



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

**Programa de Doctorado de BIOMEDICINA, INVESTIGACIÓN TRASLACIONAL Y NUEVAS
TECNOLOGÍAS EN SALUD**

Facultad de Medicina

Universidad de Málaga

TESIS DOCTORAL

**EPIDEMIOLOGÍA DE LEISHMANIOSIS
EN LA PROVINCIA DE MÁLAGA**

Sandra María López Fernández

Septiembre, 2023

Directores:

Eduardo Martínez-Manzanares

Encarnación Clavijo Frutos

Tutores

Inmaculada Bellido Estévez





UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

AUTORA: Sandra María López Fernández

 <http://orcid.org/0000-0001-8691-4548>

EDITA: Publicaciones y Divulgación Científica. Universidad de Málaga



Esta obra está bajo una licencia de Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional:

Cualquier parte de esta obra se puede reproducir sin autorización pero con el reconocimiento y atribución de los autores.

No se puede hacer uso comercial de la obra y no se puede alterar, transformar o hacer obras derivadas.

<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/legalcode>

Esta Tesis Doctoral está depositada en el Repositorio Institucional de la Universidad de Málaga (RIUMA): riuma.uma.es



	SECCIÓN 1ª	6
	INTRODUCCION Y EPIDEMIOLOGÍA	
1	DESCRIPCIÓN	6
1.1	CARACTERÍSTICAS	6
1.2	VECTORES	8
1.3	CICLO BIOLÓGICO	9
1.4	HOSPEDADORES	12
1.4.1	Hospedador principal	12
1.4.2	Hospedadores secundarios	13
1.4.3	Hospedadores casuales	14
1.4.4	Hospedador humano	15
		19
2	PREVENCIÓN Y CONTROL	
2.1.	Desde la OMS	19
2.2	Su aplicación en España	20
2.3	Situación en Andalucía	23
2.4	Comorbilidades y Transmisión Diferida, exportación de portadores	25
3	CLÍNICA	31
3.1	Contagio	31
3.2	Mecanismos de defensa del hospedador	32
3.3	Diseminación	33
3.4	Patogenia	33
3.4.1	Patogenia atendiendo a su forma de presentación	33
3.4.2	Patogenia atendiendo a la gravedad de presentación, Estadios I a IV	35
4	DIAGNÓSTICO	39
4.1	Criterio clínico-sintomatológico	39
4.2	Criterio laboratorial-analítico	39
4.3	Diagnóstico en los Reservorios	40
4.3.1	Perro	40
4.3.2	Gato	41
5	TRATAMIENTO	42

	SECCIÓN 2ª	43
	OBJETIVOS Y JUSTIFICACIÓN	
	SECCIÓN 3ª	46
	MATERIALES	
1	FUNGIBLES	46
2	MAQUINARIA	48
3	ACCESORIOS	48
	SECCIÓN 4ª	50
	MÉTODOS	
	I. MÉTODOS CLÍNICOS	50
1	EXAMEN CLÍNICO	50
2	PREPARACIÓN PARA LA TOMA DE MUESTRAS	51
3	MANEJO ZOOTÉCNICO DE LOS ANIMALES	53
	II. MÉTODOS LABORATORIALES	57
1	PROCEDIMIENTOS PREVIOS	57
1.1	Protocolo NET 10	57
1.2	Digestión de tejidos	57
1.3	Análisis aplicado a cada tejido/fluido	59
1.4	Tratamiento de las muestras	59
1.5	Procesado de las muestras	59
2	ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS	60
2.1	Inmunocromatografía de membrana	60
2.2	Inmunfluorescencia indirecta	61
2.3	ELISA	62
2.4	Genética molecular	62
2.6	Microscopía clásica	64
	III MÉTODOS ESTADÍSTICOS	65
1	ORIGEN DE LOS DATOS	65
2	TRANSFORMACIÓN Y TRATAMIENTO ESTADÍSTICO DE LOS DATOS	68
2.1	Para el cálculo de la prevalencia	69
2.2	Para el estudio de la ecología	69
2.3	Para el estudio de los hospedadores domésticos	70
2.3.1	Para los objetivos en la especie Canina	71
2.3.2	Para los objetivos en la especie Felina	73

	SECCIÓN 5ª	77
	RESULTADOS EN FUNCIÓN DE LOS OBJETIVOS PARCIALES	
1	PREVALENCIA	77
2	ECOLOGÍA	77
3	OBJETIVOS EN EL PERRO	81
3.1	Zoonosis vectoriales comórbidas: Qué otras zoonosis vectoriales portan los cánidos y qué relación hay con la leishmaniosis	81
3.2	Proponer un nuevo término Epidemiológico: La “Transmisión Diferida Facilitada”: Comprobar cuántos animales portadores y/o enfermos han viajado adoptados a nuevos asentamientos en Europa y otros lugares del mundo, responder a la cuestión de si se están creando Exonodos de la enfermedad en los destinos. Evaluar el riesgo para la Salud Pública.	86
4	OBJETIVOS EN EL GATO	92
4.1	Valoración de las técnicas diagnósticas disponibles: comparar cada técnica diagnóstica como indicador de enfermedad/portabilidad.	92
4.2	Diseño de un algoritmo diagnóstico en gatos: ¿se puede establecer una tanda de pruebas que ayuden al veterinario clínico a confirmar o descartar la enfermedad o la portabilidad? ¿qué conclusiones se pueden sacar de la comparación de los resultados?	93
	SECCIÓN 6ª	104
	CONCLUSIONES	
	ABERVIATURAS	114
	BIBLIOGRAFÍA	115



SECCIÓN 1ª

INTRODUCCION Y EPIDEMIOLOGÍA

1. DESCRIPCIÓN

La Leishmaniosis es una enfermedad de gran complejidad, producida por organismos cuya taxonomía¹ los sitúa en el Dominio Eucariota, Reino Protista, dentro del filo de amebas y flagelados. Debido a la gran mitocondria asociada a su flagelo, con una enorme cantidad de material genético mitocondrial, se les llama Kinetoplástidos, que engloba a una serie de especies que comparten el ser flagelados y el tener su medio de locomoción estrechamente ligado a esa gran mitocondria de la que recibe el nombre (kinetoplasto) y que le aporta la energía suficiente para realizar su ciclo vital cuando toman su forma en el vector. Esta mitocondria está a su vez estrechamente relacionada con un citoesqueleto bien desarrollado, cuyos microtúbulos proporcionan una gran estabilidad al protozoo. En este caso, presentan un solo flagelo. A su vez, el género *Leishmania* se encuentra dividido en dos subgéneros, *Leishmania* y *Viannia*. Dentro del primer subgénero, se diferencian diversos complejos, siendo el *donovani* el que engloba las líneas de mayor interés que incluye a las especies *L. Infantum*, *L. donovani* y *L. chagasi*. En realidad, engloba a numerosas especies repartidas por todo el mundo, siendo una única especie objeto de este estudio, *Leishmania infantum*, porque hasta el año 2023, es la única descrita y autóctona en la Península Ibérica.

1.1. CARACTERÍSTICAS

A nivel biológico², la especie posee un elevadísimo polimorfismo genético y cada grupo de cepas está orientado a cuadros viscerales o cutáneos en fases iniciales de la enfermedad, pero que una vez establecida, si el paciente muestra una respuesta defensiva deficiente, acabará desarrollando la forma visceral. Con respecto a su morfología, *L. infantum* posee dos formas de presentación, según se encuentre en el hospedador vertebrado o en el vector artrópodo (Figura 1).

La presentación como amastigote se produce en el interior del hospedador vertebrado y tiene forma redondeada, entre 3 y 7 micras de diámetro, el flagelo se encuentra en forma vestigial y su distribución es principalmente intracelular, en el citoplasma de macrófagos maduros y monocitos circulantes (aunque se han visto también dentro de neutrófilos). Cuando se encuentran amastigotes libres en sangre o tejidos, se trata de parásitos que han abandonado la célula infectada y están circulando a la búsqueda de una nueva célula a la que parasitar.

La presentación como **promastigote** muestra un cuerpo alargado cuyo flagelo está elongado en toda su extensión incrementando el tamaño del parásito en su eje

longitudinal a las 10-20 micras. Su hábitat son los vectores transmisores entre vertebrados, insectos dípteros de la fam. Psychosidae, subfamilia Phlebotomidae que cuenta con un género para Europa³, *Phlebotomus Spp.*, y otro para el Nuevo Mundo, *Lutzomia spp.*

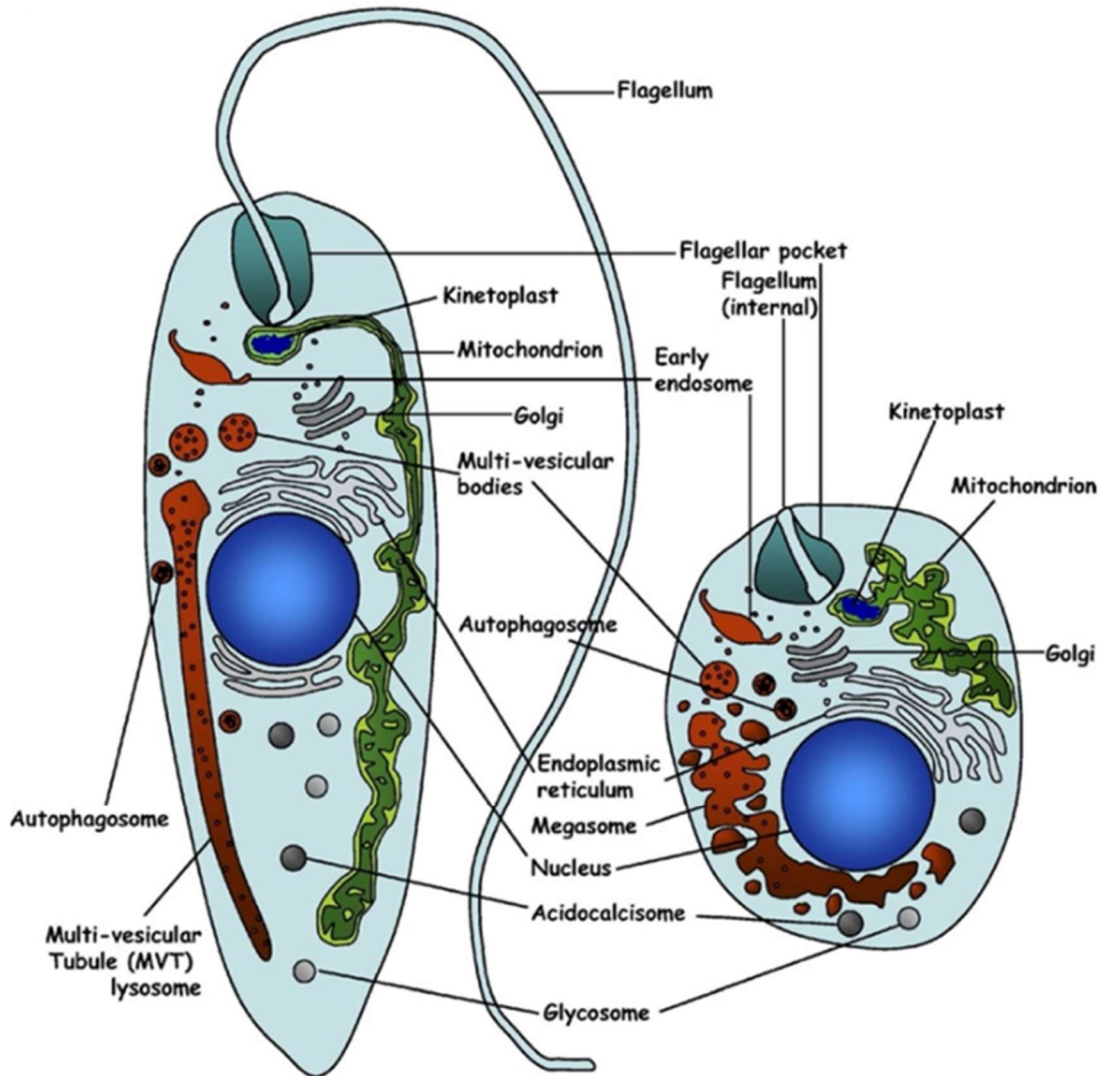


Figura 1: Morfología de *L. infantum*, promastigote y amastigote.
Fuente: Slideshare.net

1.2. VECTORES

Los más comunes en España son *Phlebotomus perniciosus*, *P. ariasi*, *P. langeroni*, *P. longicuspis* y *P. longipalpis* (Figura 2). Los Flebotómidos son conocidos como moscas de la arena, ya que no necesitan agua para la ovoposición, pero sí una humedad relativa alta a ras de suelo con abundante materia orgánica.

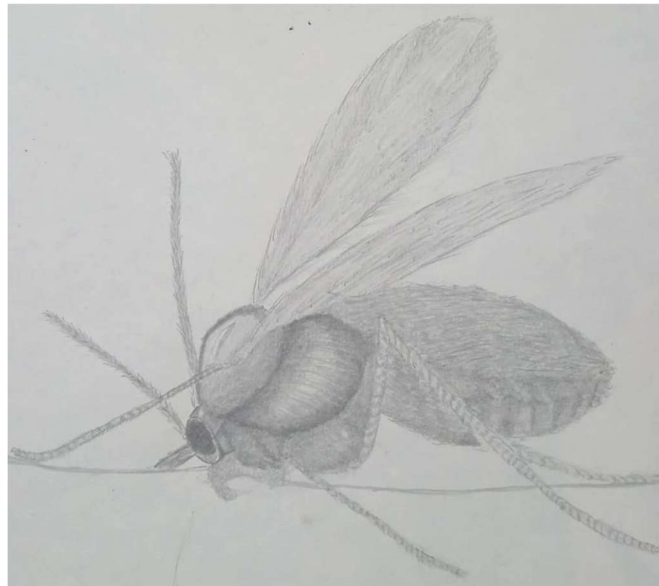


Figura 2: Hembra de *Phlebotomus* spp. Fuente propia

Estas condiciones medioambientales están perfectamente establecidas en el área este⁴ de la provincia de Málaga cuya superficie no urbana está dedicada al cultivo de frutales tropicales, explotación que requiere grandes cantidades de agua de riego. Toda la franja costera, hasta los 500m de altitud se encuentra intensamente explotada por esta modalidad agrícola (Figura 3).

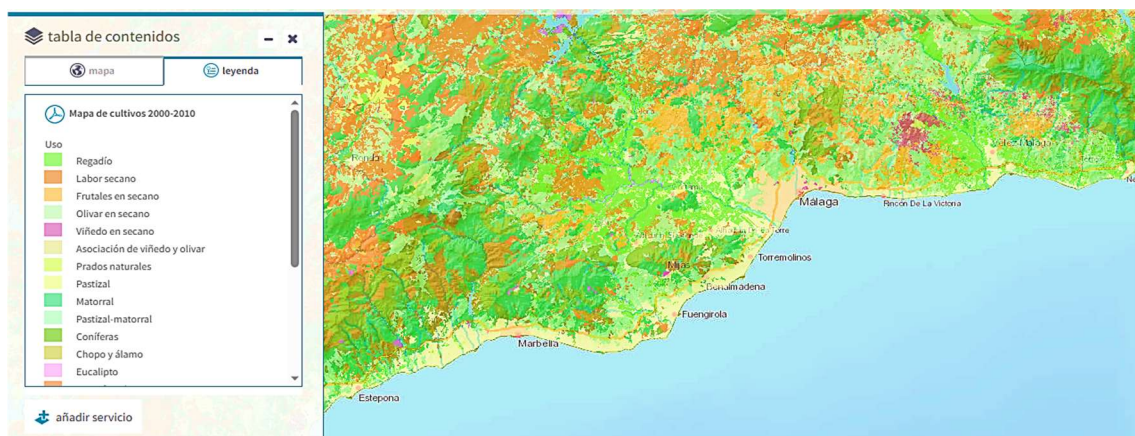


Figura 3: Uso del suelo en la provincia de Málaga. Fuente: MAPAMA

La franja oeste⁴, sin embargo, pese a la existencia de algunos puntos con cultivos de regadío, está intensamente urbanizada, con un modelo de “Pueblo Mediterráneo” consistente en edificaciones de poca altura, viviendas unifamiliares y urbanizaciones con amplias zonas verdes. Cuenta con numerosos campos de golf que son regados diariamente, pero estas zonas también son fumigadas con mucha frecuencia por lo que la presencia de dípteros es menor que en la zona agraria del este.

1.3. CICLO BIOLÓGICO

El ciclo biológico¹ del parásito parte de su presencia en macrófagos y monocitos de un reservorio vertebrado infectado que recibe la picadura de una hembra del vector (Figura 4), la cual necesita de las proteínas de la sangre para su ovoposición.

