parasitol*, 37, 683-693. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2006.11.007>
- Rodríguez-Cortés, A., Ojeda, A., Todolí, F., & Alberola, J. (2013). *Performance of commercially available serological diagnostic tests to detect Leishmania*

infantum infection on experimentally infected dogs. *Vet Parasitol*, 191, 363-366.

<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.09.009>

Rolão, N., Martins, M.J., João, A. & Campino, L. (2005). *Equine infection with Leishmania in Portugal. Parasite*, 12, 183-186.

<https://doi.org/10.1051/parasite/2005122183>

Rose, K., Curtis, J., Baldwin, T., Mathis, A., Kumar, B., Sakthianandeswaren, A., Spurck, T., Low Choy, J., & Handman, E. (2004). *Cutaneous leishmaniasis in red kangaroos: isolation and characterization of the causative organisms. Int J Parasitol*, 34, 655-664. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2004.03.001>

Rosypal, A.C., & Lindsay, D.S. (2005). *Non-sand fly transmission of a North American isolate of Leishmania infantum in experimentally infected BALB/c mice. J parasitol*, 91, 1113-1115. <https://doi.org/10.1645/GE-586R.1>

Roura López, X., Miró Corrales, G., Sainz Rodríguez, A., Estrada-Peña, A., Solano Gallego, L., Cardoso, L. (2015). *159 preguntas sobre las que siempre habías querido una respuesta.*

Sabaté, D., Llinás, J., Homedes, J., Sust, M., & Ferrer, L. (2014). *A single-centre, open-label, controlled, randomized clinical trial to assess the preventive efficacy of a domperidone-based treatment programme against clinical canine leishmaniasis in a high prevalence area. Prev Vet Med*, 115, 56-63. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2014.03.010>

- Sacchi, L., Calvi, L.E., Kramer, L.H., Ferroglia, E., Grandi, G., Clementi, E., and Corona, S. (2006). *The intradermal Leishmanin reaction induces antigen-specific maturation of canine dendritic cells with up-regulation of MHCII synthesis and expression.* *J Comp Pathol*, 135, 17-24. <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2006.02.009>
- Sanchez-Robert, E., Altet, L., Sanchez, A., & Francino, O. (2005). *Polymorphism of Slc11a1 (Nramp1) gene and canine leishmaniasis in case-control study.* *J Hered*, 96, 755-758. <https://doi.org/10.1093/jhered/esi111>
- Sanchez-Robert, E., Altet, L., Utzet-Sadurni, M., Giger, U., Sanchez, A., & Francino, O. (2008). *Slc11a1(formerly Nramp1) and susceptibility to canine visceral leishmaniasis.* *Vet Res*, 39, 36. <https://doi.org/10.1051/vetres:2008013>
- Santa-Rita, R.M., Santos Barbosa, H., Meirelles, M.N., & de Castro, S.L. (2000). *Effect of the alkyl-lysophospholipids on the proliferation and differentiation of Trypanosoma cruzi.* *Acta Trop*, 75, 219-228. [https://doi.org/10.1016/s0001-706x\(00\)00052-8](https://doi.org/10.1016/s0001-706x(00)00052-8)
- Savani, E.S., de Almeida, M.F., de Oliveira Camargo, M.C., D'Auria, S.R., Silva, M.M., de Oliveira, M.L., & Sacramento, D. (2010). *Detection of Leishmania (Leishmania) amazonensis and Leishmania (Leishmania) infantum chagasi in Brazilian bats.* *Vet Parasitol*, 168, 5-10. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.10.019>

- Schallig, H.D., Cardoso, L., & Semião-Santos, S.J. (2013). *Seroepidemiology of canine leishmaniosis in Évora (southern Portugal): 20-year trends. Parasitology*, 6, 100. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-6-100>
- Sharma, U., & Singh, S. (2008). *Insect vectors of Leishmania: distribution, physiology and their control. J Vector Borne Dis*, 45, 255-272. (Retraction published *J Vector Borne Dis*. 2012 Mar;49(1):54).
- Silva, F.L., Oliveira, R.G., Silva, T.M., Xavier, M.N., Nascimento, E.F., & Santos, R.L. (2009). *Venereal transmission of canine visceral leishmaniasis. Vet Parasitol*, 160, 55-59. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2008.10.079>
- Solano-Gallego, L., Lull, J., Ramos, G., Riera, C., Arboix, M., Alberola, J., and Ferrer, L. (2000). *The Ibizaian hound present a predominantly cellular immune response against natural Leishmania infection. Vet Parasitol* 90, 37-45. [https://doi.org/10.1016/S0304-4017\(00\)00223-5](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(00)00223-5)
- Solano-Gallego, L., Morell, P., Arboix, M., Alberola, J., Ferrer, L. (2001). *Prevalence of leishmania infantum infection in dogs living in an area of canine leishmaniasis endemicity using PCR on several tissues and serology. Journal of Clinical Microbiology* 39 pp 560-563. <https://doi.org/10.1128/JCM.39.2.560-563.2001>
- Solano-Gallego, L., Lull, L., Arboix, M., Ferrer, L., & Alberola, J. (2001b). *Evaluation of the efficacy of two leishmanins in asymptomatic dogs. Vet Parasitol*, 102, 163-166. [https://doi.org/10.1016/s0304-4017\(01\)00527-1](https://doi.org/10.1016/s0304-4017(01)00527-1)

- Solano-Gallego, L., Rodríguez-Cortés, A., Trotta, M., Zampieron, C., Razia, L., Furlanello, T., Caldin, M., Roura, X., Alberola, J. (2007) *Detection of Leishmania infantum DNA by fret-based real-time PCR in urine from dogs with natural clinical leishmaniosis. Vet Parasitol* 20;147(3-4):315-9. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2007.04.013>
- Solano-Gallego, L., Rodríguez-Cortés, A., Trotta, M., Zampieron, C., Razia, L., Furlanello, T., Caldin, M., Roura, X., & Alberola, J. (2007a). *Detection of Leishmania infantum DNA by fret-based real-time PCR in urine from dogs with natural clinical leishmaniosis. Vet Parasitol*, 147, 315-319. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2007.04.013>
- Solano-Gallego, L., Rodríguez-Cortés, A., Iniesta, L., Quintana, J., Pastor, J., Espada, Y., Portús, M. and Alberola, J. (2007b). *Cross-sectional serosurvey of feline leishmaniasis in ecoregions around the Northwestern Mediterranean. Am J Trop Med Hyg*, 76, 676-680. <https://portalrecerca.uab.cat/en/publications/cross-sectional-serosurvey-of-feline-leishmaniasis-in-ecoregions->
- Solano-Gallego, L., Koutinas, A., Miró, 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*, 165, 1-18. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.05.022>
- Solano-Gallego, L., Miró, G., Koutinas, A., Cardoso, L., Pennisi, M.G., Ferrer, L., Bourdeau, P., Oliva, G., Baneth, G. and The LeishVet Group (2011). *LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniosis. Parasites &*

Vectors, 4, 86. <https://www.leishvet.org/publications/canine-leishmaniosis-guidelines/>

Solano Gallego, L. M. (2013). *Leishmaniosis una revisión actualizada*. (1ed.).

Solano Gallego, L., Villanueva Saz, S., Cardoso, L., Ordeix i Esteve, L., Miró Corrales, G., Fondati, A., Peña Giménez, M.T., Leiva Repiso, M., Naranjo Freixa, C., Dantas-Torres, F., Otranto, D., Grazia Pennisi, M. (2013). *Leishmaniosis una revisión actualizada. Leishmaniosis canina y felina en España y Portugal*, 159 preguntas sobre las que siempre habías querido una respuesta.

Solano-Gallego, L., Kyriacou, C., Yasur, D., Villanueva-Saz, S., Eyal, O. and Baneth, G. (2013). *A cross-sectional study on Leishmania infantum infection by serology and non-invasive PCR in sick and clinically healthy dogs from Cyprus*. En: *8th CVBD World Forum pp. 42. St. Petersburg*.
<https://parasitesandvectors.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13071-021-04682-w>

Solano-Gallego, L., Villanueva-Saz, S., Carbonell, M., Trotta, M., Furlanello, T. and Natale, A. (2014). *Serological diagnosis of canine leishmaniosis: comparison of three commercial ELISA tests (Leiscan, ID Screen and Leishmania 96), a rapid test (Speed Leish K) and an in-house IFAT*. *Parasit Vectors*, 7, 111.
<https://doi.org/10.1186/1756-3305-7-111>

Solcá, M.S., Bastos, L.A., Guedes, C.E., Bordoni, M., Borja, L.S., Larangeira, D.F., da Silva Estrela Tuy, P.G., Amorim, L.D., Nascimento, E.G., de Sá Oliveira, G.G., dos- Santos, W.L., Fraga, D.B. and Veras, P.S. (2014). *Evaluating the accuracy of molecular diagnostic testing for canine visceral leishmaniasis using latent class*

<https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0103635>

Soto, J., Toledo, J., Valda, L., Balderrama, M., Rea, I., Parra, R., Ardiles, J., Soto, P., Gómez, A., Molleda, F., Fuentelsaz, C., Anders, G., Sindermann, H., Engel, J. and Berman, J. (2007). *Treatment of Bolivian mucosal leishmaniasis with miltefosine. Clin Infect Dis*, 44, 350-356. <https://doi.org/10.1086/510588>

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. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC124807/>

Souza, N.P., Almeida, A.B., Freitas, T.P., Paz, R.C., Dutra, V., Nakazato, L., and Sousa, V.R. (2010). *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi in wild canids kept in captivity in the State of Mato Grosso. Rev Soc Bras Med Trop*, 43, 333-335. <https://www.scielo.br/j/rsbmt/a/SMFG3jGmSspqzXGXLGYpCMx/?lang=pt>

Souza, T.D., Turchetti, A.P., Fujiwara, R.T., Paixão, T.A. and Santos, R.L. (2014). *Visceral leishmaniasis in zoos and wildlife. Vet Parasitol*, 200, 233-241. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2013.12.025>

Stanneck, D., Ebbinghaus-Kintscher, U., Schoenhense, E., Kruedewagen, E.M., Turberg, A., Leisewitz, A., Jiritschka, W. and Krieger, K.J. (2012a). *The synergistic action of imidacloprid and flumethrin and their release kinetics from collars applied for ectoparasite control in dogs and cats. Parasit Vectors*, 5, 73. <https://parasitesandvectors.biomedcentral.com/articles/10.1186/1756-3305-5-73>

- Stanneck, D., Rass, J., Radeloff, I., Kruedewagen, E., Le Sueur, C., Hellmann, K. and Krieger, K. (2012b). *Evaluation of the long-term efficacy and safety of an imidacloprid 10%/flumethrin 4.5% polymer matrix collar (Seresto®) in dogs and cats naturally infested with fleas and/or ticks in multicenter clinical field studies in Europe. Parasit Vectors*, 5, 66. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-5-66>
- Tarallo, V., Dantas-Torres, F., Lia, R. and Otranto, D. (2010). *Phlebotomine sand fly population dynamics in a leishmaniasis endemic peri-urban area in southern Italy. Acta Trop*, 116, 227-234. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2010.08.013>
- Teixeira Neto, R.G., Giunchetti, R.C., Carneiro, C.M., Vitor, R.W., Coura-Vital, W., Quaresma, P.F., Ker, H.G., de Melo, L.A., Gontijo, C.M. and Reis, A.B. (2010). *Relationship of Leishmania-specific IgG levels and IgG avidity with parasite density and clinical signs in canine leishmaniasis. Vet Parasitol*, 169, 248-257. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.01.023>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2005.11.010>
- Tellevik, M.G., Muller, K. E., Løkken, K.R., and Nerland, A. H. (2014). *Detection of a broad range of Leishmania species and determination of parasite load of infected mouse by real-time PCR targeting the arginine permease gene AAP3. Acta Trop*, 137, 99-104. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2014.05.008>
- Todolí, F., Solano-Gallego, L., Ojeda, A., Quintana, J., Lloret, A., Roura, X., Alberola, J., and Rodríguez-Cortés, A. (2009). *Anti-Leishmania IgA in urine samples from dogs with clinical leishmaniasis. Vet Parasitol*, 159, 17-23.

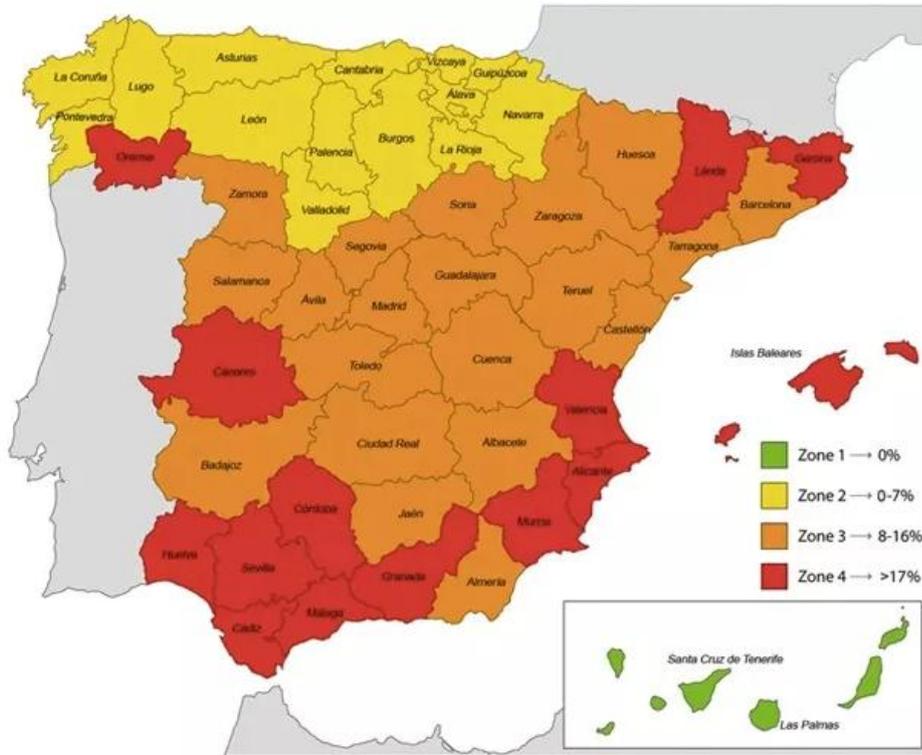
- Tolezano, J.E., Uliana, S.R., Taniguchi, H.H., Araújo, M. F., Barbosa, J.A., Barbosa, J.E., Floeter-Winter, L.M., and Shaw, J.J. (2007). *The first records of Leishmania (Leishmania) amazonensis in dogs (Canis familiaris) diagnosed clinically as having canine visceral leishmaniasis from Araçatuba County, São Paulo State, Brazil. Vet Parasitol*, 149, 280-284. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2007.07.008>
- Torrent, E., Leiva, M., Segalés, J., Franch, J., Peña, T., Cabrera, B., and Pastor, J. (2005). *Myocarditis and generalized vasculitis associated with leishmaniosis in a dog. J Small Anim Pract*, 46, 549-552. <https://doi.org/10.1111/j.1748-5827.2005.tb00285.x>
- Torres, M., Bardagí, M., Roura, X., Zanna, G., Ravera, I., and Ferrer, L. (2011). *Long term follow-up of dogs diagnosed with leishmaniosis (clinical stage II) and treated with meglumine antimoniate and allopurinol. Vet J*, 188, 346-351. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2010.05.025>
- Travi, B.L., Osorio, E.Y., Saldarriaga, O.A., Cadena, H., Tabares, C.J., Peniche, A., Lee, S., and Melby, P.C. (2009). *Clinical, parasitology, and immunologic evolution in dogs experimentally infected with sand fly derived Leishmania chagasi promastigotes. Am J Trop Med Hyg*, 81, 994-1003. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2009.09-0229>
- Travi, B.L., Tabares, C.J., Cadena, H., Ferro, C., and Osorio, Y. (2001). *Canine visceral leishmaniasis in Colombia: relationship between clinical and parasitology status and infectivity for sand flies. Am J Trop Med Hyg*, 64, 119-124. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2001.64.119>

- Trigo, J., Abbehusen, M., Netto, E.M., Nakatani, M., Pedral-Sampaio, G., de Jesus, R.S., Goto, Y., Guderian, J., Howard, R.F. and Reed, S.G. (2010). *Treatment of canine visceral leishmaniasis by the vaccine Leish-111f+MPL-SE*. *Vaccine*, 28, 3333-3340. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2874835/>
- 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, 866-872. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2258802/>
- Turchetti, A.P., Souza, T.D., Paixão, T.A. and Santos, R.L. (2014). *Sexual and vertical transmission of visceral leishmaniasis*. *J Infect Dev Ctries*, 8, 403-407. <https://jidc.org/index.php/journal/article/view/24727504/1035>
- 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, 181-183. <https://doi.org/10.1136/vr.138.8.181>
- Valladares, J.E., Riera, C., Alberola, J., Gállego, M., Portús, M., Cristòfol, C., Franquelo, C. and Arboix, M. (1998). *Pharmacokinetics of meglumine antimoniate after administration of a multiple dose in dogs experimentally infected with Leishmania infantum*. *Vet Parasitol*, 75, 33-40. [https://doi.org/10.1016/s0304-4017\(97\)00193-3](https://doi.org/10.1016/s0304-4017(97)00193-3)
- Valladares, J.E., Riera, C., González-Enseñat, P., Díez-Cascón, A., Ramos, G., Solano-Gallego, L., Gállego, M., Portús, M., Arboix, M. and Alberola, J. (2001). *Long term improvement in the treatment of canine leishmaniosis using an antimony liposomal formulation*. *Vet Parasitol*, 97, 15-21.