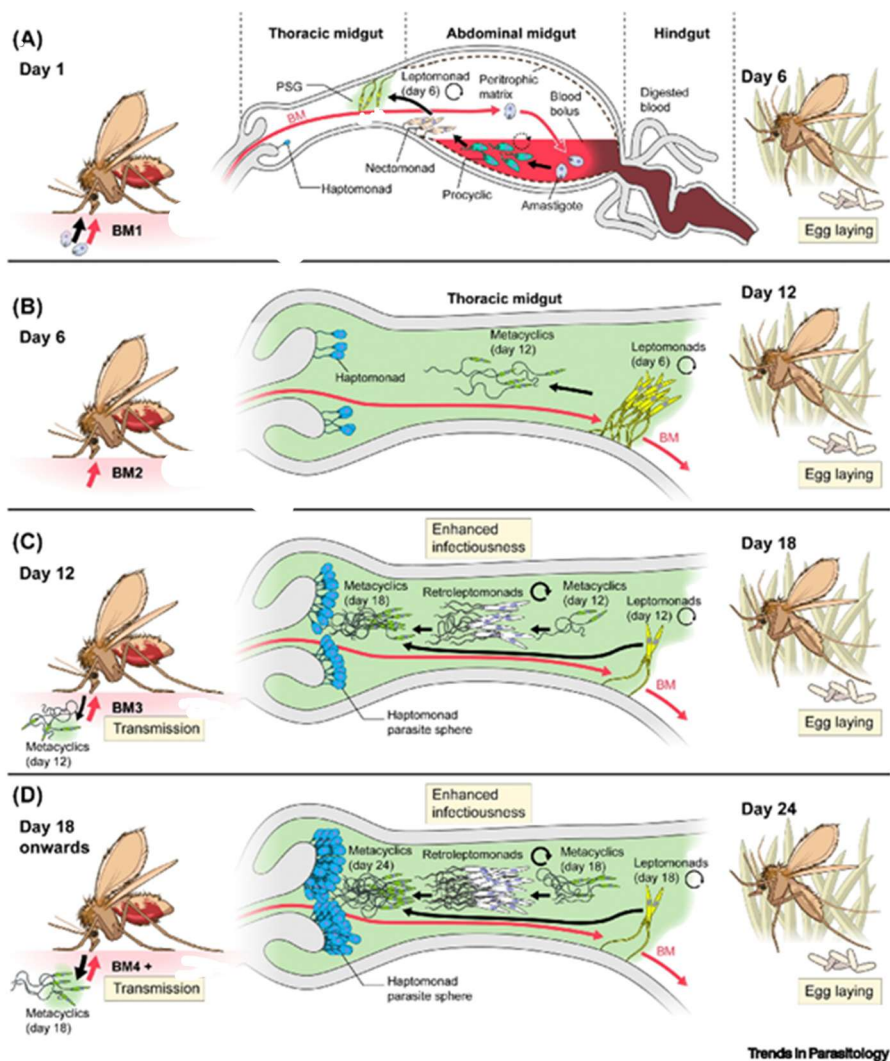


Figura 4: Cronología del ciclo biológico del vector. A, primer contacto; B, maduración de los parásitos; C, primer contagio; D, segundo contagio. Fuente: Trends in Parasitology

Los amastigotes pasan al aparato digestivo del vector y en su intestino medio abandona los macrófagos en digestión y adoptan la forma promastigote procíclico, que

comienza una fase de multiplicación muy intensa, pero no tienen capacidad infectiva de nuevos hospedadores.

Los nuevos promastigotes se dirigen a las paredes intestinales donde se adhieren y maduran a promastigotes metacíclicos, los cuales ya no se dividen, pero sí son capaces de infectar a nuevos hospedadores. Con tal fin, se dirigen hacia la probóscide del díptero, donde queda aguardando que el vector se alimente de nuevo para introducirse en el hospedador vertebrado (Figura 5).

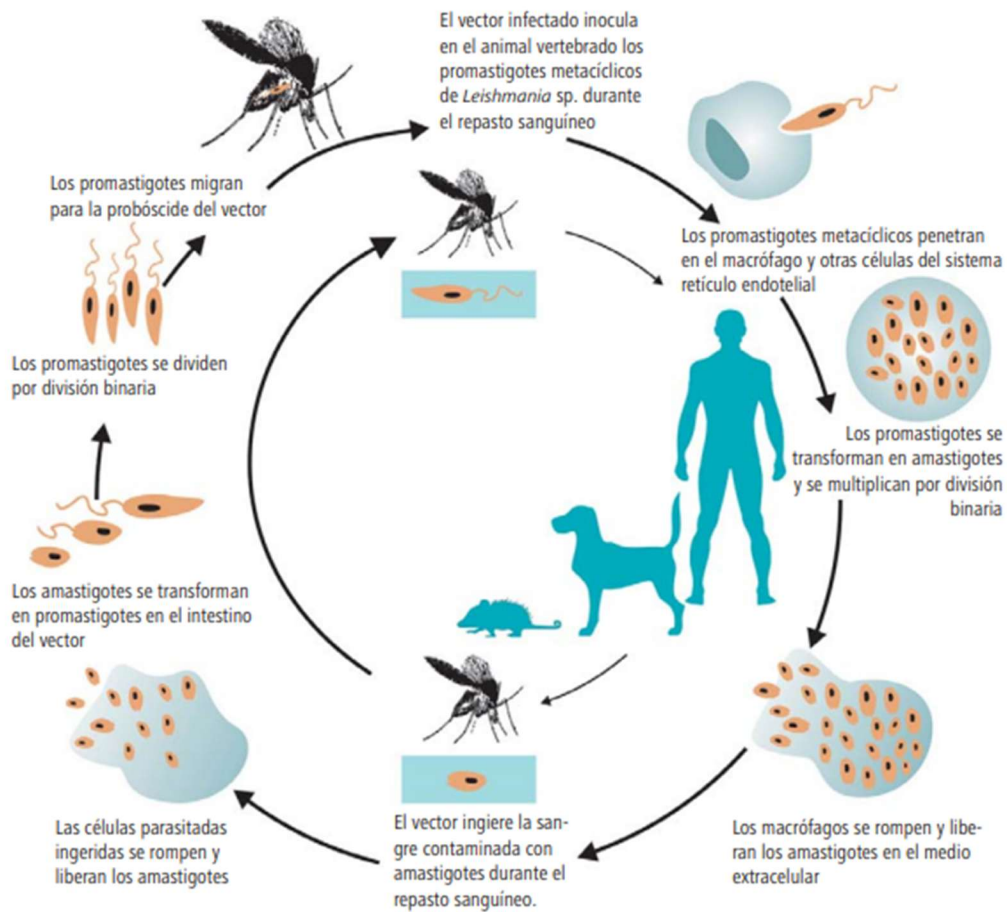


Figura 5: Ciclo biológico *L. infantum*. Fuente [researchgate.net](https://www.researchgate.net)

Todo el proceso inicial puede durar entre 4 y 7 días. Una de las pocas ventajas que presenta este vector es que la transmisión es directa desde el portador vertebrado, no existe la transmisión vertical por lo que las nuevas generaciones emergidas de la ovoposición de una hembra infectada nacen libres de parásitos (Figura 6).

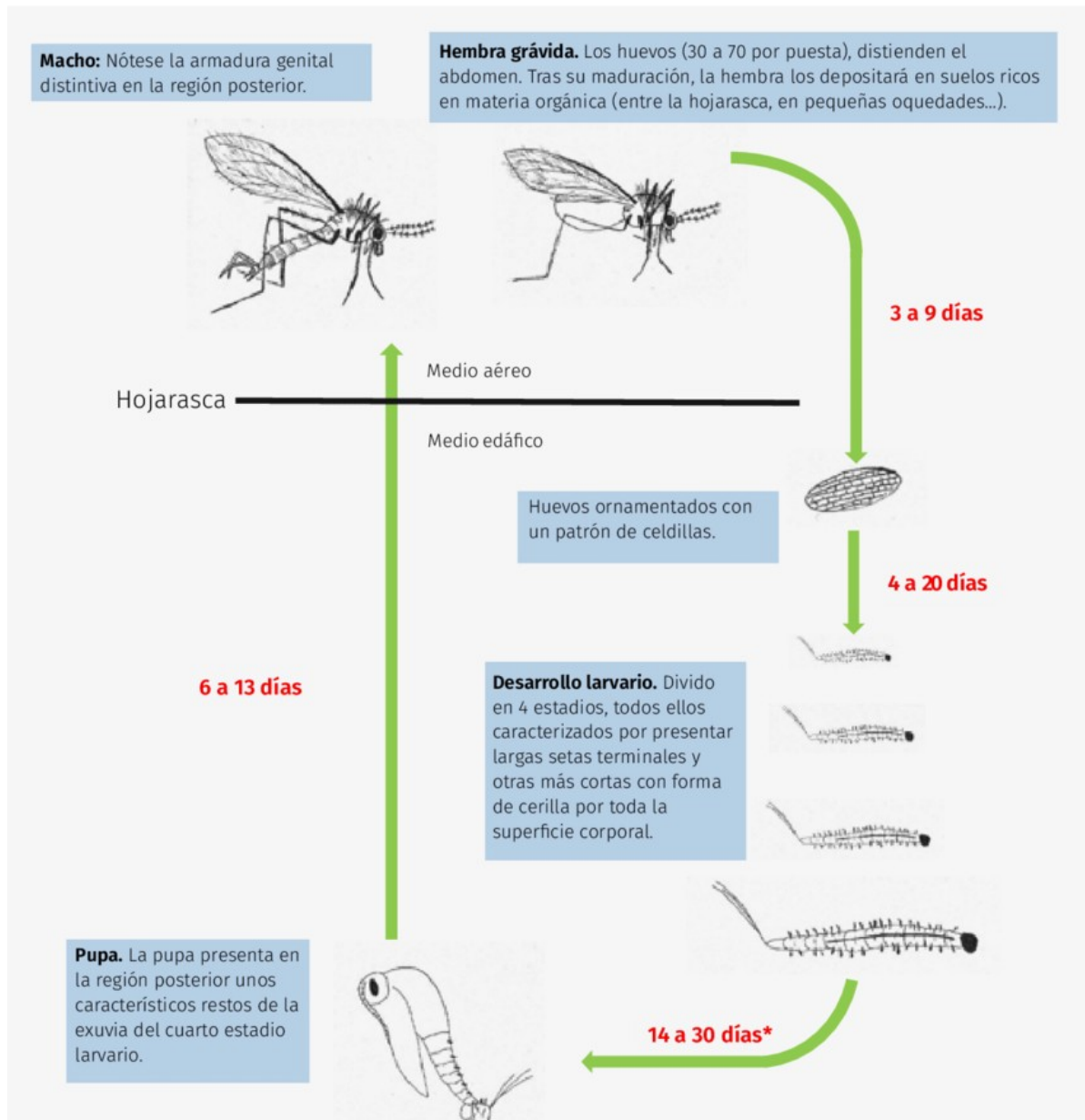


Figura 6: Cronología de la hembra de *Phlebotomo* spp. Fuente: slideshare.net

El parásito es endémico en cerca de 100 naciones⁵ y territorios, provocando cerca de 1 millón de casos en Humanos al año en todo el mundo y alrededor de 100.00 muertes anuales. La enfermedad tanto humana como animal está desatendida en muchos lugares del mundo con climas tropicales o subtropicales, incluyendo países tanto al norte como al sur del Mediterráneo, estando España, Portugal, Italia y Grecia entre los más afectados⁵. Por sus características orográficas y climatológicas, la franja costera de la provincia de Málaga presenta condiciones excepcionales para la supervivencia y reproducción del vector, y cuenta con un nutrido número de reservorios disponibles entre perros y gatos, siendo prácticamente innecesaria la aportación de reservorios desde el ciclo salvaje.

1.4. HOSPEDADORES

1.4.1. Hospedador principal

En el Viejo Mundo³ se ha considerado a los cánidos en general y al perro en particular (Figura 7), como el hospedador principal y reservorio por excelencia del parásito, tanto en entornos silvestres como urbanos o periurbanos.



Figura 7: Reservorio principal, perro. Fuente propia
Algunas razas como el Podenco Ibicenco han desarrollado una resistencia racial a la infección clínica.

La población de cánidos salvajes en la zona de Málaga se reduce a los ejemplares de zorro (*Vulpes vulpes silaceus*) (Figura 8). En cambio, el cánido salvaje por excelencia, el Lobo ibérico (*Canis lupus signatus*), se encuentra extinto desde hace más de un siglo; la provincia sólo cuenta con los ejemplares alojados en parques zoológicos y reservas naturales como Lobopark® en Antequera, cuyos ejemplares no han podido ser estudiados a fondo.



Figura 8: Zorro con su presa habitual, un lagomorfo, que también es reservorio de *L. infantum*.
Fuente Federación Andaluza de Caza.

Por lo tanto, los reservorios salvajes se reducen a los zorros y a los perros asilvestrados, de los que hay una población desconocida ya que cada año, numerosos

animales son abandonados o se pierden y sigue habiendo una cantidad indeterminada de perros sin identificar ni censar.

1.4.2. Hospedadores secundarios

Hasta ahora, se ha considerado al gato doméstico⁶ (*Felis catus*) como reservorio secundario del parásito y, aunque aún no hay estudios que demuestren cuál es la capacidad transmisora, sí que es conocido el hecho de que los gatos mantienen el ciclo del parásito no estando claro si pueden mantenerlo sin la presencia de cánidos, lo que sí es sabido⁷, es que los *Phlebotous pp.* se alimentan indistintamente de perros o gatos (no tienen preferencia por una u otra especie) lo que ha quedado demostrado por estudios de ADN realizados tanto en vectores como en reservorios, hallándose las mismas estirpes genéticas de los parásitos tanto en tejidos de los perros y gatos como sobre la mucosa digestiva de los dípteros.

Los gatos pueden llevar el parásito en sus órganos internos⁸ durante un periodo de tiempo indeterminado. Queda aún por descubrir si la cantidad de parásitos circulantes y la carga parasitaria de cada picadura del vector llega a la cantidad infectiva mínima necesaria para ser considerado portador efectivo.

Siempre se han considerado altamente resistentes a la enfermedad, entre otras cosas porque muestran una titulación⁹ de anticuerpo anti-leishmania en sangre muy baja cuando están infectados (Figura 9), demostrando dicha infección a través de pruebas PCR de diversos tejidos o por observación directa del parásito en tinciones de muestras de lesiones sospechosas. Pese a todo, aún faltan estudios que avalen su papel como reservorio de la enfermedad.



Figura 9: Lesión ulcerosa en un gato cuyas pruebas serológicas cuantitativas resultaron negativas. Fuente propia.

La enfermedad clínica ha estado asociada casi en todas las ocasiones a otras enfermedades concomitantes (Figura 10) como las producidas por los retrovirus felinos¹⁰ más comunes (Leucemia Felina, Inmunodeficiencia Felina, Coronavirus Entérico), así como otras enfermedades que causen debilidad del sistema inmune e incluso parasitosis como Toxoplasmosis.



Figura 10: Cría de gato de 45 días que presentó de forma comórbida PIF (Peritonitis infecciosa felina por Coronavirus entérico). Fuente propia.

Algunos autores proponen que, en base a las pruebas obtenidas de la alimentación del vector, los gatos sean considerados como un reservorio adicional de *Leishmania Spp.*

El brote ocurrido en Fuenlabrada^{11, 12} en 2012, del que todavía siguen detectándose casos tardíos, puso de manifiesto que las liebres silvestres (*Lepus europaeus*), son reservorios efectivos si se encuentran suficientes animales infectados y pueden suponer un reservorio competente para infectar vectores que transmitan el parásito a las poblaciones humanas adyacentes. Hasta ese momento, eran consideradas reservorio salvaje secundario, pero su alta densidad de población cerca de un núcleo urbano desembocó en un brote, sin que los cánidos tuviesen un papel desencadenante.

1.4.3. Hospedadores casuales

Cualquier mamífero⁵ puede ser objeto de la picadura del vector, a partir de la cual puede que desarrolle la enfermedad o quedar como portador efectivo. Mustélidos salvajes y domésticos pueden cursar con signos clínicos, en cuyo caso la carga parasitaria presente en piel y sangre podría ser infectante para el vector. Se han descrito casos de Hurones³⁰ domésticos con la enfermedad clínica en España, pero los datos de prevalencia son actualmente desconocidos.

1.4.4. Hospedador humano

Se trata, según la OMS⁵, de una enfermedad ligada a la pobreza, a estados de desnutrición y a desplazamientos de población. En países desarrollados, suele estar ligada a estados de inmunosupresión o debilidad inmunológica como pacientes de cáncer, trasplantados, con tratamientos crónicos inmunosupresores o enfermedades autoinmunes entre otras. Cerca de un millón de personas resultan infectadas cada año en todo el mundo, aunque no todos desarrollan la enfermedad.