- Vilas, F., Carpintero, J., Sevilla, S.L., Martínez, A., Ordobás, M., Bernal, J., Díaz, R., Iriso, A., Sevillano, O., Escacena, C., de la Fuente, S., Arce, A., Estirado, A., Frutos, J., & Fúster, F. (2012). Brote de leishmaniasis en la zona suroeste de la Comunidad de Madrid. Medidas de investigación y control medioambiental. *Profesión Veterinaria*, 17, 6-15.
- van Zandbergen, G., Klinger, M., Mueller, A., Dannenberg, S., Gebert, A., Solbach, W., & Laskay, T. (2004). *Cutting edge: neutrophil granulocyte serves as a vector for Leishmania entry into macrophages. The journal of immunology*, 173(11), 6521-6525.
- Walker, D. M., Oghumu, S., Gupta, G., McGwire, B. S., Drew, M. E., & Satoskar, A. R. (2014). *Mechanisms of cellular invasion by intracellular parasites. Cellular and molecular life sciences: CMLS*, 71(7), 1245-1263 <https://doi.org/10.1007/s00018-013-1491-1>
- WHO (2010). *Report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis. Geneva.*
- Woerly, V., Maynard, L., Sanquer, A., & Eun, H.M. (2009). *Clinical efficacy and tolerance of miltefosine in the treatment of canine leishmaniosis. Parasitol Res*, 105, 463-469. <https://doi.org/10.1007/s00436-009-1404-2>

I. ANEXOS

Anexo #1. Latest trends in *Leishmania infantum* infection in dogs in Spain, Part I: mapped seroprevalence and sand fly distributions, 2020



Fuente: Latest trends in *Leishmania infantum* infection in dogs in Spain, Part I: mapped seroprevalence and sand fly distributions, 2020 (Rosa Gálvez, Ana Montoya, Israel Cruz, Carlos Fernández, Oihane Martín, Rocio Checa, Carmen Chicharro, Silvia Migueláñez, Valentina Marino & Guadalupe Miró)

Anexo #2. Flebótomo *P. perniciosus* observación de sus características anatómicas.



Foto:

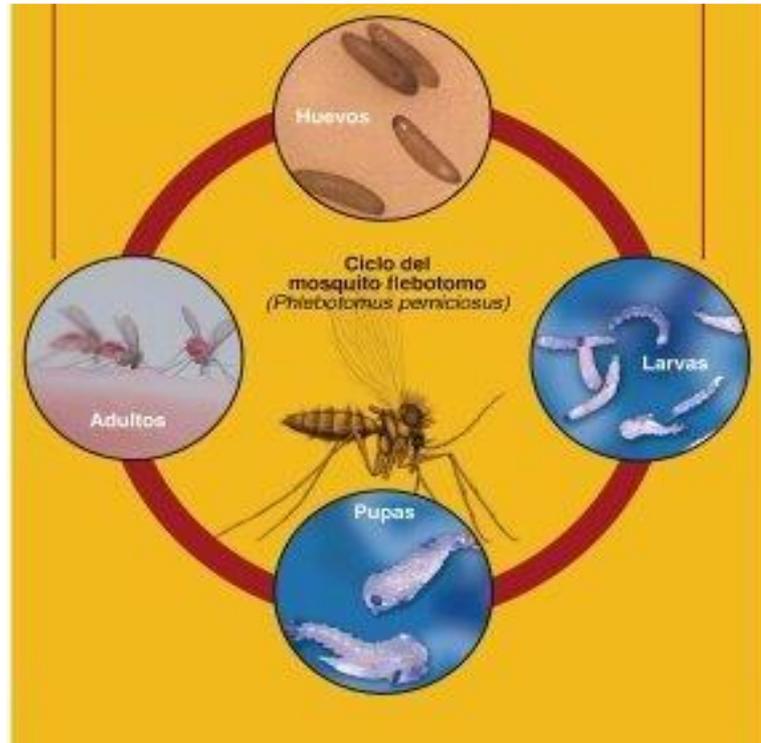
CDC /Public Health Image Library

Anexo #3. Se muestra al flebótomo *P. perniciosus* todavía en proceso de ingerir su ración de sangre de un humano el cual es visible a través del abdomen distendido y transparente.



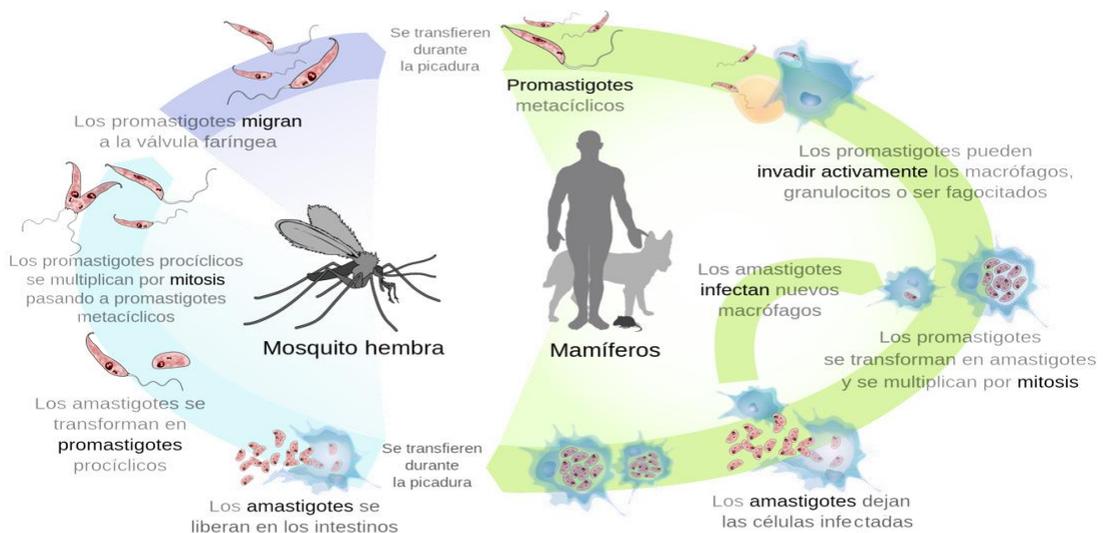
Foto: Imagen tomada de www.diptera.info.

Anexo #4. Ciclo del mosquito flebótomo (*Phlebotomus perniciosus*)



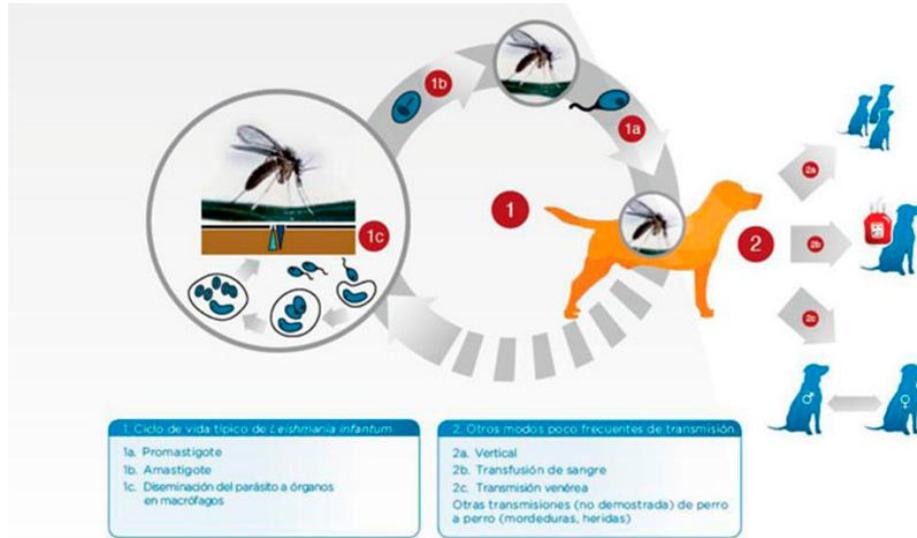
Fuente: Disponible en <http://www.msd-animal-health.es>

Anexo #5. Ciclo Biológico de los parásitos del género *Leishmania*, responsables de la Leishmaniosis.