Los cambios drásticos del medio ambiente como la deforestación, el regadío y la urbanización descontrolada incrementan los riesgos de la aparición de brotes. El incremento progresivo de temperaturas que está sufriendo nuestro territorio, según el Plan de Prevención de Temperaturas de la AEMET para 2020, es otro factor que influye en la distribución geográfica y temporal del vector.

a. Principales factores de riesgo⁵ para los seres humanos:

- **Condiciones socioeconómicas:** La pobreza, el alojamiento en infraviviendas (Figura 11), saneamientos insuficientes en las casas, carecer de alcantarillado y condiciones de hacinamiento (como barriadas de infraviviendas en nuestro país) atraen a los vectores.



Figura 11: Barriada de los Asperones, Málaga. Fuente: Diario Sur.

- **Malnutrición:** Las dietas bajas en proteínas o con escaso contenido calórico, los déficits de hierro, las hipovitaminosis (vitamina A) y carencias de minerales como el zinc son factores que influyen en una mala respuesta a la infección y facilitan la progresión a enfermedad clínica. Países desarrollados como el nuestro no son ajenos a que un pequeño porcentaje de la población pueda sufrir de una malnutrición que, sin llegar a los extremos de los países subdesarrollados, sí que sigue siendo un problema que no se ha conseguido erradicar en su totalidad.
- **Movilidad de la población:** Las epidemias de las formas cutánea y visceral a menudo se asocian con la migración y el desplazamiento de personas no inmunizadas a zonas donde ya existen ciclos de transmisión. En este sentido, las formas más agresivas las

podemos encontrar en personas que han viajado a lugares endémicos o migrantes procedentes de esos lugares. Otros factores de riesgo que siguen siendo importantes son la exposición en el trabajo (ganaderos, veterinarios, agricultores, son profesiones donde el riesgo es mayor) y el aumento de la deforestación.

- **Cambios ambientales:** Los cambios en el entorno afectan tanto a los hospedadores (domésticos y salvajes) y a su relación con el vector. La entrada en zonas boscosas en forma de neourbanización desequilibra el ecosistema y facilita el incremento de vectores.
- **Cambio climático:** La leishmaniasis es, sin duda, una de las enfermedades reemergentes más sensible a los cambios en la climatología y afecta en varios aspectos a su epidemiología:
 - El incremento general de las temperaturas incide en el tiempo de actividad del vector, así como su alcance, tanto en latitud como en altitud. La actual tendencia a manifestaciones de clima extremo donde, o no hay precipitaciones, o estas son torrenciales, también favorece la proliferación del vector (Figuras 12 y 13). Estos cambios también influyen en los hospedadores salvajes, alterando su hábitat y al favoreciendo movimientos por el territorio, lo que les acerca a las poblaciones humanas o a los hospedadores domésticos.

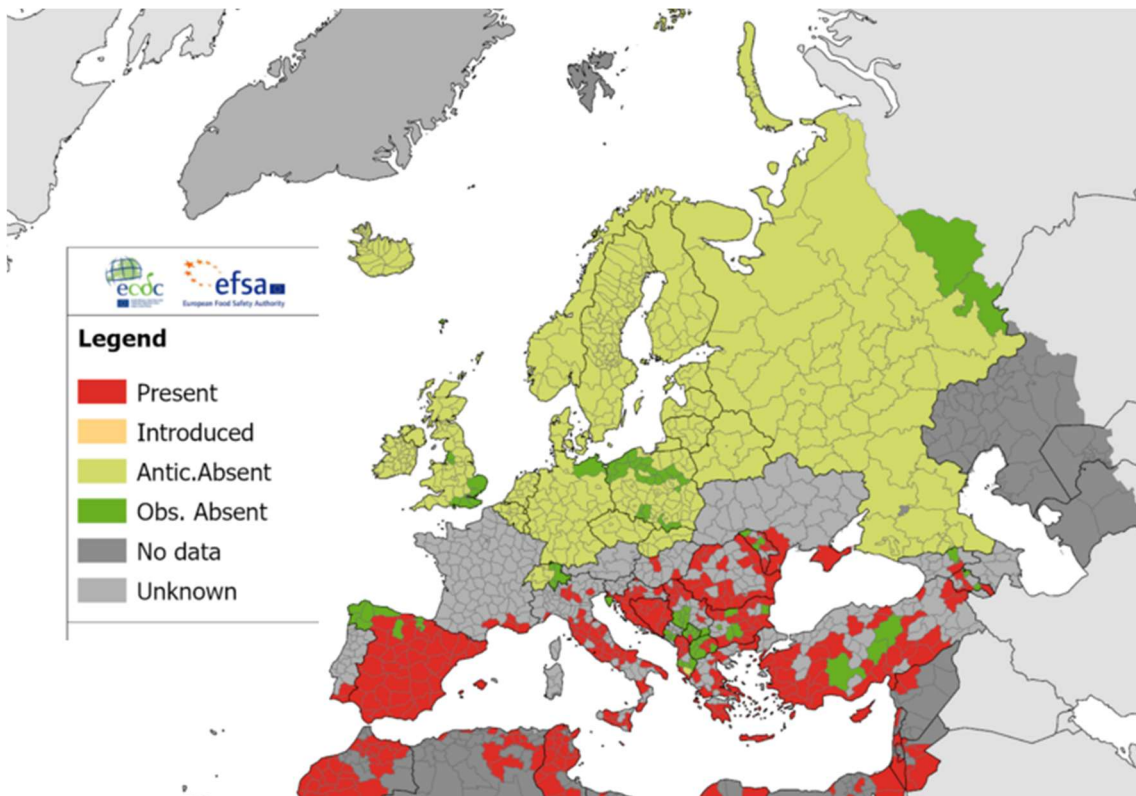


Figura 12: Distribución de *Phlebotomus papatasi* en 2023, FUENTE: European Centre for Disease Prevention and Control

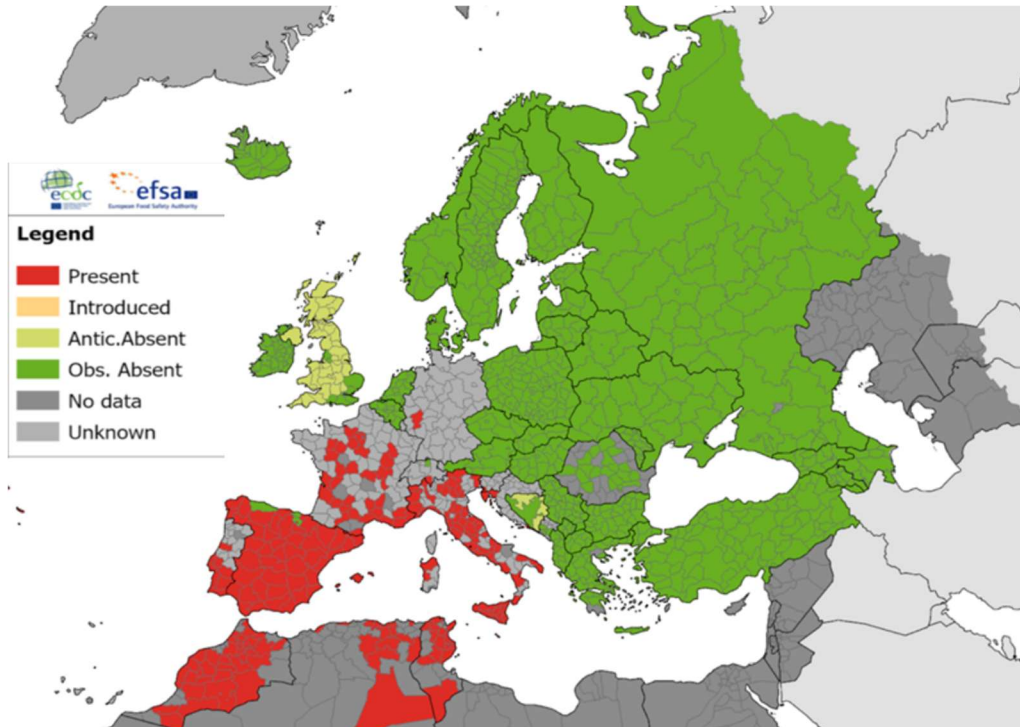


Figura 13: Distribución de *Phlebotomus perniciosus* en 2023.
Fuente: European Centre for Disease Prevention and Control

- Las pequeñas **fluctuaciones** en la **temperatura** pueden tener un efecto acusado en el ciclo de desarrollo de los promastigotes de *Leishmania* en los flebótomos, y permitir que el parásito se transmita en zonas donde la enfermedad no era previamente endémica.

b. Coinfección por *Leishmania infantum* y VIH

Los pacientes que presentan coinfección por *L. infantum* y VIH¹³ tienden a mostrar una sintomatología más intensa de la enfermedad y tanto las recidivas como la mortalidad se ven incrementadas. Afortunadamente, en los últimos años, los tratamientos a base de antirretrovirales han frenado estos inconvenientes y mejorado las expectativas de supervivencia de los pacientes. Según datos de la OMS, en 2021, esta coinfección se notificó en 45 países (Figura 14). España, pese a presentar un bajo número de notificaciones, es uno de los países afectados.

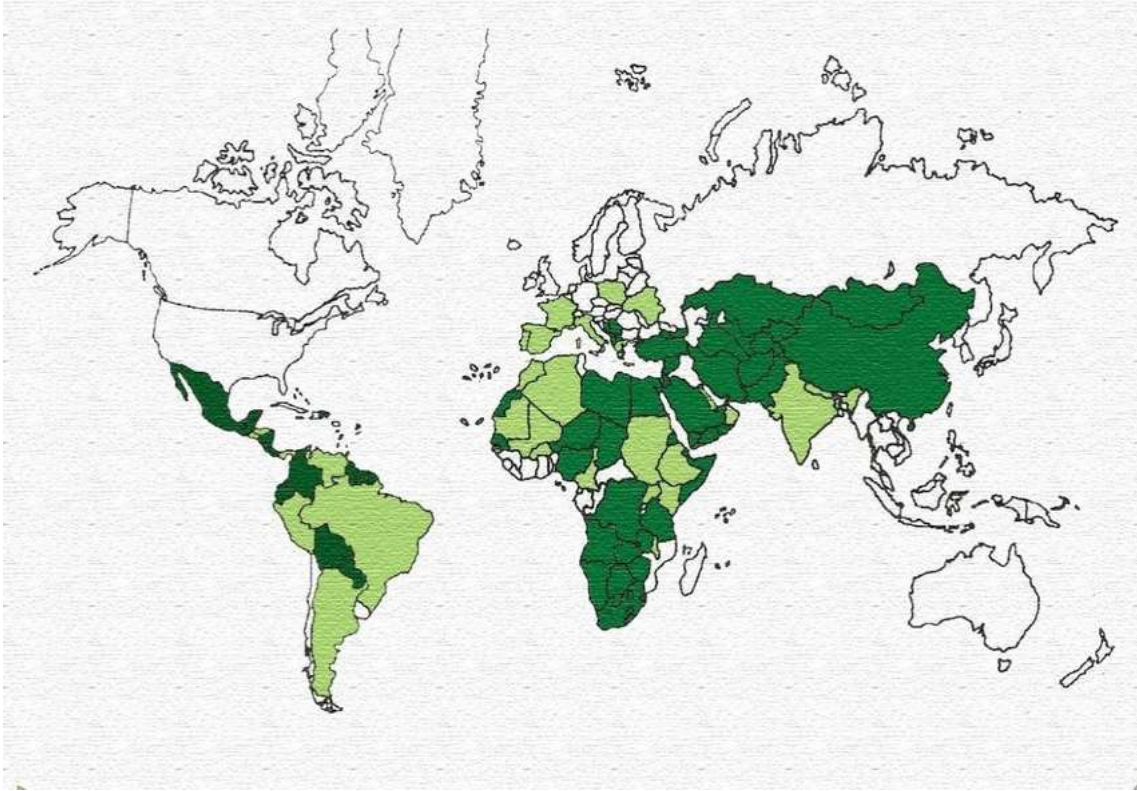


Figura 14: Distribución de coinfección VIH y Leishmania spp. en el mundo. En verde intenso lugares donde el SIDA está asociado a Leishmaniosis con mayor frecuencia, en verde claro países donde el riesgo es menor, en blanco donde el riesgo es mínimo o no se tienen datos. Fuente researchgate.net

2. PREVENCIÓN Y CONTROL

La prevención y el control requieren de un buen conocimiento de la enfermedad, su epidemiología, sus mecanismos fisiopatológicos y sus agentes implicados. Las Instituciones Sanitarias, las autoridades competentes y los propios pacientes, los propietarios de mascotas, el personal sanitario, incluyendo a los veterinarios; todos deben aportar su esfuerzo en el control de la enfermedad.

2.1. Desde la OMS

Con el fin de ayudar en la lucha contra esta zoonosis, la OMS²⁷ plantea una serie de estrategias:

- **Diagnóstico temprano** y la **atención rápida** y efectiva de los casos disminuyen la incidencia, evitan que ésta avance hasta provocar discapacidades, además, reducen el número de muertes. Este mismo criterio, aplicado a los reservorios ayuda a reducir la transmisión y a controlar la propagación y la carga de la enfermedad. Actualmente hay fármacos muy eficaces y seguros contra la leishmaniasis, especialmente contra la forma visceral, aunque su uso puede resultar difícil. El acceso a estos medicamentos está cubierto en todos sus casos por la Seguridad Social en el caso de las personas y ha visto reducido su precio en los últimos años en el caso de los animales.
- La **lucha anti-vectorial** ayuda a reducir o interrumpir la transmisión de la enfermedad porque reduce el número de vectores. Entre los métodos de control figuran los insecticidas en aerosol, los mosquiteros tratados con insecticida, la gestión del medio ambiente y la protección personal.
- La **vigilancia** eficaz de la enfermedad es importante para su monitorización oportuna y la adopción de medidas durante las epidemias y las situaciones en las que hay una elevada tasa de letalidad a pesar del tratamiento.
- El **control de los reservorios animales** resulta complejo y debe adaptarse a la situación local.
- **Movilización social** y fortalecimiento de las alianzas – la movilización y la formación de las comunidades con intervenciones eficaces para modificar las pautas de comportamiento deben adaptarse siempre al ámbito local. Las alianzas y la colaboración con diferentes partes interesadas y otros programas de lucha contra enfermedades transmitidas por vectores son esenciales a todos los niveles.

Para abordar estos planteamientos, la **respuesta de la OMS** se traduce en una labor directiva y coordinadora que engloba las siguientes pautas y estrategias:

- Ayudar **económicamente** y prestar **soporte técnico** a los países que tengan programas nacionales de lucha contra la leishmaniasis, se les presta asistencia en la elaboración y actualización de directrices y planes de lucha, promoviendo los sistemas de vigilancia sostenibles y eficaces, además de elaborar sistemas de preparación y respuesta ante epidemias; España sigue los planes de la OMS.
- **Supervisión** de las tendencias epidemiológicas y **evaluación** del impacto de las actividades de lucha contra la enfermedad puestas en marcha, lo cual ayuda a sensibilizar, a promover la reducción de la carga mundial de la enfermedad y a fomentar el acceso equitativo a los servicios de salud; España sigue y colabora con estas medidas de forma activa, tanto desde instituciones públicas como el Centro Nacional de Microbiología (Sede en el Instituto de Salud Carlos III) como privadas.
- **Elaborar normas** para que los países afectados las apliquen, diseña estrategias de ámbito político, basadas siempre en la evidencia científica, para la prevención y la lucha contra la leishmaniasis. También se encarga bajo colaboración de las autoridades implicadas en la vigilancia de su aplicación.
- Favorecer la **colaboración y coordinación** entre las partes interesadas; España es un actor importante en esta lucha.
- La Promoción de la **investigación** sobre los medios para luchar eficazmente contra la leishmaniasis, que incluye soporte técnico, económico, los medicamentos, las herramientas de diagnóstico y las vacunas.
- **Apoyo** a los programas nacionales de lucha contra la leishmaniasis, a fin de garantizar el **acceso a medicamentos** de calidad garantizada.

2.2. Su aplicación en España

La leishmaniosis es una **enfermedad de declaración obligatoria (EDO)** en todo el territorio desde 2015 a través de la Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica (RENAVE). Los objetivos son conocer su distribución temporal y espacial, describir la epidemiología de los casos autóctonos y conocer la calidad de las notificaciones²⁸.

Entre 2005 y 2017 hubo una media 141 casos/año, hubo picos en 2011 y 2012 debidos principalmente a la Comunidad de Madrid. Excluyendo los casos de la Comunidad Autónoma de Madrid (Brote Fuenlabrada) la evolución observada fue más estable, con tendencia ascendente desde 2012.

La tendencia ascendente de notificación de leishmaniasis observada en los últimos años es probablemente multifactorial. La enfermedad se distribuye por todo el país durante todo el año, con regiones y épocas de mayor riesgo. El grupo de mayor riesgo son niños menores de 5 años. Existe amplio margen de mejora en la calidad de la información.

Las medidas de prevención se centran en evitar la exposición al vector, el diagnóstico precoz y el manejo adecuado de los casos, tanto de humanos (Tabla 1) como de animales domésticos que actúen como reservorio y medidas de control del vector y del reservorio zoonótico.

Año del caso	2014	2015	2016	2017	TOTAL	Tasa período
Andalucía	20	28	27	32	107	0,32
TOTAL	298	328	356	377	1359	0,76

Tabla 1: Número de casos autóctonos y tasas de incidencia de leishmaniasis. Fuente: RENAVE.

No existe vacuna comercializada para humanos, pero sí frente a la leishmaniasis canina, aunque su eficacia es aún controvertida.

Los casos se distribuyeron durante todos los meses. Se observa que todos los años se mantiene un aumento del número de casos en el mes de enero, y otros dos picos de menor magnitud que fluctúan según el año entre mayo-julio y agosto-noviembre.

En cuanto a su distribución poblacional, los factores de riesgo más importantes son ser hombre de la tercera edad o en ambos sexos adultos por encima de los 50 años (Tabla 2).

Variable		L visceral		L cutánea/ Mucocutánea		No concretado		Total	
		N	%	N	%	N	%	N	%
SEXO	Mujer	230	34,9	265	42,8	33	41,2	528	38,8
	Hombre	429	65	354	57,2	47	58,8	830	61,1
EDAD	<1 año	65	9,9	36	5,8	4	5	105	7,7
	infantil (1-15 años)	113	17,1	100	16,2	13	16,2	226	16,6
	adultos (16-64 años)	331	50,2	323	52,2	52	65	706	51,9
	ancianos (> 65años)	151	22,9	160	25,8	11	13,8	322	23,7
Estado	Confirmado	642	97,3	572	92,4	73	91,3	1287	94,7
	Probable	18	2,7	47	7,6	7	8,7	72	5,3
Hospitalización	No	21	3,2	254	41	3	3,7	278	20,4
	Sí	381	57,7	28	4,5	9	11,3	418	30,8
	No aclarado	258	39,1	337	54,5	68	85	663	48,8
Fallecimiento	No	321	48,6	230	37,2	6	7,5	558	41
	Sí	20	3	2	0,3	0	0	22	1,6
	Sin datos	319	48,3	387	62,5	74	92,5	780	57,4

Tabla 2: Distribución de casos autóctonos de leishmaniasis según categoría clínica de 2014 a 2017. Fuente: RENAVE.

Pese a toda esta información, la enfermedad sigue estando infradiagnosticada y la información epidemiológica es escasa. Desde 2014 ha seguido un patrón ascendente,

aún falta por conocer el comportamiento que ha tenido durante la pandemia. Está claro que su inclusión en la lista EDO ha facilitado el seguimiento epidemiológico. Otro factor para tener en cuenta es la detección de nuevos reservorios³⁰ hasta ahora poco conocidos. En algunos casos estos han proliferado debido a cambios medioambientales, incrementando el riesgo para la población susceptible, como es el caso de los gatos y las liebres (brote de Fuenlabrada de 2012).

La estacionalidad de la leishmaniasis es directamente proporcional a la del vector, cuyo periodo de actividad abarca de junio a septiembre, aunque esto puede variar debido a la situación geográfica, sobre todo por los factores ambientales. Otro aspecto para tener en cuenta es el período de incubación. Según estudios del ISCIII, hay un repunte de la enfermedad en el mes de enero que se ha achacado a su largo periodo de incubación, pero no se puede obviar el incremento del tiempo de actividad del vector a causa de las variaciones provocadas por el cambio climático que ha aumentado el tiempo, la altitud y la latitud de la actividad del vector. Hay dos picos de alta casuística que se consideran dentro de la normalidad, que son los de mayo a septiembre se corresponderían con los meses de mayor densidad de vector, y que se corresponden a las manifestaciones de las formas cutánea y mucocutánea.

Según la información aportada por el conjunto mínimo básico de datos de registros hospitalarios de España, hay una distribución repartida por toda la geografía peninsular, siendo toda la Costa Mediterránea el área geográfica que presenta la mayor incidencia, lo que se achaca a que la cantidad de vectores es muy alta y la bonanza climática favorece su proliferación.

Esta misma fuente de datos, ya con respecto a los hospedadores humanos, confirma que la tendencia es similar a la que hay en otros países del entorno del Mediterráneo en su franja Norte, siendo varones adultos y niños menores de 5 años los que mayor frecuencia presentan.

Con respecto a los datos de perros infectados en España²⁹, los últimos estudios recopilados por el ISCIII señalan unas prevalencias muy variables, estando Málaga dentro del nivel 26-35%, sólo por detrás del sur de Galicia y las Islas Baleares.

Con respecto a la prevalencia en humanos, Valencia y Madrid son las dos CCAA con mayor prevalencia en los últimos años y Asturias la de menor prevalencia, Andalucía se encuentra en el rango por encima de 3.8 casos por millón de habitantes, donde se han contabilizado sólo de casos declarados a la Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica (Figura 15).



Figura 15: Incidencia de casos en España en 2018 y 2020. Fuente: Red RENAVE

Atendiendo a la situación a principios de 2020, de los casos declarados en perros y los publicados en personas, Málaga es una de las provincias con una alta incidencia tanto en cánidos como en Humanos, en nuestra provincia se cumple la correlación entre reservorio animal y Humano. Estos datos hay que tomarlos con cautela, puesto que, tanto en una especie como en la otra, la enfermedad está infradiagnosticada y en el caso de los cánidos, infradeclarada, pese a su obligatoriedad

2.3. Situación en Andalucía

La Junta de Andalucía^{19,34,35}, siguiendo las recomendaciones de la OMS, propone una serie de Medidas de Protección de la Salud pública basas en:

- **Detección precoz** e instauración temprana del **tratamiento** adecuado en los pacientes **humanos**, ya que estas dos medidas reducen la prevalencia de la enfermedad y previenen la discapacidad y la muerte.
- **Actuaciones sobre el reservorio**: Proteger a los perros contra la picadura del vector mediante el uso de productos repelentes e insecticidas tanto para evitar que perros sanos contraigan la enfermedad, así como que perros enfermos contaminen a nuevos vectores, interrumpiendo la cadena de transmisión.
- Recomienda encarecidamente el uso de **vacunas** que, pese a no evitar la infección, sí que ayuda a luchar contra la progresión de la enfermedad.
- La **eliminación de portadores** mediante la Eutanasia de los perros está descartada en Europa, principalmente por la presión social y porque es una medida que ya se ha aplicado en otros países y no ha dado resultados suficientes que justifiquen su realización. Por otro lado, la OMS sí que aconseja el sacrificio obligatorio de los perros vagabundos o asilvestrados y el tratamiento y

seguimiento por parte de los veterinarios de los perros con un propietario responsable. Este es un punto que ha sido obviado por las Autoridades encargadas de la vigilancia, control y seguimiento de dichas medidas.

- El **tratamiento** en los **perros** se basa en el uso de leishmanicidas con un leishmanioestático que reducen la carga parasitaria pero no eliminan completamente al agente, mediante el uso de fármacos inmunomoduladores en animales tratados y evitar que se incremente la carga.
- Por otro lado, el control de la prevalencia en perros no reduce completamente la posibilidad de infección, ya que siguen existiendo reservorios en la naturaleza que perpetúan el ciclo salvaje.
- Actuaciones sobre el **vector**: Se insta a los propietarios para que protejan periódicamente las viviendas y alrededores mediante el uso de sustancias insecticidas con acción residual, la colocación de pantallas protectoras (mosquiteras) con un diámetro de luz no superior a los 0.3mm, tanto en las viviendas, como en perreras y casetas de perros que vivan en el exterior.
- A los Organismos competentes (ayuntamientos, Mancomunidades, Diputaciones), se les conmina a optimizar la **gestión del medio ambiente** reduciendo los potenciales nichos ecológicos eliminando la materia orgánica en descomposición, evitando que se acumule basura o material orgánico (Figura 16).



Figura 15: Suelo de una explotación agrícola de mangos en Vélez Málaga. Fuente Agrovélez®.

Los municipios de la **Costa del Sol**⁶³ presentan un paisaje que está compuesto de grandes núcleos urbanos, pero con poca densidad de población, ya que la mayor parte está dominada por urbanizaciones y edificaciones que no suelen superar los 4 pisos de altura (construcción en "Pueblo Mediterráneo") y muchas zonas están urbanizadas a base de viviendas unifamiliares con grandes espacios ajardinados, parques y campos de golf.

En la **Comarca de la Axarquía**^{64,65}, sin embargo, aparte de los terrenos urbanos donde se asienta la población, también poco poblados (a excepción de la Capital, Vélez Málaga), las viviendas son en su mayoría de poca altura o unifamiliares y hay una gran dispersión de viviendas rurales por todo el territorio. El paisaje agrario está compuesto de explotaciones donde se intercalan los cultivos de secano con la explotación de frutales tropicales destacando las plantaciones de mangos y aguacates, cuyo aprovechamiento requiere de riego abundante y constante durante todo el año. Esto ha obligado a cambiar en la última década la clasificación original de suelos antrazonales áricos-cumúlicos-úrbicos por irrágricos-cumúlicos-órticos, ya que la ISSS-ISRIC-FAO considera que la implantación de riegos en periodos largos de tiempo, con aguas ricas en sedimentos ha incrementado la materia orgánica del suelo, con la presencia de abundantes deyecciones de lombrices y un 0.5% de CO lo que facilita un nicho ideal para el desove de las hembras del vector. Las zonas que conservan los cultivos tradicionales de secano, como son el olivo, el almendro y en menor medida las viñas de uva tanto para vino como para pasas, requieren de menos aporte de agua, pero se encuentran mezcladas geográficamente con las anteriores por lo que en toda la Comarca encontramos un clima cálido tropical, con un **ambiente artificial** que proporciona un alto nivel de **humedad** los primeros centímetros desde el suelo debido a los riegos y mucha materia orgánica disponible en el suelo, junto a zonas arenosas, sobre todo en las vegas como la de Vélez donde abundan los regosoles calcáreos y arenosos. Todos ellos tienen una alta capacidad de retención de agua y son arenas sueltas en los primeros cm de suelo unido al laboreo constante, donde el vector puede medrar fácilmente. ¿es esto un riesgo para la diseminación del parásito? La Hipótesis es que efectivamente, se están creando de manera artificial las condiciones ideales para la cría del vector.

Cabe resaltar que la actividad de los mosquitos en ambas comarcas es casi del año completo, debido al microclima que tiene la costa mediterránea, con una amplia franja costera con pronunciada pendiente hacia el norte, subiendo muchos metros por km hacia el interior. Esto provoca que el aire húmedo del mar, permanentemente bañado por el sol, se encuentre con una barrera montañosa que lo obliga a elevarse donde se enfría y vuelve a humedecer los picos más altos. En consecuencia, la zona posee un clima tropical, pero disfruta de gran cantidad de agua que es atrapada por las montañas y devuelta en forma de canales y depósitos subterráneos, recurso que es aprovechado por la población tanto para el riego agrario como al turístico y residencial.

2.4. Comorbilidades y Transmisión Diferida, exportación de portadores:

A la hora de plantear el estado epidemiológico de la leishmaniosis en la provincia de Málaga, no solo debemos atenernos a los hechos pasados y presentes en el territorio de nuestra provincia, sino a la futura evolución y, sobre todo y muy importante, cómo actúa nuestro territorio con respecto a la diseminación del parásito. Esto se justifica especialmente teniendo en cuenta que tanto la Costa del Sol como la comarca de la Axarquía y, en menor medida, pueblos del interior de la provincia, ostentan una marcada densidad demográfica de residentes extranjeros de otros países, principalmente la

Unión Europea y países vecinos. De todos ellos, aquellos pertenecientes la UE y Reino Unido cuentan con una considerable población residente y turística que viaja regularmente a sus países de origen o reciben visitas de familiares y amigos. El traslado y circulación de mascotas a través de la UE y entre Reino Unido y la UE, está sujeta a normas bastante laxas en cuanto a los requerimientos sanitarios, para la UE, hay libre circulación de personas y mascotas domésticas, siendo los únicos requerimientos la identificación mediante microchip, pasaporte identificativo y como tratamientos, únicamente inmunización contra la rabia y desparasitación frente a *Equinococcus granulosus*, lo mismo sucede entre Reino Unido y la UE, en ambos sentidos. No hay requerimientos específicos sobre la presencia de otras infecciones, sean o no zoonosis.

Muchos de estos residentes poseen mascotas con las que se mueven por el territorio europeo, a lo que se suma la enorme cantidad de adopciones internacionales que se producen desde Málaga hacia el norte de Europa a través de asociaciones mixtas españolas/extranjeras. Algunas, por propia iniciativa, realizan controles sanitarios de los animales exportados pero la mayoría no lo hace por los costes que esto implica y por ello la necesidad de descubrir si estamos actuando como foco de zoonosis, siendo la leishmaniosis el objetivo principal, y si estamos facilitando al parásito la colonización de nuevos territorios mediante un concepto que hemos querido titular como “Difusión Diferida Facilitada”. De una muestra total de 6472 perros acogidos en centros de adopciones y perreras municipales entre 2016 y 2022, 1303 perros de esos centros fueron testados para detectar infección por *L. infantum* siendo el resto de los animales procedentes de particulares y clínicas colaboradora, además de aquellos que quedaron fuera del estudio al aplicarse los criterios de exclusión.

El destino de esos animales fue adopción (en España o exportados fuera de nuestro país), eutanasia sanitaria, recogida por sus propietarios o continúan hoy en día en dichos centros (sobre todo las protectoras donde se aplica el “sacrificio cero”).

Durante el desarrollo de esta investigación, y como se ha comentado anteriormente, también se realizaron pruebas de detección de animales infectados con otras zoonosis vectoriales en nuestra provincia y el resto de la franja mediterránea. Los resultados del estudio completo indican que se está exportando un número importante de animales infectados a países donde no hay presencia del agente infeccioso. A esto hay que sumar que, en muchos de estos países, ya existen vectores competentes para la transmisión de dichos patógenos y, a consecuencia del cambio climático, es muy probable que, en los próximos años, vectores del sur colonicen nuevos territorios.

Las zoonosis vectoriales son enfermedades que los animales pueden transmitir a los seres humanos a través de insectos y ácaros parásitos que transmiten los microorganismos de un individuo a otro, siendo el Ser Humano un vertebrado susceptible de ser contagiado. Según la OMS, las enfermedades transmitidas por vectores representan más del 17% de todas las enfermedades infecciosas, y provocan cada año más de 700.000 defunciones, muchas de ellas evitables con las adecuadas medidas de prevención.

Dentro de estas medidas, se incluyen el conocimiento de sus ciclos, su patogenia, su epidemiología y la relación que hay entre ellas, formando parte del concepto “**ONE HEALTH**”, para establecer medidas de control previas al contagio, es decir, conocer la epidemiología para poder establecer las medidas de lucha en origen, antes de que llegue al ser humano. El control de vectores y el estudio de las enfermedades dentro de un enfoque multidisciplinar es de vital importancia para la lucha y erradicación de estas enfermedades. No podemos entender el ciclo vital de un parásito o una bacteria sin conocer al mismo tiempo el ciclo vital del artrópodo que la transmite, como tampoco podemos comprender, en su totalidad, los ciclos vitales del artrópodo si no entendemos la ecología del medio en el que habitan. De esta manera, médicos, veterinarios, biólogos, farmacéuticos, ambientalistas, deben trabajar en equipo para abarcar la totalidad del estudio de una zoonosis.

Incluidas en el Proyecto de respuesta mundial para el control de vectores 2017-2030 propuesto por la OMS , se enumeran las Actividades nacionales y regionales prioritarias y objetivos asociados para el periodo 2017–2022 en la implementación del proyecto de respuesta mundial para el control de vectores, el tercer pilar establece la necesidad del Fortalecimiento de los sistemas nacionales de vigilancia de vectores e integración con los sistemas de información sanitaria para guiar el control de vectores que supere el 75% para el año 2022. En la naturaleza, de forma habitual, la llegada de enfermedades vectoriales a nuevos territorios se produce de forma gradual y lenta al principio, ya que tanto el vector como el patógeno que transmite se encuentran con una población virgen la cual, con el tiempo, va viendo incrementado el número de portadores disponibles.