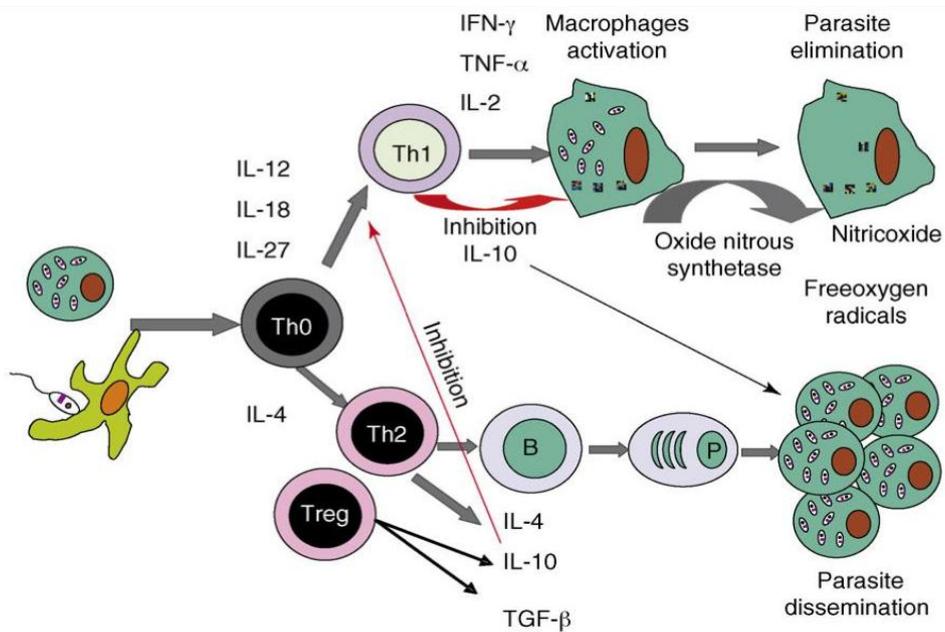
Fuente: Disponible en [Leishmaniasis_life_cycle_diagram_en.svg](#)

Anexo #6. Otros modos poco frecuentes de transmisión de *Leishmania infantum*



Fuente: Solano- Gallego *et al.*, 2011.

Anexo #7. Representación de la respuesta inmunitaria regulada por linfocitos T colaboradores y linfocitos T citotóxicos en la Lcan.



Fuente: Baneth *et al.*, 2008.

Anexo #8. Lesión de oreja de un canino con Leishmaniosis observada en la Clínica Veterinaria Sant-Antoni en España

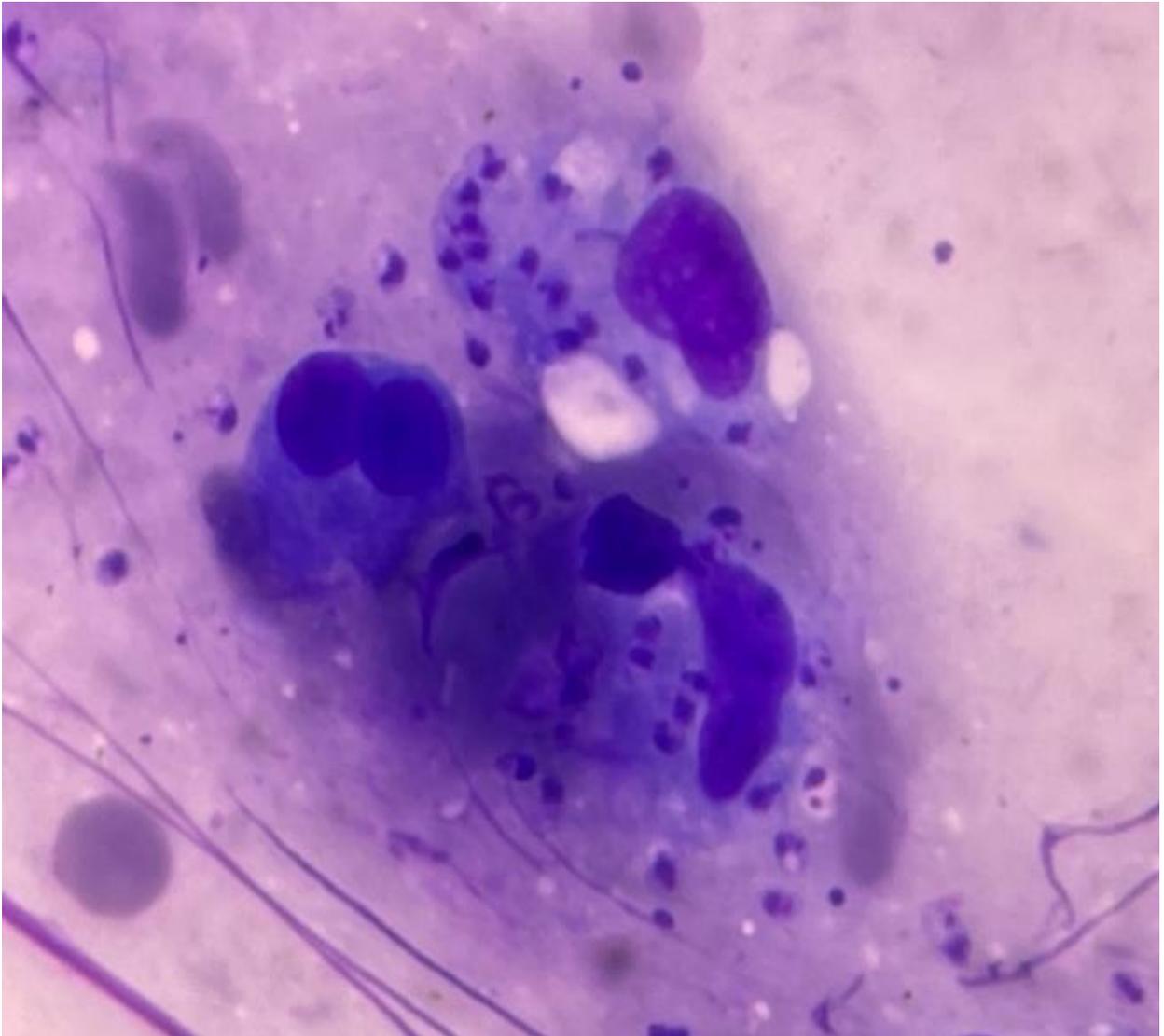
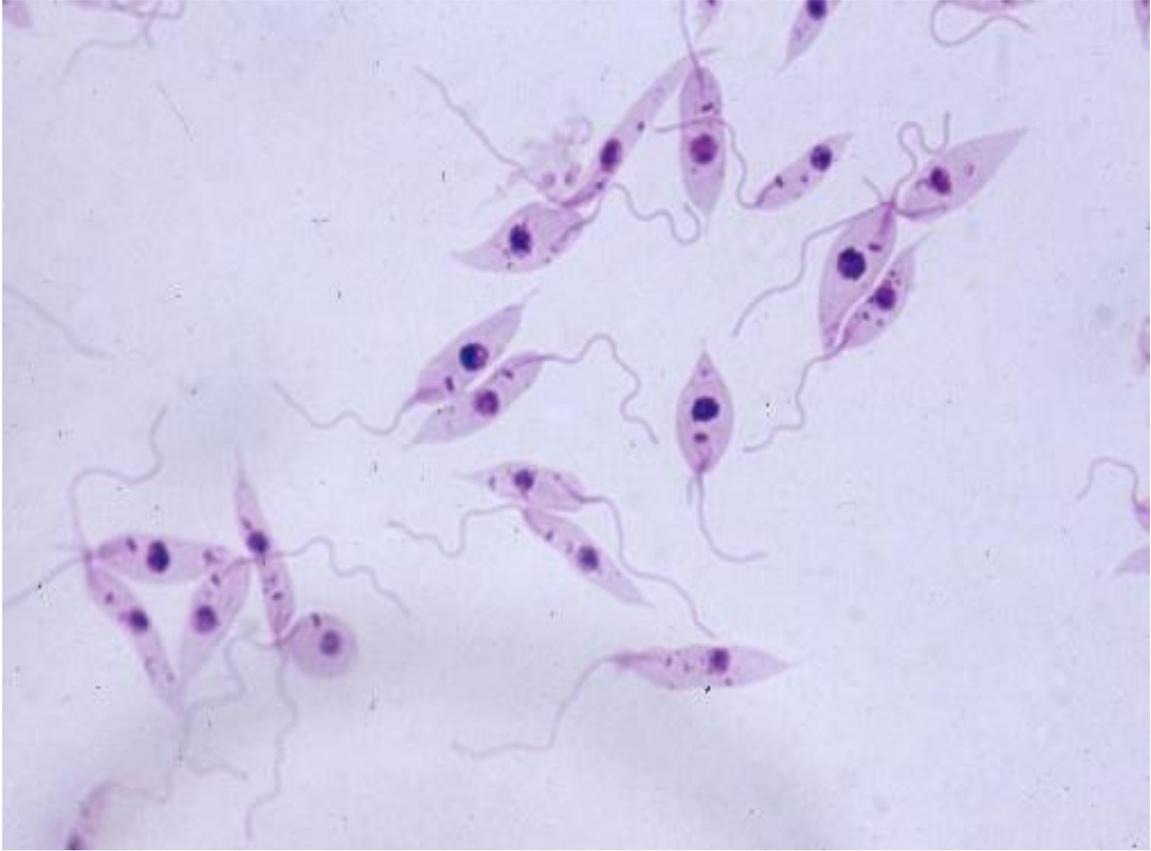


Foto Propia: Citología de costra y lesión de oreja de un canino con leishmaniosis **observada en 100x** con Tinción de Giemsa en la Clínica Veterinaria Sant Antoni.

Anexo #9. Formas promastigotes de Leishmania



Fuente: Disponible en <https://hospitalalbeitar.com/leishmaniosis>

Anexo #10. Paciente Canino de la Clínica Veterinaria Sant Antoni en primera consulta por lesiones externas compatibles con Leishmaniosis



Fotos Propias: Imágenes tomadas de un paciente de la Clínica Veterinaria Sant Antoni con lesiones características de Leishmania

Anexo #11. Consentimiento informado

Consentimiento para participar en un estudio de leishmaniosis.