No obstante, se puede dar el caso de que un vector llegue a un nuevo territorio, ya sea de forma expansiva (desde territorios adyacentes) o artificial (medios de transporte humano), si se encuentra con un exonodo o núcleo de potenciales portadores/reservorios de la enfermedad ya infectados que se concentran en un punto geográfico determinado, procedentes de zonas donde la enfermedad sea endémica o esté muy extendida, este vector va a adquirir los patógenos de forma mucho más rápida y a diseminarlo por todo el territorio de manera más eficaz, en función de variables múltiples como son la cantidad de vectores disponibles y su capacidad de adaptación al nuevo ambiente, la cantidad de portadores disponibles, la densidad geográfica tanto de portadores competentes como de potenciales reservorios, la cercanía a territorios salvajes donde pueda encontrar reservorios que mantengan el ciclo salvaje de la enfermedad y los mecanismos fisiopatológicos de la enfermedad, sobre todo la velocidad con la que puede pasar de infectado a portador competente..

De esta manera, una zoonosis que, de forma natural podría tardar décadas o incluso siglos en extenderse por un nuevo territorio, podría llegar a diseminarse en pocos años o incluso provocar brotes localizados geográficamente cerca de esos exonodos en poco tiempo incluso meses, sobre todo si encuentra reservorios competentes aparte del suyo natural. Esto puede verse agravado si la población diana carece de defensas adaptativas frente a la enfermedad. Un claro ejemplo de esta relación se produce con

los movimiento migratorios y, si extrapolamos este factor al tránsito y tráfico de animales de compañía desde las zonas del Mediterráneo hacia el centro y norte de Europa, podemos encontrarnos que se estén creando exodonos de las principales zoonosis vectoriales del Mediterráneo en esos países, lo que representa un enorme riesgo para la población humana que cohabita con los portadores en el exonodo, además del peligro de convertirse en puntos de difusión de la enfermedad hacia los territorios adyacentes.

Con respecto a las otras zoonosis vectoriales con las que se va a comparar la Leishmaniosis, debemos señalar que las garrapatas también tienen una amplia permanencia que abarca prácticamente el año entero pudiendo constatarse que perros pueden presentar ecto-parasitosis en cualquier fecha del año (mucho más intensa en verano, pero presente todo el año).

En este estudio, marcamos como objetivo la presencia de determinados organismos patógenos capaces de llevar la enfermedad desde un animal doméstico muy próximo a las personas (como es el caso del perro) a los seres humanos de su entorno. Buscamos conocer cuáles son las zoonosis vectoriales más frecuentes en perros adoptados en la provincia de Málaga y las posibles relaciones que pueda haber entre ellas, con el objetivo final de entender sus interrelaciones y poder dar las recomendaciones adecuadas de control sanitario y de Salud Pública, tanto en España, como en sus países de destino mayoritario, Reino Unido y Alemania.

El cambio climático está ocasionando que los vectores competentes a la hora de transmitir estos patógenos, estén ocupando cada año nuevos territorios, cada vez más al norte y durante más tiempo al año. Hoy se ven dípteros y garrapatas en lugares donde antes no se detectaban. En las zonas donde sí habitaban, su tiempo de actividad se ha incrementado hasta el punto de que en algunas zonas su presencia es habitual a lo largo de todo el año, pudiendo vectorizar enfermedades de forma continua. Además, el proceso de globalización también está contribuyendo a transportar nuevas especies a otros asentamientos, a veces incluso en otros continentes, siendo posible que tanto patógenos como vectores encuentren en estos nuevos territorios nichos ecológicos donde prosperar y nuevos hospedadores a los que adaptarse e infectar.

Estas enfermedades son conocidas por los países del Norte de Europa como “Zoonosis Vectoriales del Mediterráneo”. Esta denominación proviene, al mismo tiempo, de la alta seroprevalencia unida a la gran cantidad de perros de la costa norte mediterránea que son exportados para su adopción a países del Norte de Europa. Muchos de estos canes han resultado ser portadores inaparentes, cuando no directamente enfermos de algunas de estas zoonosis o incluso varias al mismo tiempo, generando un problema a los veterinarios de dichos países que se han encontrado con sintomatologías desconocidas en su zona de influencia y han debido contemplar en sus diagnósticos diferenciales patologías que antes no veían. Por ello piden cada vez con mayor insistencia a las asociaciones que importan dichos perros que sus delegados en la zona mediterránea realicen controles para estas enfermedades. Algunos veterinarios en Reino Unido y norte de Europa han mostrado su preocupación por la creciente importación de portadores no testados. Por desgracia, no todas las asociaciones cuentan

con los medios económicos para realizar exámenes exhaustivos o simplemente carecen de los conocimientos necesarios para entender la importancia de las zoonosis, por lo que encontramos desde perros enviados sin ninguna clase de prueba previa, pasando por aquellos que son testados por serología cualitativa (inmuncromatografía indirecta) realizada por personal no cualificado y, llegando finalmente a canes con serologías cuantitativas, hemograma, bioquímica y proteínogramas, que son los sujetos en los que se va a centrar este estudio, recolectando muestras de sujetos de varias asociaciones asentadas en la provincia de Málaga, que envían a sus animales a países del norte europeo (mayoritariamente Alemania) y Reino Unido.

Con los datos obtenidos de la interacción y coinfección de otras zoonosis vectoriales, los de leishmaniosis y sabiendo el destino de estos animales, podemos obtener una valiosa información del flujo de potenciales portadores que están siendo alojados en un nuevo nicho ecológico virgen para estos patógenos. Los datos obtenidos corresponden sólo a una pequeña parte de los animales que se están enviando fuera de nuestras fronteras, otras asociaciones de la provincia y del resto de la Costa Mediterránea, envían ingentes cantidades de animales y no todos los animales son previamente controlados. Podemos asegurar que estamos proporcionando las condiciones ideales para la creación de nuevos exodonos desde los que los vectores puedan colonizar estos territorios en lo que podría llamarse una **“transmisión diferida facilitada”**, un concepto a tener en cuenta para todas aquellas enfermedades infecciosas (zoonosis o no, vectoriales o no) que aprovechando la Globalización, los movimientos migratorios y sobre todo, la falta de conocimiento, prevención y control de las enfermedades emergentes, pueden crear una situación sanitaria que amenace la Salud Pública en toda Europa.

Los movimientos incontrolados, la falta de información sobre los reservorios importados y exportados, suponen un riesgo para la Personas que es inasumible hoy en día en una sociedad avanzada como la nuestra.

Las zoonosis parasitarias vectoriales del Mediterráneo son, por orden de importancia desde el punto de vista de las asociaciones: Leishmaniosis, Ehrlichiosis, Anaplasmosis, Filariosis y Bebesiosis. Se ha incluido un pequeño grupo de animales en los que se ha realizado una cata preliminar para detectar *Rickettsia conorii*, ya que en los últimos dos años se ha detectado un incremento de esta especie en los perros de Málaga.

Principales vectores que encontramos en la zona Sur de España, en la costa mediterránea.

- a. Mosquitos: Diversas especies de los géneros *Aedes*, *Anopheles*, *Culex*, *Phlebotomidae*. Dentro de todos ellos, fijaremos nuestra atención en aquellas especies competentes a la hora de transmitir los parásitos *Leishmania infantum* y *Dirofilaria immitis*.

Los géneros *Aedes*, *Anopheles* y *Culex* son competentes en el mantenimiento y transmisión de *Dirofilaria immitis* en toda la costa Mediterránea, y su presencia ha sido detectada en varios puntos de Europa, subiendo cada vez más al norte las zonas con presencia de alguno de ellos. El género *Phlebotomidae* es endémico de la costa Mediterránea y año tras año, está colonizando nuevos territorios hacia regiones más septentrionales. Además, en las zonas donde ya se detectaban, el tiempo de actividad cada vez es mayor debido a las altas temperaturas en los meses de primavera y otoño. La OMS augura la presencia de todas estas especies en nuevos territorios en los próximos años, estando Reino Unido y Alemania dentro de la franja geoclimática en la que el incremento de las temperaturas proporcionará un nicho ecológico positivo en la que los flebótomos puedan medrar.

- b. Garrapatas. Hay diversas especies, pero desde el punto de vista de la relación humanos-perros cobran especial relevancia aquellas capaces de actuar como vector competente para *Babesia canis*, *Ehrlichia canis*, *Anaplasma phagocytophilum* y *Rickettsia conorii*.
- *Ixodes ricinus* transmite *Anaplasma Spp* y *Babesia canis*.
 - *Rickettsia conorii*, fiebre botonosa, la transmite *R. sanguineus* siendo su principal vector para Europa.

3. CLÍNICA

3.1. Contagio

En todas las especies, humanos, perros y gatos, se produce a través de la picadura de una hembra de *Phlebotomo spp.* El desarrollo de la infección es muy similar en perros y seres humanos, siguiendo patrones parecidos tanto en la respuesta inmune como en la patogenia y las lesiones provocadas. En gatos se encuentra aún en estudio, pero parece ser que los felinos tienen una resistencia natural al parásito y que enfermedades como las infecciones por retrovirus felinos¹⁰ pueden desencadenar una respuesta incorrecta y dar lugar a infección clínica. Sin embargo, sí que pueden permanecer infectados sin mostrar signos de enfermedad clínica por largo tiempo, manteniendo los parásitos en tejidos como bazo o ganglios linfáticos.

En otras partes del mundo^{5,18}, la especie de *Leishmania* tiene especial importancia, tanto para el curso de la enfermedad como en la presentación de brotes, pero en el sur de Europa, hasta el momento, solo se presenta *Leishmania infantum*. En cuanto al factor hospedador, en países subdesarrollados, es menos relevante puesto que en las zonas geográficas de alta incidencia, la mayor parte de la población vive en condiciones de subdesarrollo mientras en Europa, este factor sí adquiere relevancia porque la población presenta en general un sistema inmune competente y los casos de fallo en la defensa contra *Leishmania* van asociados a estados de inmuno-compromiso.

Nos obstante, el brote que se originó en 2012 en el municipio de Fuenlabrada¹¹ ha evidenciado que una alta densidad de reservorios infectados puede elevar el riesgo de contraer la infección (Figura 17) si se producen numerosas picaduras con alta carga parasitaria en periodos cortos de tiempo.



Figura 167: Lesión ulcerosa única en paciente humano.
Fuente-M. Aguado. *Actas Dermo-Sifiliográficas*.

Tanto en la especie humana como en la canina está descrita la transmisión vertical de madre a hijo a través de las envolturas fetales, tanto en la perra como en la gata, la placenta es de tipo epiteliocorial con distribución zonal a modo de banda rodeando todo el saco embrionario, disposición característica de los carnívoros. Este tipo de placenta presenta una erosión total de las dos capas más superficiales del endometrio, el epitelio endometrial y el intersticio, de forma que las células epiteliales coriónicas entran en contacto directo con los capilares de la madre. Aunque los macrófagos pueden atravesar casi cualquier tejido, tanto la barrera hematoencefálica como placentaria suele estar más restringida al libre paso de células o moléculas. Dado que los monocitos circulantes quedan a tan solo una capa de los tejidos embrionarios, el paso de alguno parasitado a los tejidos del feto no debería ser extraño y este hecho está respaldado por la notificación de fetos y neonatos infectados vía materna en la especie canina, siendo la hipótesis aplicable a los gatos, que poseen el mismo tipo de placenta, tanto a nivel morfológico como histológico.

3.2. Mecanismos de defensa del hospedador

Cuando un nuevo hospedador recibe la picadura de una hembra de flebótomo spp., los promastigotes metacíclicos se introducen en la piel^{1,2} y son detectados por el sistema inmune del nuevo hospedador. En este momento pueden desencadenarse dos tipos de reacción inmunológica, la conocida como “defensa humoral” que no es efectiva y acaba en el desarrollo de síntomas clínicos y la “defensa celular” en la que el sistema inmune logra contrarrestar de forma efectiva la invasión.

a) Vía humoral Th2.

Si son los **Linfocitos Th2** los que se activan, la producción de citocinas se desplaza hacia las interleucinas cuatro y diez (IL4, IL10) y el factor de Crecimiento Beta (TGF- γ). Estas citoquinas activan al **macrófago M2** que no tiene capacidad leishmanicida, es más, pueden producir **poliamidas** que favorece la multiplicación y el crecimiento de los parásitos. A todo este efecto inmunitario se suma que se forman numerosísimos complejos inmunes típicos de la **reacción de hipersensibilidad tipo III**, que se depositan en vasos sinoviales, glomerulares o hepáticos, lo que causa fallo en estos órganos. También pueden unirse a los eritrocitos y leucocitos circulantes provocando o empeorando estados de anemia, leucopenia y trombocitopenia.

También se va a producir una **reacción de hipersensibilidad de tipo II** que provoque síntesis de anticuerpos con actividad autoanticuerpo, lo que desemboca en enfermedades autoinmunes concomitantes como anemias hemolíticas, trombocitopenias inmunomediadas. En niveles más graves de la enfermedad, se sintetizan anticuerpos frente a proteínas propias del organismo hospedador

b) Vía celular Th1: El organismo se enfrenta al parásito mediante una respuesta adaptativa celular con la aparición de:

- **Linfocitos CD4+** tipo Th1, que son productores de citocinas activadoras de macrófagos, los cuales son capaces de eliminar las formas parasitarias. Las citocinas producidas son las interleucinas uno y doce (IL-2, IL-12) y el interferón gamma (IFN- γ).
- Los linfocitos **T CD8+ citotóxicos** y **células NK** que destruyen las leishmanias mediante el uso de radicales oxigenados como el óxido nítrico.

3.3. Diseminación

a) Linfática:

Desde el punto de picadura¹ o chancro de inoculación los amastigotes viajan al ganglio regional en el que medran y dispersan nuevos parásitos al resto del sistema linfático, una vez llegan a médula ósea, la diseminación es mucho más rápida.

b) Sanguínea

Partiendo del punto inicial o desde ganglio¹ o médula ósea, los amastigotes llegan a la sangre donde viajan intracelularmente saliendo solo para infectar nuevas células.

3.4. Patogenia

Según la especie hospedadora, hay una tendencia a clasificar la enfermedad o por su forma de presentación¹ (Humanos) o por su gravedad¹⁵ (cánidos). Todas ellas se han descrito tanto en Humanos como en reservorios; no obstante, en el ámbito de nuestra especie, se tiende a clasificarla por sus manifestaciones clínicas y, a continuación, por su gravedad, mientras que en cánidos se han establecidos varios grados de afectación. En gatos no hay un consenso científico hasta la fecha para categorizar la infección.

3.4.1. Patogenia atendiendo a su forma de presentación

a. Forma Cutánea:

Esta forma se produce cuando se presenta como chancro o lesión localizada única (la forma más común de presentación en personas del primer mundo) o de lesiones cutáneas diseminadas por toda la superficie corporal, se considera el estado más leve de la enfermedad¹ aunque esto no implica que la intensidad de las lesiones no sea de gravedad. En personas, el chancro de inoculación puede avanzar hasta crear úlceras excavadas (Figura 18) que dejan importantes cicatrices y afectan a la vida de los pacientes.



Figura 18-A: dermatitis en paciente humano con presencia de úlceras excavadas ocasionadas por infección de L. infantum. Fuente Actas Dermo-Sifiliográficas.



Figura 18-B: Mismo tipo de lesión en paciente canino. Fuente propia

La forma diseminada es altamente incapacitante y deja a los pacientes expuestos a infecciones secundarias. Tanto en perro como en gato, la lesión primaria o chancro de inoculación no suele derivar en úlcera excavada, sino que la presencia de nódulos aparece con mayor frecuencia. En la forma diseminada ambos carnívoros presentan dermatitis y es recurrente ver infecciones secundarias asociadas a la leishmaniosis. En pacientes caninos se presenta de igual forma aunque la presencia de pelo y la menor higiene condiciona la aparición de infecciones bacterianas oportunistas que derivan en dermatitis secundarias-

b. Forma mucocutánea

Afecta a mucosas y pliegues mucocutáneos¹, provocando en ocasiones lesiones altamente incapacitantes en pacientes humanos, con desaparición de grandes porciones de tejido que dejan expuestas las capas subyacentes a infecciones secundarias. En el pasado, algunas de estas manifestaciones llegaron a confundirse con sífilis o lepra (Figura 19).



Figura 19: Lesiones similares en un paciente Humano, canino y felino afectados de leishmaniosis mucocutánea.
Fuente: who.org (Humana) y propia (perro y gato)

c. Forma visceral

Por instauración per se o por evolución de las dos anteriores; por fracaso del sistema inmune, se trata de la forma más grave¹⁹ de presentación de la enfermedad, tanto en humanos como en animales, ya que los parásitos van a multiplicarse en todos los órganos y a provocar reacciones del sistema inmune con el consiguiente depósito de inmunocomplejos que dificultan la libre circulación de sustancias, sobre todo a nivel de riñones e hígado donde entorpecen en gran manera sus funciones. Si no es tratada, termina con el fallecimiento del paciente (Figura 20).