Instituciones: Universidad Particular Ricardo Palma, Clínica Veterinaria Sant Antoni- España.

Investigadora: Stefany Roxana Andrade Iglesias

Título: Determinación de la frecuencia de casos de Leishmania en caninos de la clínica veterinaria Sant Antoni – España del 2016 al 2021.

Propósito del Estudio:

Lo estamos invitando a participar en un estudio llamado: Determinación de la frecuencia de casos de Leishmania en caninos de la clínica veterinaria Sant Antoni – España del 2016 al 2021. Este es un estudio desarrollado por un investigador de la Universidad Ricardo Palma.

En la actualidad existen muchos casos de leishmaniasis canina que son estudiados en España de forma común siendo una enfermedad de importancia en animales y seres humanos en un país endémico de la enfermedad, por lo cual este estudio será de ayuda para próximos estudios de prevalencia de esta enfermedad en canino

Así como también con este estudio se busca encontrar la asociación de la leishmaniosis canina entre la raza, edad, sexo y características medio ambientales.

Procedimientos:

Si usted acepta participar en este estudio se llevará a cabo los siguientes puntos:

1. Se tomarán los datos de las fichas clínicas de la clínica veterinaria, y los registros de los descartes de leishmania tomados de cada perro para recolección de datos.

Riesgos:

No existe ningún riesgo al participar de este trabajo de investigación. Sin embargo, algunas preguntas le pueden causar incomodidad. Usted es libre de responderlas o no.

Beneficios:

No existe beneficio directo para usted por participar de este estudio. Sin embargo, se le informará de manera personal y confidencial de los resultados que se obtengan de la investigación a realizar.

Costos e incentivos:

Usted no deberá pagar nada por participar de este estudio. Igualmente, no recibirá ningún incentivo económico ni de otra índole, únicamente la satisfacción de colaborar a un mejor entendimiento de la enfermedad.

Confidencialidad:

Nosotros guardaremos su información con códigos y no con nombres. Si los resultados de este seguimiento son publicados, no se mostrará ninguna información que permita la identificación de las

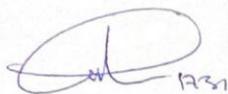
personas que participan en este estudio. Sus archivos no serán mostrados a ninguna persona ajena al estudio sin su consentimiento.

Derechos del paciente:

Si usted decide participar en el estudio, puede retirarse de éste en cualquier momento, o no participar en una parte de estudio sin perjuicio alguno. Si tiene alguna duda adicional, por favor pregunte al personal del estudio, o llamar a la investigadora Stefany Roxana Andrade Iglesias al teléfono 675640653.

Consentimiento:

Acepto voluntariamente participar en este estudio, comprendo que cosas me van a pasar si participo en el proyecto, también entiendo que puedo decidir no participar y que puedo retirarme del estudio en cualquier momento.



25.06.2021

Participante
Nombre: ALCIA BERTRUIN SEGOVIA
DNI: 24386398G

Fecha



25/06/21

Participante
Nombre: CARLOS TOLEDO PARDO
DNI: 44.509.495-X

Fecha

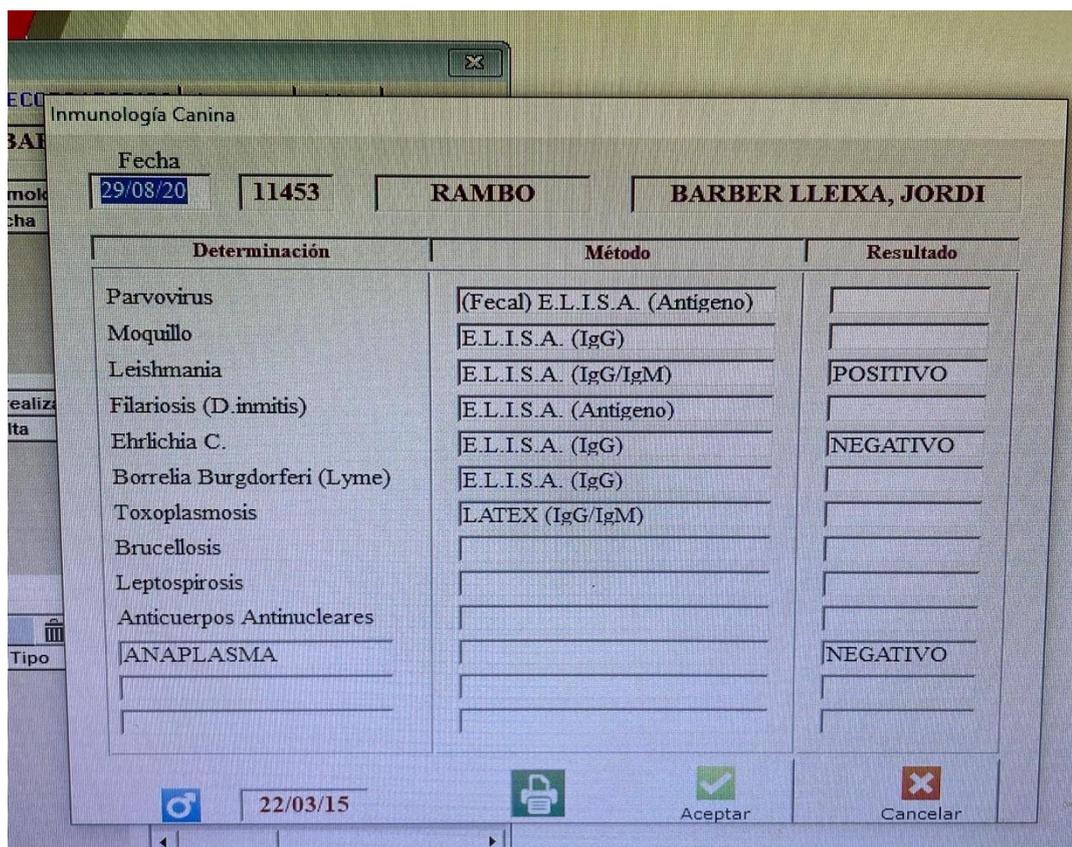
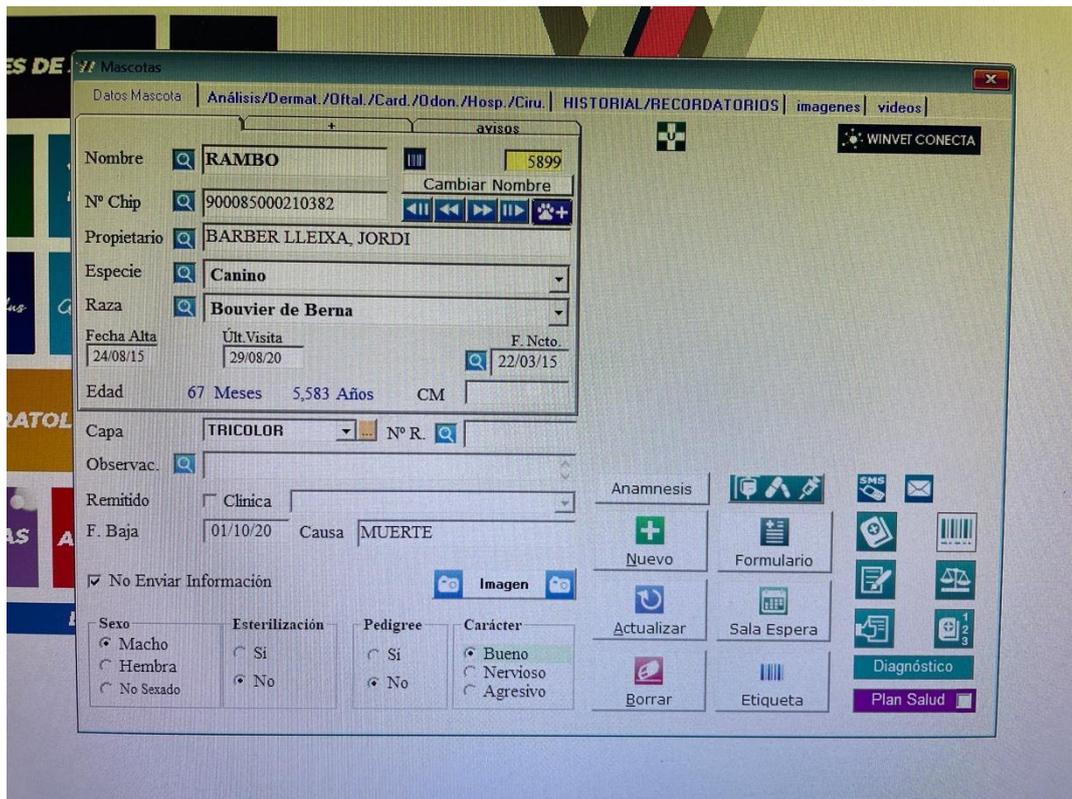


28/06/21

Participante STEFANY ROXANA ANDRADE IGLESIAS
Nombre:
DNI: 47769171

Fecha

Anexo #12. Programa Win Vet usado para la extracción de la base de datos



ANEXO #13 Prueba ELISA de Leishmania Canina



Fotos Propias: Imágenes tomadas de los resultados de uno de los pacientes de la Clínica Veterinaria Sant Antoni.

ANEXO #14. Tabla de todas las razas específicas dentro de la población de este estudio.

Cuenta de TIPO DE RAZA		
	POSITIVO	Total, general
Mestizo	103	408
Pastor Alemán	25	76
Yorkshire Terrier	5	73
Labrador Retriever	13	51
Golden Retriever	8	46
Bulldog Francés	6	37
Bichón Maltés	1	32
Carlino	4	30
Chihuahua	1	27
Bóxer	13	26
Shih Tzu	1	25
Cocker Spaniel	12	24
Epagneul Bretón	5	19
American Stanffordshire Terrier	7	22
Rottweiler	6	17
Mastín	5	16
Beagle	3	16
Pinscher	3	16
Bull Terrier	1	16
Bulldog Ingles	3	15
Caniche Toy		17
Ratonero Valenciano	3	14
Galgo	4	14
West Highland White Terrier	1	14
Braco Alemán	5	13
Doberman	1	11
Weimaraner	3	11

Pitbull	3	8
Bichón Habanero		8
Samoyedo	4	7
Dálmata		7
Schnauzer Mediano		7
Shar Pei	1	7
Border Collie	1	6
Dogo Alemán	1	6
Scottish Terrier	2	6
Podenco		6
Akita-Inu	1	6
Jack Russell Terrier	1	5
Podenco		5
Teckel Miniatura	2	5
Mastín Español	1	5
Pastor del Cáucaso	2	5
Teckel Pelo Duro		4
Schnauzer Miniatura	1	4
Teckel pelo corto		4
Husky Siberiano		4
Spitz		4
Mastín del Pirineo	1	4
Pomerania		4
Fox Terrier Pelo Duro		3
Crestado Chino	2	3
Teckel		3
Airedale Terrier		3
Setter Inglés		3
Rhodesian Ridgeback		3
Braco Húngaro		3
Rough Collie		3

Schnauzer Miniatura	1	3
Ratón de Praga		3
Galgo Español		3
Petit Brabancon		2
Pastor Belga Maninois		2
Chow chow		2
Basset Hound	2	2
Perro de Agua		3
Cavalier King Charles Spaniel		2
Petit Bravancon		2
Pastor Australiano	2	2
Bodeguero Andaluz		2
Setter Irlandés	1	2
Bobtail		2
Bichón Maltes		2
Pachón Navarro		2
Teckel	1	2
Schnauzer Gigante		2
Bouvier de Berna	1	2
Gos d`Altura		3
Cocker Spaniel Americano		2
Caniche Mediano		2
Dogo Argentino		1
Eurasier		1
Pastor Suizo		1
Presa Canario	1	1
Springer Spaniel Inglés		1
Pit bull		1
Bull Terrier Miniatura	1	1
Ca de Bestiar		1
Shiba-Inu		1

Alano Español		1
Bichón Frisé		1
Laika Ruso	1	1
American Bully		1
Maltés		1
Total, general	275	1300

Fuente: Elaboración Propia – 2023

En el caso de esta tabla, cabe observar que entre la población de caninos positivos de raza no definida encontramos al Mestizo como los caninos con mayor cantidad de casos positiva 103 mientras que en la población de Raza definida se encuentra el Pastor Alemán con 25 casos positivos, seguido del labrador y el Bóxer los dos con 13 casos positivos, en tanto el Cocker 12 casos, sucesivamente el Rottweiler, Bulldog Francés y American Staffordshire Terrier con la misma cantidad de caninos positivos respectivamente con 6 casos .

Anexo #15 Tabla de análisis de regresión logística múltiple en caninos positivos a *Leishmania* por edad.

EDAD	χ^2	<i>p</i>	OR	IC-OR al 95%
Adulto- Geriátrico	16,17	p<0,005**	2,83	1,70; 4,69 *
Adulto- Cachorro	12,58	p<0,005**	1,9	1,33; 2,71 *
Geriátrico- cachorro	1,71	p>0,05	1,49	0,82; 2,71

Fuente: Elaboración Propia – 2023

* significancia al 95%

**alta significancia $p < 0,005$

Anexo #16. Tabla de análisis de regresión logística múltiple en caninos positivos a *Leishmania* por raza.

RAZA	χ^2	<i>p</i>	OR	IC-OR al 95%
No definida - Definida	6,13	0,025 > $p > 0,01^*$	1,42	1,08 ; 1,87 *

Fuente: Elaboración Propia – 2023

* significancia al 95%

**alta significancia $p < 0,005$

Anexo #17. Tabla de análisis de regresión logística múltiple en caninos positivos a *Leishmania* por sexo.

SEXO	χ^2	<i>p</i>	OR	IC-OR al 95%
Macho - Hembra	4,33	0,05 > $p > 0,025^*$	1,33	1,02; 1,74 *

Fuente: Elaboración Propia – 2023

* significancia al 95%

**alta significancia $p < 0,005$

Anexo #18. Tabla de análisis de regresión logística múltiple en caninos positivos a *Leishmania* por tamaño.

TAMAÑO	χ^2	<i>p</i>	OR	IC-OR al 95%
Grande- Pequeño	34,84	$p < 0,005^{**}$	3,16	2,16; 4,63 *
Mediano- Pequeño	27,06	$p < 0,005^{**}$	2,83	1,91; 4,19 *
Grande - Mediano	0,52	$p > 0,05$	1,11	0,84; 1,47

Fuente: Elaboración Propia – 2023

* significancia al 95%

**alta significancia $p < 0,005$

Anexo # 19. Tabla de análisis de regresión logística múltiple en caninos positivos a *Leishmania* por Estaciones.

ESTACIONES	χ^2	<i>p</i>	OR	IC-OR al 95%
Verano - Invierno	11,22	$p < 0,005^{**}$	2,03	1,34 ; 3,07 *
Primavera - Invierno	5,66	$0,05 > p > 0,025^*$	1,66	1,09 ; 2,52 *
Verano - Otoño	4,12	$0,025 > p > 0,01^*$	1,48	1,01 ; 2,16 *
Otoño - Invierno	1,75	$p < 0,025^*$	1,37	0,86 ; 2,18
Verano - Primavera	1,42	$p > 0,05$	1,22	0,88 ; 1,69
Primavera - Otoño	0,99	$p > 0,05$	1,22	0,82 ; 1,80