Figura 20: Paciente canino y Humano en fase avanzada de Leishmaniosis visceral.
Fuente propia (perro) y hindawi.com (humano)

3.4.2. Patogenia atendiendo a la gravedad de presentación, Estadios I a IV, usada principalmente en animales.

En los últimos años, se ha instaurado un **cuadro jerárquico** de sintomatología¹⁵ en pacientes caninos para clasificar y definir el estado de la infección. El trabajo ha sido recogido en las guías **Leishvet®** de libre acceso para todos los profesionales y se resumen en 4 estadios, del I, el más leve, al IV, el más grave y con peor pronóstico.

- a. En el **Estadio I** de la enfermedad, el animal presenta pocos signos clínicos, con lesiones cutáneas en forma de nódulos y alguna linfadenopatía localizada (Figura 21). Suelen ser negativos en las pruebas de inmunoensayo tanto cuantitativas

como cualitativas o con niveles muy bajos de anticuerpos. Su pronóstico es bueno si se instaure el tratamiento pronto.



Figura 21: nódulo aislado en párpado canino. Fuente propia

- b. En el **Estadio II**, la infección ya ha avanzado del chancro de inoculación, presentando síntomas generales de media intensidad y, según la forma de presentación, lesiones en mucosas, piel o ambas, la adenopatía ya es generalizada (Figura 22) y comienzan los signos inespecíficos como apatía, pérdidas ponderales y alteraciones analíticas como anemia, incremento de la gamma globulinas y disminución de la albúmina. El pronóstico es grave, pero si se instaure un tratamiento adecuado y el paciente lo supera, puede llegar incluso a seronegativizar en un análisis cuantitativo de anticuerpos en sangre.



Figura 22: Múltiples nódulos y esplenomegalia en paciente canino. Fuente propia

- c. En el **Estadio III**, a todas las manifestaciones de los dos grupos anteriores, se añaden otros síntomas como glomerulonefritis con proteinuria y pronóstico reservado. El tratamiento puede llegar a conseguir que los síntomas remitan, pero esos animales suelen quedar con niveles de anticuerpos detectables en sangre y ser portadores operativos (Figura 23).



Figura 23: Paciente canino con emaciación debido a una leishmaniosis visceral. Fuente propia

- d. Finalmente, en el **Estadio IV**, el empeoramiento manifiesto de todos los síntomas, con exacerbación del cuadro clínico, aparición de úlceras múltiples, costrosas o excavadas y dermatitis generalizadas que se unen al fallo renal y hepático. El pronóstico desfavorable. No sólo hay que tratar la infección sino lograr que la función renal y hepática se restauren y dependiendo de la severidad de las lesiones en ambos órganos, no siempre se puede lograr que el animal sobreviva. Se han descrito casos, incluso en hospitales de alta calidad (Figura 24) donde se han llegado a realizar diálisis de estos perros, pero su uso está restringido al poder económico de los propietarios y tiene fuertes condicionantes éticas en la aplicación de medidas correctoras tan invasivas en un animal doméstico que es portador de una zoonosis.



Figura 24: Paciente canino hospitalizado con azotemia, hipoalbuminemia y hepatitis, debidas a una leishmaniosis con título IFI superior a 1/1200. Requirió nutrición asistida, fluidoterapia, diuresis forzada y soporte durante el tratamiento con antimonial. Fuente propia.

4. DIAGNÓSTICO

El diagnóstico¹⁴ de la **leishmaniasis visceral** se efectúa mediante la combinación de un examen clínico con pruebas parasitológicas o serológicas (pruebas de diagnóstico rápido e inmunoensayos cuantitativos). Las pruebas serológicas tienen un valor limitado en las leishmaniasis cutánea y mucocutánea. El diagnóstico se confirma cuando los análisis parasitológicos corroboran las manifestaciones clínicas. Este criterio es válido tanto para el diagnóstico en reservorios como en Humanos, con la excepción de que, en el caso de los animales, no existe un protocolo diagnóstico consensuado pese a ser una Enfermedad de Declaración Obligatoria (EDO).

Las formas **cutánea y mucocutánea** tienen mayor facilidad de diagnóstico, ya que un raspado profundo de la lesión y su posterior observación microscópica o identificación mediante técnicas genéticas de PCR demuestran rápida e indudablemente la presencia del parásito. Se han establecidos varios criterios que, de forma sinérgica, acercan al diagnóstico:

4.1. Criterio clínico-sintomatológico

- **Cutánea:** Una o más lesiones ulcerosas indoloras en cara, cuello, brazos y piernas, que puede aumentar de tamaño para convertirse en una úlcera no dolorosa de duración variable que cura espontáneamente dejando cicatriz deprimida.
- **Mucocutánea:** Afectación de mucosas por diseminación de la forma cutánea. Ciertas cepas pueden diseminarse en mucosas y causar lesiones deformantes al implicar la destrucción de los tejidos nasofaríngeos
- **Visceral:** Fiebre irregular prolongada, esplenomegalia y pérdida de peso. Posterior hepatomegalia moderada, adenopatías inguinal y cervical, leucopenia, anemia y trombocitopenia.

4.2. Criterio laboratorial-analítico

- Detección del ADN del parásito (PCR) en sangre.
- Visualización del parásito (parasitología positiva por tinción, cultivo de la lesión).
- **Parasitología** positiva (frotis teñidos de la médula ósea, el bazo, el hígado, los ganglios linfáticos, la sangre o el cultivo del microorganismo de una biopsia o aspirado).
- **Serología** positiva (IFAT, ELISA, inmunocromatografía rK39, prueba de aglutinación directa). Las pruebas rápidas serológicas poco útiles para leishmaniasis cutánea porque los niveles de anticuerpos son indetectables o muy bajos. Solamente para leishmaniasis mucocutánea se puede admitir como diagnóstico la serología positiva (IFAT, ELISA).

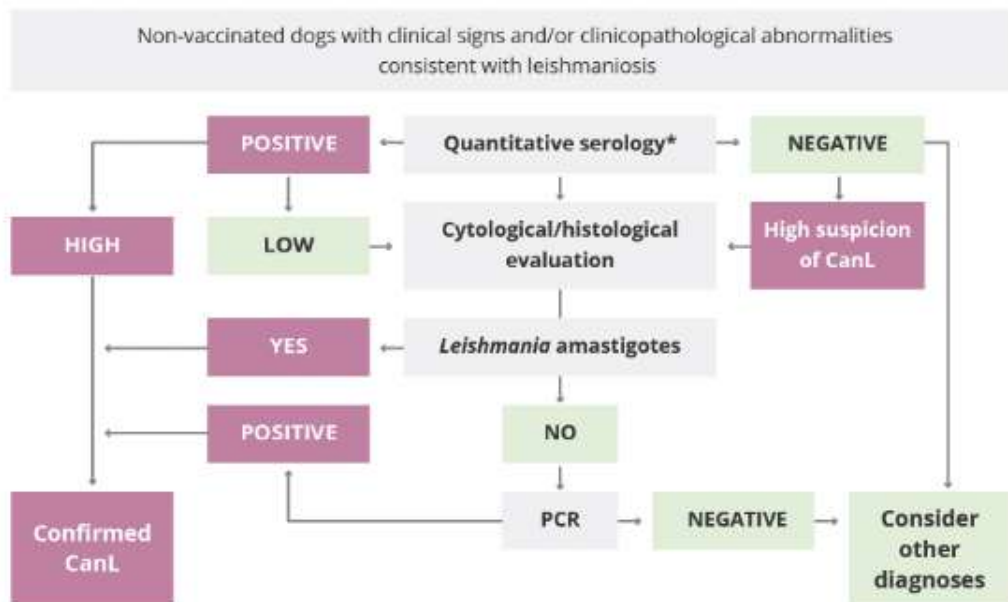
Las pruebas serológicas tienen dos limitaciones:

- Los anticuerpos específicos siguen siendo detectables en suero de sangre periférica hasta varios años después de la curación. Por lo tanto, en las recaídas el diagnóstico basado únicamente en la serología no es fiable porque puede señalar falsos positivos.
- Una proporción significativa de las personas sanas que viven en zonas endémicas, sin antecedentes de leishmaniasis visceral, son positivas para anticuerpos anti-leishmania debido a infecciones asintomáticas. Esto quiere decir que pueden haber estado en contacto con el parásito por la picadura de un vector, pero haber superado la infección o ser portadores inaparentes. Por lo tanto, el diagnóstico serológico siempre debe ser utilizado combinándolo con la definición de caso clínico de leishmaniasis visceral. La inmunocromatografía con antígeno rK39 es una prueba rápida para realizar en el campo y que puede tener valor pronóstico, pero no diagnóstico. Un paciente portador puede desarrollar la enfermedad por lo que se requieren más datos para separar infectados de enfermos.

4.3. Diagnóstico en los reservorios:

4.3.1. Perro

Según la guía Leishvet^{®15}, el algoritmo diagnóstico es el siguiente (Figura 25):



* Cytology could be performed at the same time in any lesional tissue or biological fluid.

Figura 25: FUENTE: www.leishvet.org

Otros métodos de diagnóstico³, como uso de la PCR para demostrar la infección, han sido estudiados en diversos tejidos como sangre, biopsia de piel, médula ósea y conjuntiva y los resultados han sido poco definidos para algunos de estos tejidos, por lo que actualmente se considera necesario realizar PCR a varios tejidos distintos procedentes del animal sospechoso y compararlos con los signos clínicos.

4.3.2. Gato

Diversos estudios¹⁶ han demostrado que los gatos que viven en zonas endémicas pueden portar el parásito y, en ocasiones, mostrar signos clínicos de la enfermedad (Figura 26). No hay un acuerdo claro acerca del protocolo diagnóstico y cada autor ha comunicado casos clínicos siguiendo criterios similares al del perro. Uno de los objetivos principales de esta tesis es llegar a un protocolo diagnóstico fiable en esta especie.

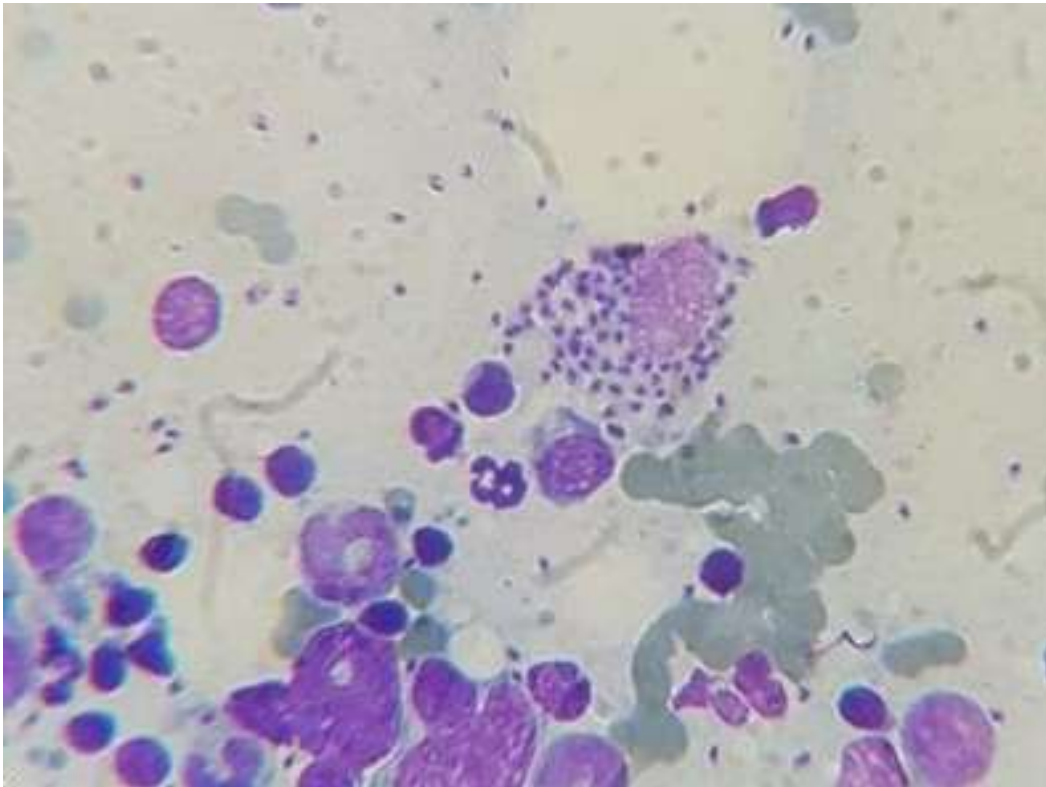


Figura26: Amastigotes en frotis felino. Fuente propia.

5. TRATAMIENTO

El tratamiento de la leishmaniosis depende de si se trata de un hospedador animal o de un Ser Humano. En ambos casos hay que tener en cuenta el estado del paciente, la presentación de la enfermedad y la presencia de comorbilidades. En seres humanos^{5,20,21}, el tratamiento puede llevar a la eliminación de la enfermedad, no siendo así en el reservorio canino. En cualquier caso, el estado inmunitario del paciente²² es fundamental porque la medicación puede eliminar cierto número de parásitos, pero no es suficiente para acabar con todos. Es vital que las defensas del hospedador acompañen esta lucha y destruyan los parásitos, sobre todo llegando a las formas intracelulares. Es por ello por lo que los estados inmunológicos inadecuados o insuficientes aumentan el riesgo de fallo terapéutico o la aparición de recidivas. En el caso de los Seres Humanos, la confirmación diagnóstica de la enfermedad requiere de la instauración inmediata de tratamiento.

En la Comunidad Autónoma Andaluza¹⁹, es obligatoria la comunicación de la enfermedad en perros, así como su tratamiento con productos leishmanicidas o el sacrificio sanitario del animal. Existe un protocolo de comunicación a través del Consejo Andaluz de Colegios Oficiales de Veterinarios, donde el veterinario clínico registra la fecha de diagnóstico y el tratamiento prescrito. Por desgracia, no se realiza un seguimiento de los casos positivos ni se está comprobando el cumplimiento de la Declaración Obligatoria por parte de las autoridades sanitarias.

Diferentes productos se han usado a lo largo de los años contra las distintas formas de presentación de esta enfermedad, los más fiables son^{23,24,25}:

5.1. Leishmanicidas:

- a) Antimoniales pentavalentes: Interfieren en el mecanismo bioenergético celular del parásito.
 - Antimoniato de meglumina: Su uso está permitido tanto en Seres Humanos (Glucantime® CN700692) como en Animales (Glucantime® CN571111 u Antishmania® CN585303). Los efectos secundarios requieren monitorización del paciente en ambas especies. Aunque el medicamento veterinario no está registrado para la especie felina, de manera experimental se hace un uso “extra-etiqueta” en los casos de gatos.
 - Estibogluconato de sodio: Solo para Seres Humanos, no disponible en España (Reino Unido, Pentostam®).
- b) Anfotericina B liposomal IV: Antimicótico poliénico que se une a esteroides, con muchos efectos secundarios. Únicamente para Seres Humanos y bajo dispensación hospitalaria (Ambisome® CN679076). En algunos casos los propietarios han conseguido la medicación pero su efecto en perros no está comprobado.

c) Miltefosina: Antineoplásico con acción en las vías metabólicas fosfolipídicas afectando sobre todo a la membrana parasitaria. Uso preferente en animales, en Seres Humanos se usa en zonas subdesarrolladas, no está comercializado para su uso en humanos en España, pero sí para su uso veterinario (Milteforan® CN577231, 577232 y 577233).

5.2. **Leishmaniostático:** Solo hay uno, el alopurinol, que impide la formación de ácido úrico a partir de purina por bloqueo de la Xantina-oxidasa. De uso frecuente en animales (numerosas presentaciones genéricas, principio activo liberado).

5.3. Tratamientos complementarios

Además de estos tratamientos específicos, los profesionales sanitarios cuentan con tratamientos complementarios destinados a potenciar los descritos anteriormente y a ayudar al propio sistema inmune del animal a luchar contra el parásito. Estos tratamientos son:

- a. Inmunomoduladores: El uso de la **domperidona**²⁴ como estimulador inespecífico de la vía celular es ampliamente conocido y fue un descubrimiento español de finales del siglo XX. Actualmente se usa de forma amplia en veterinaria (Leisguard® CN579459) y también en Seres Humanos en zonas subdesarrolladas del planeta.
- b. Dentro del campo de nuevas terapias se están usando productos de fitoterapia como *Artemisa annua*^{26,35}, extracto del micelio de *Lentinus edodes*, que promueve la actividad de células NK, así como la proliferación de macrófagos y la diferenciación de células T a Th1.

SECCIÓN 2ª

OBJETIVOS Y JUSTIFICACIÓN

1. Objetivo principal: Realizar un análisis general del estado de la **Leishmaniosis** en la provincia de Málaga, prestando especial interés en la epidemiología de los reservorios domésticos.

2. Objetivos parciales y su justificación:

2.1. Prevalencia: Se busca cuál es la situación en la actualidad en la franja litoral de Málaga, tanto en reservorio animal como Humano y la potencial correlación que haya entre ambos grupos.