Fuente: Elaboración Propia – 2023

* significancia al 95%

**alta significancia $p < 0,005$

GRÁFICOS

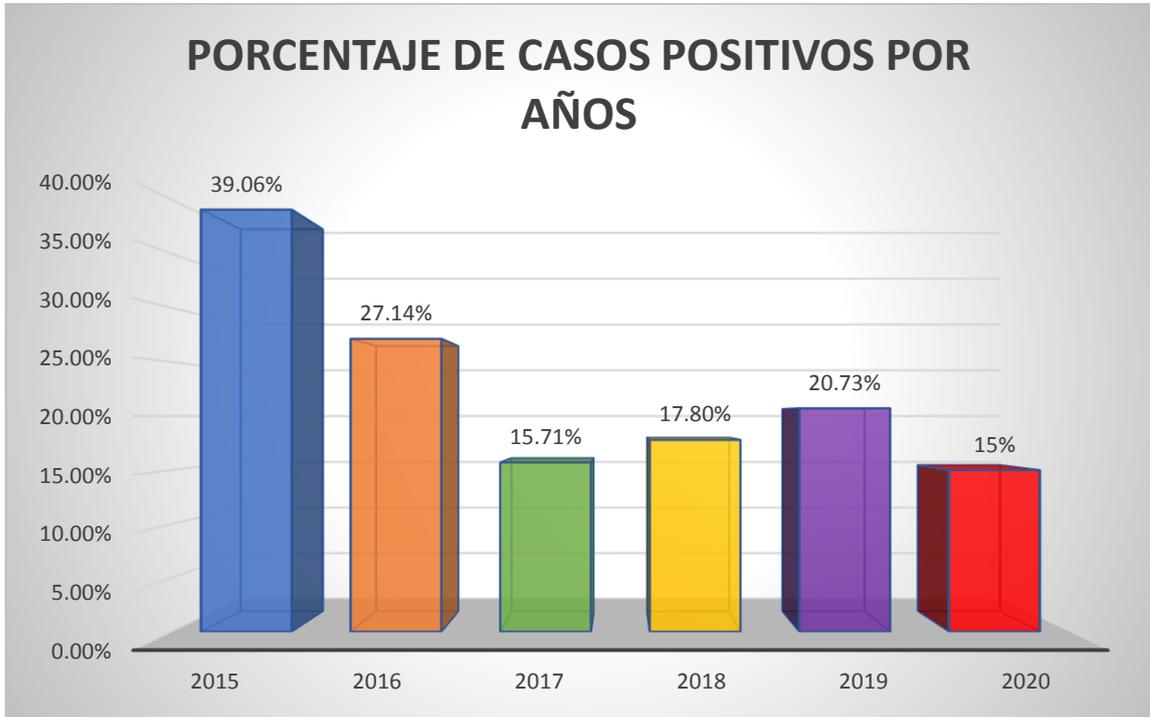


Gráfico 1: *Porcentaje de casos positivos a Leishmaniosis Canina por año.*

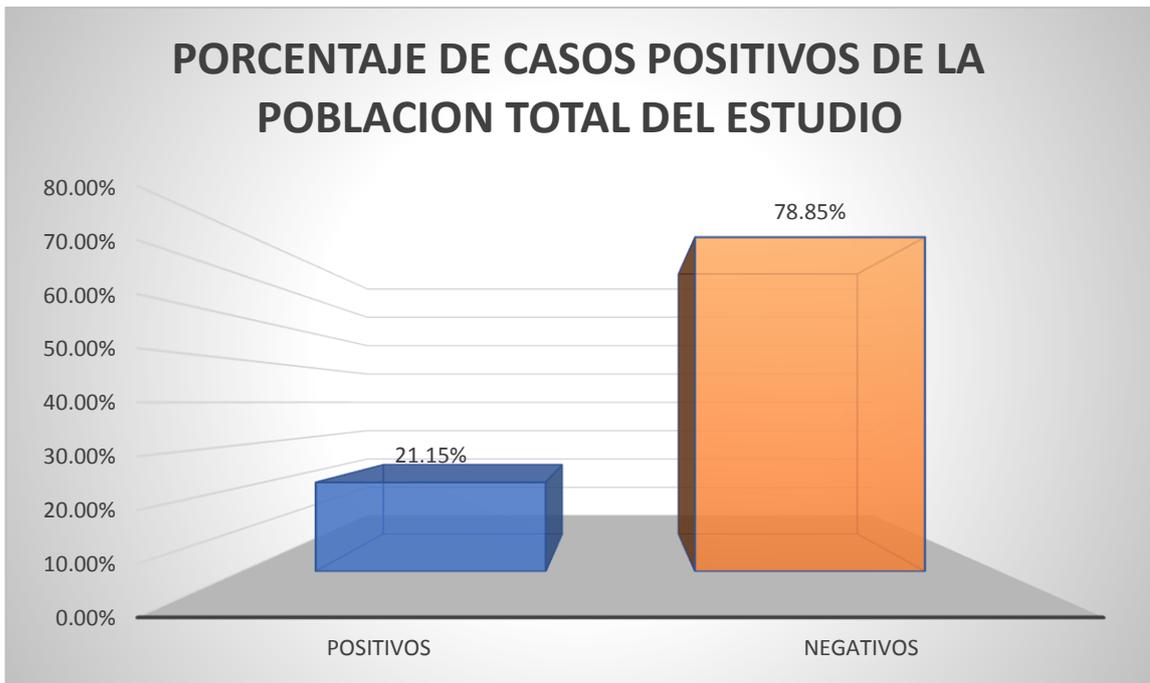


Gráfico 2: *Porcentaje de casos positivos de la población total del estudio.*

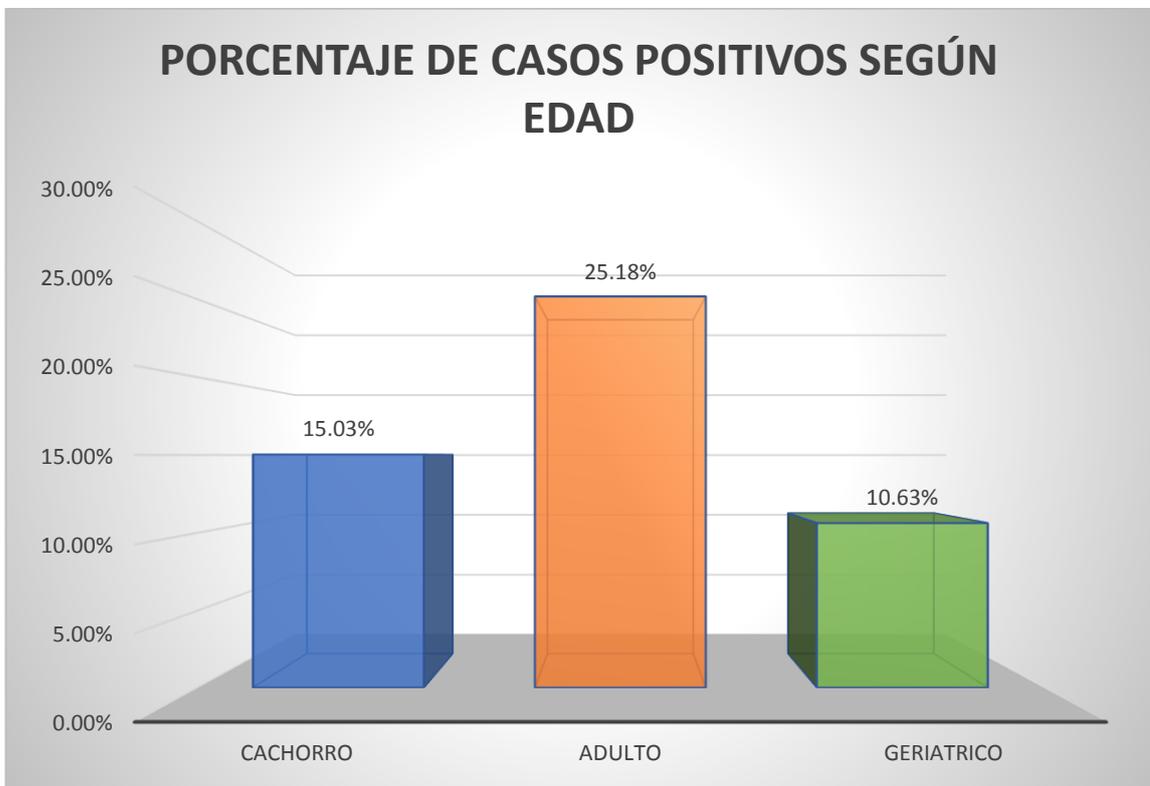


Gráfico 3: *Porcentaje de casos positivos a Leishmaniosis Canina según la edad.*