2.2. Ecología: La polarización del modelo de uso del suelo^{31,32,33}, en la provincia de Málaga⁴ crea dos hábitats bien diferenciados entre el modelo turístico-urbano en la zona Oeste y el agrario en la Este. ¿afecta esto a la prevalencia de la enfermedad en los reservorios?

2.3. Hospedadores domésticos

2.3.1. Perro

Conocido su papel en todo el Mundo^{2,5,36} como reservorio principal del parásito, estudiados de manera profunda los mecanismos del contagio y de la enfermedad en esta especie, establecido el mapa epidemiológico a nivel nacional, quedan algunas dudas por resolver con respecto a esta especie:

a. Zoonosis vectoriales comórbidas: Además de la citada prevalencia de la enfermedad en estos animales, considerados reservorio principal, se pretende comprobar si otras zoonosis vectoriales habituales de la zona se presentan en comorbilidad³⁷ y si dicha coinfección afecta al potencial infectivo de los portadores o si existe relación y se influyen mutuamente.

b. Proponer un nuevo término Epidemiológico: La “Transmisión Diferida Facilitada”: Siendo Málaga un lugar de alta densidad de residentes extranjeros y uno de los principales exportadores de mascotas domésticas abandonadas desde España a países del norte de Europa, es importante conocer el ratio de portadores respecto a sanos, descubrir qué riesgos representan para la salud pública las actuales tendencias de globalización y movimiento de animales, fijando el objetivo en las adopciones internacionales de animales con destino a Europa. La hipótesis de la que parte este estudio es que debido a esta migración de animales desde nuestro territorio se están creando “Exonodos” de parásitos en nuevos territorios que estaban libres y protegidos previamente, tanto por su climatología como por la orografía que dificulta la diseminación del vector desde zonas más sureñas. El transporte a grandes velocidades podría trasladar vectores competentes a nuevas áreas donde podrían encontrarse con sujetos portadores llevados desde nuestro territorio, conformando lo que hemos llamado “transmisión Diferida Facilitada”, un concepto epidemiológico para tener en cuenta en el futuro.

c. **Efectos del aislamiento de reservorios durante el confinamiento de 2020:** Como última cuestión y, a raíz del Estado de Alarma a causa de la pandemia de SARS-CoV-10, que ha influido en el desarrollo y tiempo de ejecución de este proyecto, comprobar la influencia del confinamiento durante 2020 y años siguientes en la incidencia y las tendencias³⁷ de la enfermedad en el reservorio principal.

2.3.2. Gato

a. **Valoración de las técnicas diagnósticas disponibles:** Dada la poca información^{18,38,39,40} sobre cómo afecta la enfermedad a esta especie (aunque en la última década se han realizado importantes avances en su estudio), es necesario determinar el papel real que juegan en el mantenimiento y transmisión del parásito en la provincia de Málaga y evaluar su capacidad para ser portadores efectivos, además de comprobar si la enfermedad les afecta y a qué nivel. Pese a las publicaciones científicas de los últimos años^{41,42,43,44,45}, las técnicas diagnósticas no están aún claras y no hay un acuerdo sobre una forma de diagnóstico^{46,47,48,49,50,51,6,56} en esta especie, se pretende evaluar los métodos disponibles:

Serología: Son técnicas que buscan determinar la presencia de anticuerpos anti-leishmania en la sangre de los gatos sometidos a estudio. La búsqueda directa de antígeno es más complicada, puesto que, al tratarse de un parásito intracelular, la posibilidad de encontrar antígenos libres en sangre es mucho menor que la de encontrar anticuerpos. De las técnicas disponibles se han seleccionado:

- **Inmunofluorescencia Indirecta o IFI:** Con el objetivo de comparar y comprobar los resultados de aquellos individuos que portando el parásito, haya hecho la seroconversión y estén luchando por la vía Th2.
- **Enzimo-Inmunoanálisis de Adsorción o ELISA:** Se estableció el mismo convenio para la caracterización de sujetos que proporcionaron sangre para el aislamiento de suero con el que ajustar la prueba felina. Se pretendía contar con una prueba fiable y automatizada.
- **Inmunocromatografía de Membrana o IC/LF:** En colaboración con Laboratorios Uranovet® en el desarrollo de una prueba rápida de inmunocromatografía de membrana, dentro del convenio antes mencionado, en el que se extraerán muestras que permitan caracterizar a los sujetos a los que se extraerá suero suficiente para poner en marcha una prueba de estas características. Además, se van a realizar pruebas de campo en las que valorar la calidad del producto, así como el diseño del modo de uso que se editará en las instrucciones de este, buscando la mayor facilidad en el manejo para el veterinario clínico, todo dentro de un proyecto I+D+i emprendido por la empresa Uranovet®.

Genética molecular o PCR: Toma de muestras de distintos tejidos para determinar la presencia de material genético del parásito⁵⁵ y poder comparar los resultados con las otras técnicas, así como ayudar a caracterizar cada sujeto estudiado.

Microscopía directa: frotis de las muestras de tejidos para su tinción y valorar la fiabilidad de la prueba en esta especie.

b. Diseño de un algoritmo diagnóstico en gatos: Uno de los objetivos más necesarios de este estudio es desarrollar, mediante los datos obtenidos, una guía de pasos para el diagnóstico de la enfermedad en la especie felina que sirva de guía a los veterinarios clínicos. Esto no sólo repercute en su labor diaria, sino que ayudará a descubrir nuevos casos que, una vez declarados, entrarán a formar parte de los datos estadísticos de la presencia del parásito en otros reservorios, información que es fundamental para la comprensión de la enfermedad y la valoración de la prevalencia, los riesgos para los hospedadores, tanto humanos como animales y proporcionará una herramienta más en el diseño de estrategias para luchar contra ella.

SECCIÓN 3ª

MATERIALES

1. FUNGIBLES

Material de extracción y almacenaje

a) **Jeringuillas** de dos piezas, de un solo uso, estériles (Tabla 3).

Tabla 3: Tipos de jeringuillas usadas.

Capacidad	Cono Luer	Uso
1cc	Concéntrico	Sedación de gatos y perros pequeños
2,5cc.	Concéntrico	Sedación perros medianos Extracción de sangre en gatos y perros pequeños
5cc.	Excéntrico	Sedación en perros grandes Extracción de sangre en perros grandes y animales destinados a eutanasia
10cc.	Excéntrico	PAAF de todas las muestras

b) **Agujas**, dos piezas (punzante y tapón de seguridad), de un solo uso, estériles (Tabla 4):

Tabla 4: Tipos de agujas utilizadas.

Nº	LARGO	ANCHO (mm.)	USO
26G Café	16mm	0,45 x 0.23mm	Sedación IM gatos y perros pequeños
25G Naranja	16mm	0,50 x 0.23mm	Sedación IM gatos y perros pequeños
3G Azul	25mm	0,62 x 0.29mm	Extracción sangre perros medianos Sedación en todos los perros
2G Negro	32mm	0,70 x 0.35mm	Extracción de sangre en perro grandes
21G Verde	32mm	0,80 x 0.42mm	Extracción de sangre perros grandes PAAF en animales pequeños
20G Amarillo	38mm	0,90 x 0.49mm	PAAF animales medianos
18G Rosado	38mm	1,20 x 0.73mm	PAAF animales grandes
16G blanca	38mm	1.60 x 0.90mm	PAAF animales muy grandes

c) **Catéteres**: en cuatro piezas: Punzante-fiador, catéter de teflón, tapón de seguridad y tapón de salida. De un solo uso, estériles y desechables (tabla 5).

Tabla 5: Tipos de catéteres intravenosos desechables usados.

Nº	LONGITUD	CALIBRE	USO
23G Azul	25mm	0,62 x 0.29mm	Extracción sangre gatos y perros pequeños Inyección de medicamentos
21G Verde	32mm	0,80 x 0.42mm	Extracción de sangre en perros medianos Inyección de medicamentos
18G Rosado	38mm	1,20 x 0.73mm	Extracción de sangre perros grandes Inyección de medicamentos

d) Almacenamiento y procesado: Para el manejo de las muestras biológicas (Tabla 6), desde su recolección, su transporte, procesado, hasta su almacenamiento final en el biobanco a -70°C existente en el ISCIII, donde se han unido a numerosas muestras procedentes de toda España y que se encuentra disponible para consulta y uso con fines investigadores previa solicitud al Laboratorio de Parasitología, Unidad de Leishmaniosis y Chagas. Dichas muestras consisten en ADN purificado y alicuotadas, plasma y suero.

Tabla 6: Tipos de contenedores de muestras biológicas utilizados.

CONTENEDOR	COLOR	FINALIDAD
EDTA	Transparente, tapón morado	Hemograma
Heparina-K	Transparente, tapón verde	Proteinograma
Gel separador	Transparente, tapón rojo	Bioquímica e ionograma
Seco estéril	Transparente, tapón blanco	Suero/plasma ya extraído
Eppendorf 2ml seco estéril tapón rosca	Transparente, tapón de rosca con goma aislante	Suero/plasma extraído ADN purificado Envase final Biobanco.
Eppendorf 2ml con NET 10	Transparente, tapón transparente	Biopsias piel, hígado, bazo, mucosa, ganglio, médula ósea
Falcon Estéril Con NET 10	Transparente, tapón rojo	Biopsias grandes, Embriones completos
Contenedor muestras de 50ml con NET-10	Plástico blanco transparente, tapón rojo	Biopsias grandes, órganos, Fetos completos Vesículas embrionarias

- 2. MAQUINARIA** usada en laboratorio y en clínica (Tabla 7). Las del laboratorio están duplicada, puesto que se ha contado tanto con el laboratorio de microbiología de la Universidad de Málaga como con el de Parasitología del Instituto de Salud Carlos III. Con respecto a la clínica, se han realizado procedimientos en varios centros, pero siempre con un mínimo de equipamiento necesario para los procesos en cada sujeto que garanticen el bienestar animal y el cumplimiento de la normativa veterinaria en vigor.

Tabla 7: Maquinaria utilizada en los procedimientos clínicos y laboratoriales.

LABORATORIO	CLÍNICA
Incubadora agitación en inmersión	Generador de oxígeno
Centrifugadora	Vaporizador de Isoflurano
Vórtex	Pulsioxímetro
Medidor de pH	Monitor multiparamétrico
Báscula	Infusor intravenoso
Micro báscula	Estufa clínica
Microscopio óptico	Equipo completo de quirófano
Microscopio de luz polarizada	Termómetro
Lector de PCR	Congelador -20°C
Electroforesis en gel	Congelador -70°C
Ciclador programable PCR	Campana de flujo
Micro batidora clínica	Estetoscopio

3. ACCESORIOS

- Ordenador
- Vehículo
- Vestimenta EPI para animales aislados y quirófano
- Vestimenta de trabajo con los animales
- Vestimenta de laboratorio

SECCIÓN 4ª

MÉTODOS

III. MÉTODOS CLÍNICOS

1. EXAMEN CLÍNICO

Se elaboraron fichas clínicas con las características de cada sujeto, categorización, etiqueta única y a partir de ahí se escribió su historial.

En animales de centros de acogida temporal (protectoras y zoosanitarios): Primero se hizo una valoración visual del animal, así como una anamnesis a la persona que lo entregó, encontró o recogió, también se pasaba el cuestionario a los voluntarios sobre aspectos como comportamiento en la jaula, grado de docilidad, socialización y relación con otros individuos. Mas tarde, cuando el animal ya estaba habituado al centro, se valoraba su actitud, su alimentación, estado general. Se tomaban los datos básicos como peso, talla, tipo de pelaje.

En Clínicas veterinarias: ficha clínica con todos los datos aportados o existentes en el fichero del veterinario colaborador.

A continuación se valoraba en todos los casos al animal mediante (Tabla 8) palpación, percusión, auscultación y examen visual de los parámetros básicos de salud como TRC, hidratación, presencia de anomalías anatómicas, adenopatías, esplenomegalia, fiebre o hipotermia, conjuntivitis, blefaritis, uveítis, onicogrifosis y estado de la piel, anotando todos los parámetros para luego establecerlos como variables estadísticas.

Tabla 8: Valoración de los parámetros de salud básicos tomados como variables.

Valoración Clínica	Palpación	Linfadenomegalias, esplenomegalia
	Exploración	Peso, estado corporal deficiente, fiebre, palidez mucosas, TRC, descamaciones, úlceras, dermatitis, onicogrifosis, nódulos cutáneos, conjuntivitis, blefaritis, uveítis, intolerancia al ejercicio, poliuria, polidipsia, oliguria, anuria, disminución del apetito, letargo, vómitos, diarreas
	Auscultación	Disnea, taquipnea, bradipnea, alteraciones cardíacas

Una vez admitido el sujeto al estudio, se procedía a la toma de muestras dentro del ejercicio clínico de esterilización o, en el caso de individuos de clínicas, mediante la sedación. Todas las muestras fueron etiquetadas en el momento de la recolección y procesadas según protocolo establecido.

2. PREPARACIÓN PARA LA TOMA DE MUESTRAS

- En animales vivos: Todos los procedimientos se han realizaron de manera limpia y aséptica con el protocolo de Limpieza y desinfección (LYD) siguiente:
 - Rasurado con maquina peladora inalámbrica y cuchilla del nº0 (a ras de piel) y se retirada los restos de pelaje.
 - Aplicación solución jabonosa de clorhexidina al 2% y frotado con una gasa empapada para retirar la suciedad de la piel, repitiendo el proceso hasta que la gasa saliese limpia, Secado con gasa estéril.
 - Aplicación de antiséptico (Clorhexidina o povidona yodada).
 - Para las muestras de PAAF y raspado, la LYD es la misma, siendo la zona de rasurado de la piel un cuadrado de 5x5cm. Una vez rasurada la ventana de acceso:
 - Desinfección la piel con una torunda impregnada en solución de povidona yodada.

En la toma de muestra de sangre, se cateterizaron o punzaron las venas cefálicas o tarsales y se extrajo una cantidad no inferior a los 6ml.

En los raspados cutáneos y PAAF, sobre la piel seca ya esterilizada, se usó paño de campo estéril y se realizaron los cortes para las ventanas de trabajo. En ejemplares pequeños, se usó un mismo paño de campo grande que cubría a todo el animal, al que se le realizaron varias aberturas para la obtención de las distintas muestras.

- En animales eutanasiados por motivos humanitarios: Una vez detenido el corazón y confirmada la muerte por el personal veterinario, se extrajeron las muestras de modo aséptico para evitar contaminación de estas. Si se sospechó previamente de enfermedad clínica, se realizó necropsia completa con extracción de muestras más grandes, al menos 10gr de muestra, de bazo, ganglios completos, trozos de piel y mucosa.

En los gatos sometidos a método CER, es común la realización de un corte en forma de “V” en la punta de la oreja (Figura 27) para ser fácilmente identificables y no ser sometidos a una nueva anestesia en caso de recaptura, tras la sedación, se colocó catéter en las mismas condiciones anteriores, se tomaron todas las muestras necesarias y la muestra de piel se obtuvo del propio trozo cortado en el pabellón auricular. El procedimiento consistió en aplicar dos pinzas hemostáticas formando una “V” cortando por el interior con unas tijeras Metzenbaum rectas de punta roma. Ese trozo de piel de la punta de la oreja es precisamente el que se usó para buscar amastigotes por PCR y Microscopía. Para ello se realizó un frotis en fresco con la propia piel raspada con una hoja de bisturí del nº20 o 22, tras esto, se introdujo el trozo en un tubo con NET-10

previamente etiquetado y se almacenó en la gradilla correspondiente para su posterior procesado.



Figura 27: Marca CER en oreja de un gato feral esterilizado. Fuente Revista Argos®

Durante la esterilización de gatas de programas CER suele ser común que algunas hembras puedan venir preñadas. En estos casos, se realizó la ovario-histerectomía completa y, al terminar todas las intervenciones programadas, se abrieron los úteros y se extrajeron las vesículas embrionarias o los fetos si el estado gestacional era más avanzado. Los embriones se introducían completos en tubos Falcon de 10cc. Los fetos se abrieron y se extrajo la masa hepato-esplénica completo que fue introducida en el mismo tipo de tubo para posterior prueba genética.