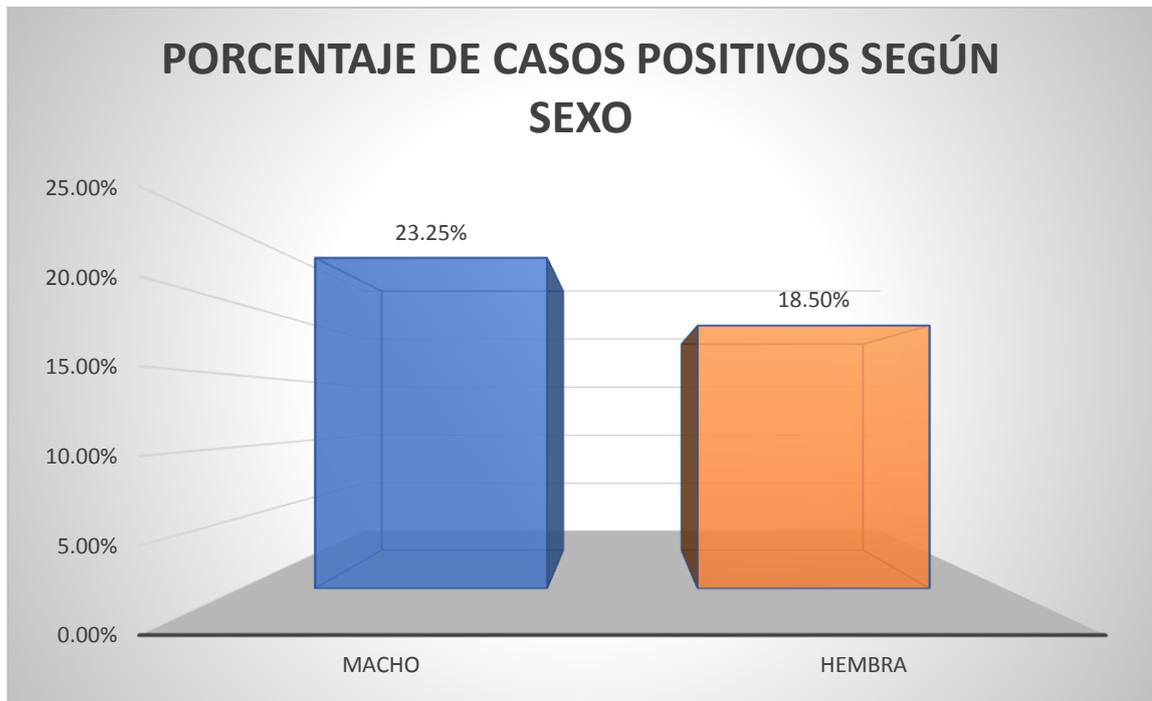


Gráfico 6: *Porcentaje de casos positivos a Leishmaniosis Canina según el sexo.*

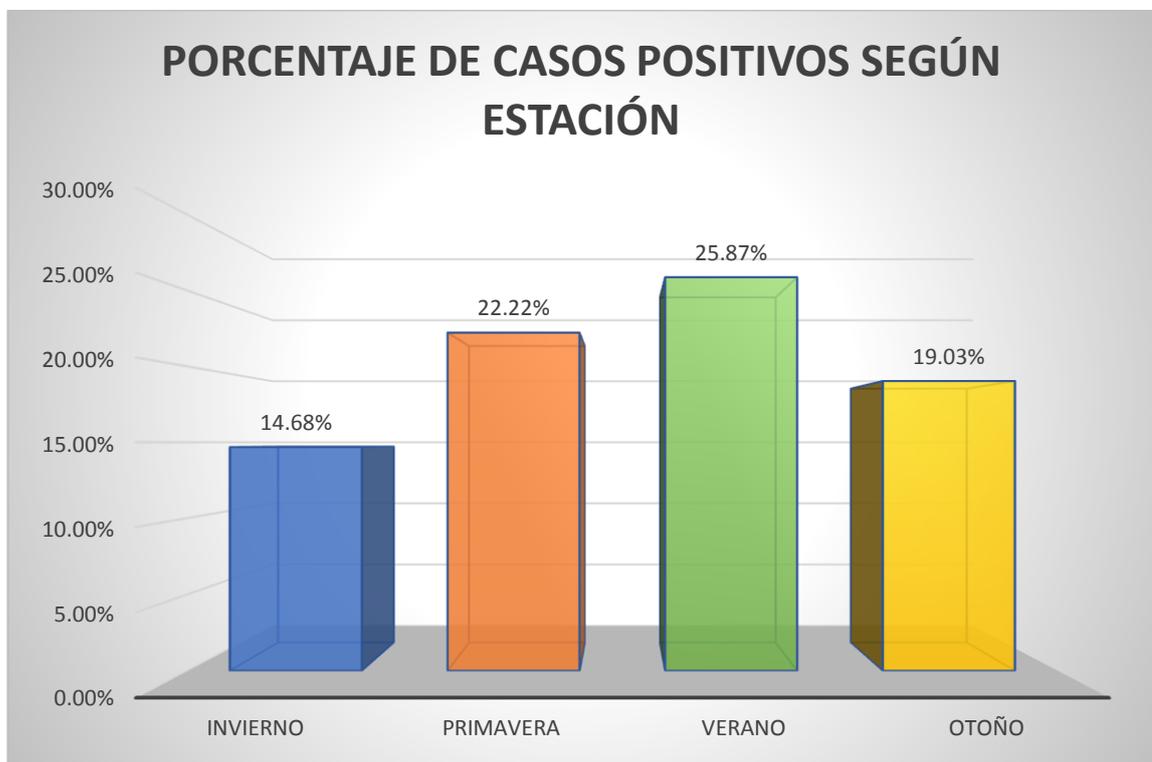


Gráfico 7: *Porcentaje de casos positivos a Leishmaniosis Canina según la estacionalidad.*

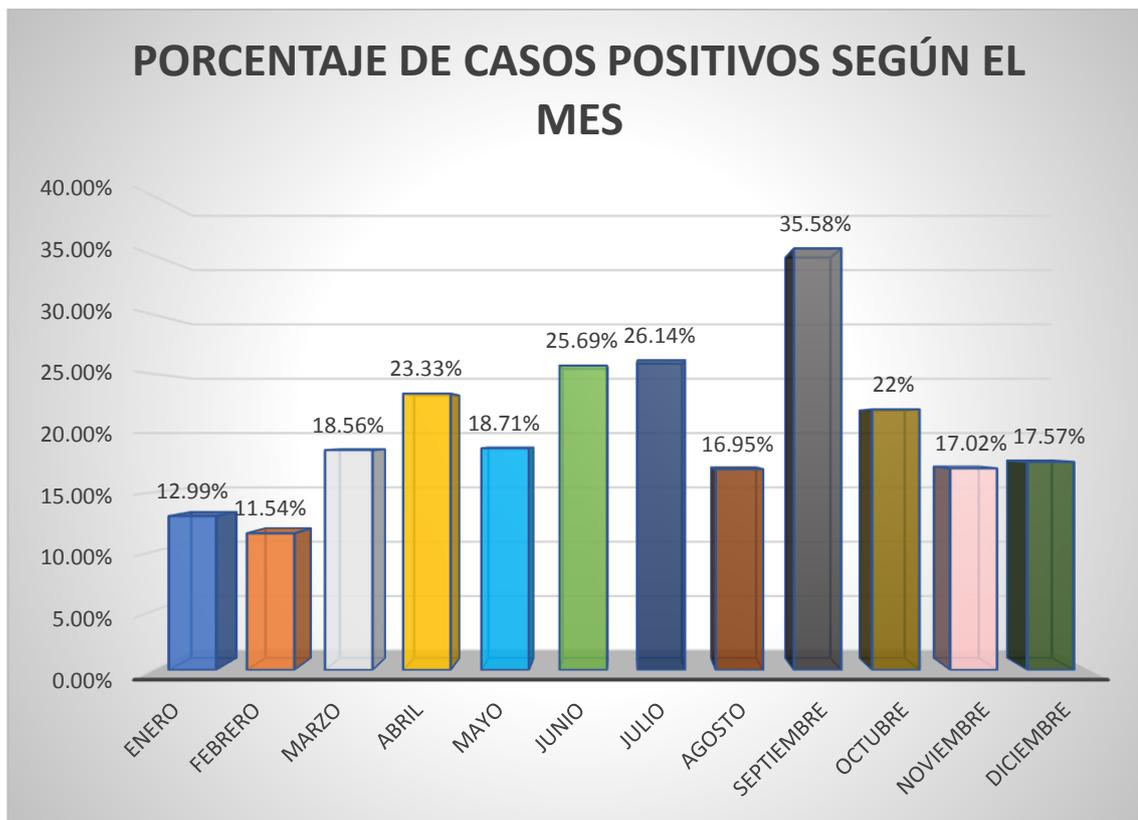


Gráfico 8: Porcentaje de casos positivos a Leishmaniosis Canina según el mes.

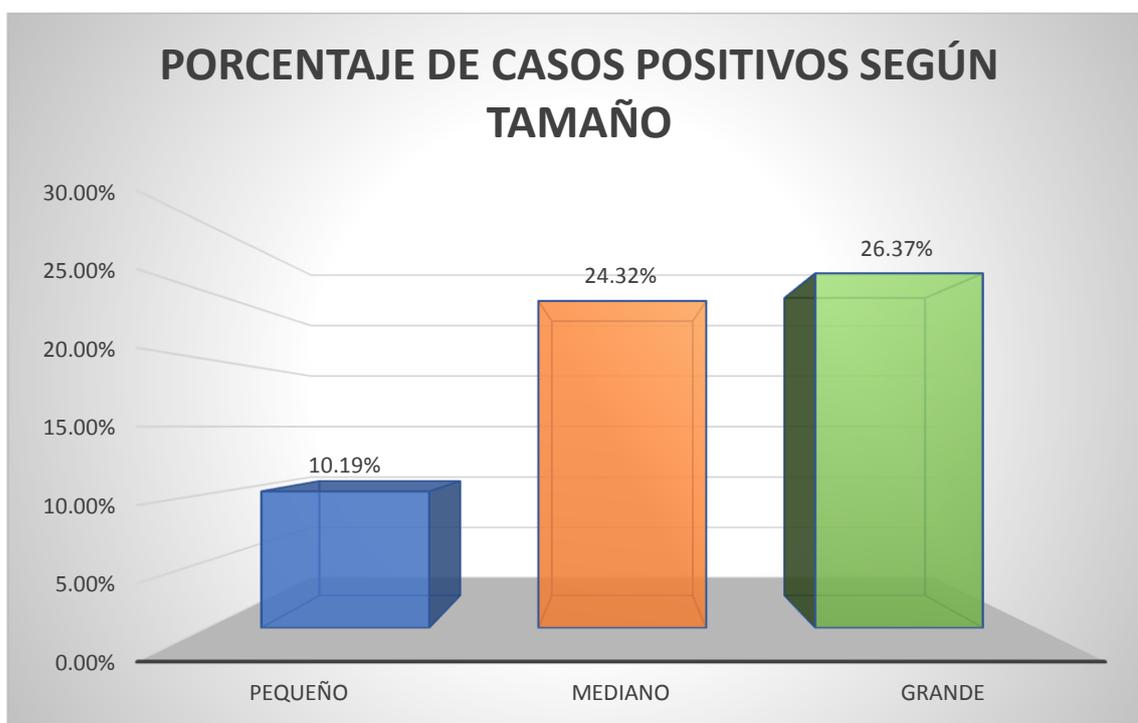


Gráfico 9: Porcentaje de casos positivos a Leishmaniosis Canina según tamaño.