- Para la toma de muestras de médula en perros: si el animal tenía el tamaño suficiente (a partir de los 4kg de peso magro), las muestras se obtenían introduciendo una aguja en el ángulo costo condral de las dos últimas costillas falsas no flotantes, en dirección ascendente por el interior del tejido óseo esponjoso, se usó una jeringuilla de 10ml para proporcionar el suficiente vacío hacia la misma y extraer una buena cantidad de médula. Luego se introdujo en NET10 y se almacenó en su gradilla.
- En la toma de muestra de Médula en gatos: se usó la técnica de la articulación del hombro, desarrollada durante este estudio y que fue publicada en revista Argos®. El artículo completo se encuentra en el Anexo 1.
- Técnica general para la Punción y Aspiración con Aguja Fina o PAAF: usando una aguja de tamaño adecuado, se punzó la zona seleccionada y se obtuvo por aspiración un pequeño cilindro o un aspirado que se expandió sobre un portaobjetos o dentro de un tubo estéril con NET10 adosando una jeringa de 10ml. Esta técnica también se usó para muestras de bazo en animales destinados a esterilización, pero solo en la mitad de ellos pues tras varios accidentes de sangrado incontrolable, se dejó de usar esta técnica.

- Muestra de piel: En perros y en gatos destinados a adopción se realizó un raspado en zona de punta de las orejas con una hoja de bisturí del 20 o 22. En gatos destinados a CES/CER o a eutanasia, se recortó la punta entera de la oreja.
- Muestra de mucosa: Raspado con hoja de bisturí del 20 en comisura labial o línea mucocutánea nasal. En caso de conjuntiva, se realizó mediante un hisopado en ángulo medial de ambos ojos.
- Muestra de bazo: En animales destinados a eutanasia, se cortó un trozo de unos 20 a 100 gr. Al principio de la investigación, se realizaron varias aspiraciones durante las esterilizaciones y otras eco-guiadas, pero tras varios sangrados, se descartó esta técnica en animales vivos.

3. MANEJO ZOOTÉCNICO DE LOS ANIMALES

Los sujetos fueron tratados siempre siguiendo las premisas de bienestar animal y respetando las condiciones y actitudes de cada individuo. En la contención inicial, se usaron herramientas tales como collares y correas de adiestramiento, siempre realizado por personal formado y capacitado, a fin de inyectar los medicamentos necesarios para lograr una sumisión química que permitiese realizar los protocolos con seguridad para el personal y sin provocar sufrimiento o estrés innecesario a los sujetos.

3.1. Sedantes:

Según las circunstancias y a juicio clínico, se usaron Acepromacina o alfa-adrenérgicos (medetomidina o xilacina) para la sedación. En ambos casos, se administraron asociados a un opioide.

Acepromacina: Fenotiazina neuroléptica, que bloquea los receptores de dopamina en el cerebro, dificultando la comunicación celular. Es un fármaco muy seguro, aunque algunos animales pueden presentar efectos adversos, tales como hipersensibilidad al fármaco, hipotensión, taquicardia, arritmias (específicamente en el bóxer, por lo que en esta raza fue sustituido por un alfa adrenérgico), excitación, hipotermia, puede potenciar los estados convulsivos y epilépticos. Por ello se estableció un protocolo de actuación para estos casos con botiquín de urgencias y sala con medios para la intubación respiratoria y oxigenación artificial del animal.

Alfa 2 Adrenérgicos: Efecto depresivo resultado de la estimulación presináptica de los receptores α -adrenérgicos centrales y periféricos, que disminuyen la liberación central y periférica de norepinefrina, disminuyendo el efecto simpático central, las catecolaminas circulantes y otros principios relacionados con el estrés. Producen sedación y analgesia, dosis dependiente, sólo hasta alcanzar un grado de efecto máximo, después sólo prolonga el tiempo de acción. En las más altas dosis, el individuo

no está anestesiado, pudiendo despertar ante el estímulo quirúrgico. Es necesario asociarlo con analgésico local o anestesia general para cirugías mayores.

- Medetomidina: cuando las características del animal así lo indicaban (edad, estado general), ya que es de un fármaco caro, más si se utiliza el atipamezol como agente reversor de la acción del alfa2, sólo se usaron en casos destinados a esterilización para su posterior adopción. Asociada a un opioide de los descritos anteriormente se pudo reducir las dosis efectivas y los efectos cardiovasculares. Efectos adversos: hipotermia, bradicardia, hipovolemia, hipotensión.
- Xilacina: XILACINA 2% es un compuesto de acción sedativa, analgésica y relajante muscular, el efecto de relajante muscular se basa en la inhibición de la transmisión de impulsos nerviosos en el músculo. Posee propiedades analgésicas importantes. Inconvenientes y posibles efectos secundarios: Marcado efecto emético, por sus propiedades alfa 2 agonistas puede elevar la glucemia e incrementar la presión arterial, a dosis elevadas puede generar depresión respiratoria, debe utilizarse con precaución en perros de razas braquicefálicas por la probabilidad de broncoaspiración. Por este motivo (y por su menor precio) se usaron sólo para la premedicación previa a la anestesia en animales destinados a eutanasia.
- Dexmedetomidina: Extracción de la fracción dextrógira y separación de la levomedetomidina, de efectos secundarios más nocivos. Es la más cara de los tres alfa2 adrenérgicos, por lo que su uso estuvo restringido a clínicas o a animales geriátricos o de razas sensibles en protectoras.

3.2. Opioides:

Se usaron tanto la morfina como metadona. Son agonistas opioides reversibles. La elección de solo dos opioides de la lista se debió a que esta combinación da un mayor efecto sedante en perros y su influencia analgésica es más fuerte y de mayor duración tanto en gatos como en perros. Efectos adversos: Pueden provocar bradicardia y depresión respiratoria vómitos (que pueden ser contrarrestados con la Acepromacina), liberación de histamina, hipotensión, hipertermia en gatos, anemia, disfunción hepática, hipovolemia, sensibilidad al fármaco.

3.3. Benzodiacepinas:

Diazepam o midazolam, según disponibilidad. Producen relajación muscular y somnolencia, siempre asociados a un sedante. En aquellos sujetos que presentaron un riesgo anestésico por encima de ASAIII (enfermedad cardíaca, debilidad extrema) se optó por la asociación de un opiáceo con una benzodiacepina como únicas sustancias. Esta asociación no proporciona una sedación profunda, pero era suficiente para la contención y extracción de sangre sin provocar excesivo estrés. En algunos animales se añadió lidocaína como anestésico local en la punción para obtener médula ósea. Efectos adversos: Bradicardia, bradipnea, emesis.

3.4. Ketamina:

Anestésico general, no barbitúrico de acción rápida y corta duración con propiedades hipnóticas, analgésicas y amnésicas a corto plazo que produce un estado característico de catalepsia, analgesia, amnesia y sedación, que se ha dado en llamar anestesia disociativa que consiste en una disociación funcional y electrofisiológica entre los sistemas límbico y talamoneocortical. El paciente permanece con los ojos abiertos, mantiene el reflejo de la tos, el corneal y el de deglución. El uso de esta sustancia siempre se ha usado acompañado de un opioide y una benzodiacepina OBLIGATORIAMENTE. Este anestésico ha sido el más usado en los gatos ferales.

Se establecieron combinaciones de fármacos, de manera que los animales siempre quedaron dormidos, con pérdida de conciencia, ausencia de dolor y total relajación, momento en que se procedía a la extracción de las muestras de sangre, mediante la inserción de un catéter adecuado al tamaño del animal y fijación con esparadrapo de 2,5cm.

A través del catéter se extrajo sangre para su posterior análisis, recolectándola mediante goteo o por presión inversa de jeringuilla de 2cc en gatos y de 5cc en perros. La sangre obtenida se introdujo en tubos de recolección con los diferentes aditivos que garantizaran su conservación y posterior procesado. Los tubos se etiquetaban previamente a la extracción con el código de cada animal y mediante rotulador indeleble.

Los fármacos descritos se usaron de forma combinada en lo que se conoce como “Anestesia, Sedación y Analgesia Multimodal” (Tabla 9), consistente en la mezcla de varios medicamentos cuya combinación produce una sinergia que permite reducir las dosis totales de cada uno de ellos si se usasen solos. Esto permite alcanzar un grado de relajación, inconsciencia y ausencia de dolor adecuada a los procesos aplicados, reduciendo al máximo los efectos secundarios y/o adversos de cada uno de ellos, protegiendo la salud del sujeto y garantizando su bienestar. Combinaciones de fármacos usadas en estos procedimientos:

Tabla 9: Combinaciones usadas.

SEDACIÓN IM	Fármaco	Mg/kg	especie	destino
RELAJANTES	Dizepam	0,5 mg/kg	perro gato	esterilización hembras
	o			
	Midazolam	0,25 mg/kg	perro gato	esterilización machos eutanasia ambos sexos
+				
FENOTIACINAS	Acepromacina	0.005-0.04 mg/kg	perros	eutanasia
o				
ALFA-2- ADRENÉRGICOS	Xilacina	0.2-1 mg/kg	perro gato	eutanasia
	o			
	Medetomidina	5 a 10 µg/kg 10 a 20 µg/kg	perro gato	esterilización
+				
DISOCIATIVOS	ketamina	25 mg/Kg	solo gatos	indistinto
		15 mg/kg	perros	esterilización machos
+				
OPIACEOS	metadona	0,5 a 1 mg 0,3 a 0,6 mg	perras gatas	esterilización hembras
		o		
	buprenorfina	10-20 mg/kg	perros y gatos	esterilización machos
	o			
	morfina	0.02-0,04 mg/kg 0,01-0,03 mg/kg	perros y gatos	eutanasia

IV. MÉTODOS LABORATORIALES

1. PROCEDIMIENTOS PREVIOS

Previamente a las tareas diarias de trabajo, se prepararon los tubos de 20 ml de disolución tampón y crioprotectora NET 10 que fueron añadidos a los tubos de recolección y almacenamiento de muestras no sanguíneas. Aunque el producto está ampliamente comercializado, su fabricación es sencilla y barata, por lo que se elaboró en el laboratorio de la UMA según el protocolo:

1.1. Protocolo para 80 mL NET 10 buffer: Compuesto por 0.4667 gr NaCl, 1.6 ml EDTA 0.5M pH 8.0, 0.8 ml Tris HCl 1M los componentes son diluidos en 60 ml de H₂O destilada, el pH se ajusta a 8.0 con NaOH. Una vez ajustado, se completa el volumen hasta 80 ml con H₂O destilada. Luego se procede a proceso de autoclave o filtrado fino y se mantiene a 4°C una vez abierto. Una vez se ha añadido el NET 10 al tejido o fluido agitar suavemente para evitar coagulación y mantener la muestra a -20°C hasta su uso. Se realizaron tantos ml como fueron necesarios, la cantidad se revisaba cada semana y se elaboraban tantos tubos como muestras se previesen tomar. Al cabo de una semana, el contenido era desechado para evitar contaminación de ADN.

1.2. Digestión de tejidos.

- Muestra de 200mg de tejido + 250 µL NET 10 = homogenizado con pistón y batidora eléctrica.
- En Tubo con tapón de rosca se añaden 100µL de muestra + 25 µL de Protein-kinasa (aditivo comercial) + 100µL del Buffer ATL o BT1
- Se incuba a 56°C en agitador durante toda la noche.
- Médula y ganglio son las muestras más fáciles de homogenizar. Piel es la muestra más dificultosa.

a) Separación del ADN.

- En el mismo tubo se añaden 200µL del preparado del Buffer BB3 y se someten a agitación por vórtex 10-20sg.
- Incubación a 70°C 10-15 minutos y reposo otros 10 minutos
- Adición de 200 µL de Etanol y agitación en vórtex 10 segundos, luego reposo otros 10 minutos.

b) Extracción del ADN.

- Colocación en gradilla numerada los tubos Eppendorf e introducción de las columnas.
- Adición de toda la muestra ya lisada y centrifugado 1 minuto a 11.000rpm
- Extracción la columna y descartado del tubo con el filtrado.
- Colocación la columna en un nuevo tubo seco.
- Lavado de la membrana sílica.
 - Primer lavado: adición 400 µL del Buffer BBW y centrifugado durante 1 min a 11.000rpm

Sacado de la columna descartado del tubo con el lavado. Colocación en un nuevo tubo seco

- Segundo lavado: adición de 600 μ L del Buffer BB5 y centrifugado de nuevo 1 min a 11.000rpm. Si el líquido saliese transparente, se repite el proceso las veces que sean necesarias.

- Secado de membrana. Descartado el tubo de lavado y colocación de la columna en un tubo seco, se vuelve a centrifugar hasta que salga el tubo seco.

c) Elución del ADN puro.

Previamente debía decidirse qué se iba a hacer con la muestra. Si almacenaba mediante refrigerado/congelado, se usaba el Buffer BBE como conservante, pero si la muestra iba a ser usada en ese momento, ya no se podía usar BBE por su alta concentración en EDTA que podía interferir la fase de amplificación por lo que se sustituyó con agua destilada y auto clavada. Este proceso se realizó con las muestras de tejido en NET10 congeladas *in situ* y llevada enteras al ISCIII donde se realizó todo el procedimiento.

Adición de 200 μ L de agua y reposo de 10 a 15 minutos y a continuación centrifugado durante 1 minuto a 11.000rpm

Por último, eliminación de la COLUMNA pues el ADN ya estaba en el tubo. El contenido líquido con el ADN purificado se pasaba a un tubo estéril con tapón previamente etiquetado, que era conservado en nevera a 4°C hasta su uso, o a -20°C si su destino era el almacenamiento.

1.3. Análisis aplicado a cada tejido/fluido: En cada sujeto se obtuvieron muestras de tejidos y fluidos biológicos para realizar los análisis de cada parámetro o variable a medir (Tabla 10).

Tabla 10: Origen del tejido/fluido biológico y tipo de procedimiento laboratorial al que se destinó.

SUERO/ PLASMA	Proteinograma Bioquímica Serología	
	ELISA	<i>B. canis</i> <i>D. immitis</i>
	INMUNOCROMATOGRAFÍA DE MEMBRANA (IFI)	<i>A. phagocytophilum</i> <i>L. infantum</i> <i>E. canis</i>
SANGRE ENTERA	Hemograma Frotis para microscopía	
BAZO Y GANGLIOS LINFÁTICOS	PAAF (PUNCIÓN-ASPIRACIÓN CON AGUJA FINA) PARA DIAGNÓSTICO POR PCR (5+5%) Y MICROSCOPIA (100%)	
PIEL Y MUCOSAS	DIAGNÓSTICO POR RASPADO PARA PCR MICROSCOPIA	
CLÍNICA	Linfadenomegalias, esplenomegalia. Poliuria, polidipsia, oliguria, anuria. Signos digestivos (diarrea, vómitos), disminución del apetito, letargo, pérdida de peso, fiebre, estado corporal deficiente. Palidez de mucosas y TRC aumentado Úlceras mucosas, úlceras cutáneas, dermatitis, onicogriphosis, nódulos cutáneos, conjuntivitis, blefaritis, uveítis, Dificultades respiratorias, disnea, intolerancia al ejercicio,	

1.4. Tratamiento de las muestras:

- **Muestras por raspado:** La hoja de bisturí se deslizó con cuidado sobre el portaobjetos dejando una capa de tejido que se fijó con alcohol y se tiñó con técnica Diff-Quick®.
- **Muestras por PAAF:** El contenido de la jeringuilla se vertió en el interior de un tubo con NET 10. Al final del vertido, se separó la ajuga de la jeringuilla, se tomó aire y se expulsó sobre un portaobjetos para pulverizar una muestra que fijar y teñir. Luego se volvió a colocar la aguja en la jeringuilla y se hicieron varias aspiraciones y pulverizaciones consecutivas en el interior del tubo para aprovechar al máximo el tejido extraído.

1.5. Procesado de las muestras

- **GENÉTICA MOLECULAR O PCR:** los tejidos fueron homogenizados en el laboratorio mediante técnica de machacado con pistón eléctrico en NET10 y sometidos a digestión comercial de Biotools según procedimiento de extracción de ADN por digestión

enzimática descrita en el punto anterior y posteriormente, una amplificación del material genético:

- **HEMOGRAMA** Se extrajo la sangre por punción de vena periférica, tarsal, cefálica o yugular y se introdujo en los tubos con EDTA, un tubo para el laboratorio en UMA, otro para laboratorio de referencia.
- **BIOQUÍMICA y PROTEINOGRAMA:** La sangre se introdujo en tres juegos de tubos, cada juego correspondió a UMA, Laboratorio de referencia e ISCI y laboratorios Urano[®], constando de: un tubo con gel separador, un tubo con EDTA y un tubo con Li-Heparina. Una vez en el laboratorio, se centrifugaron las muestras para la obtención del suero/plasma y su extracción con pipeta para ser introducido en tubo Eppendorf estéril seco.
- **SEROLOGÍA O INMUNENSAYO^{52,53}:** A partir de sangre extraída se centrifugó y extrajo el plasma/suero de cada animal para realizar los inmunoensayos más comunes en el diagnóstico clínico de enfermedades infecciosas.
- **IFI:** Los sueros fueron enfrentados a la prueba de detección de anticuerpos para determinar la utilidad diagnóstica de la prueba IC/LF: Esos mismos sueros fueron comprobados mediante inmunocromatografía de membrana, usando varios modelos tanto de antígeno como de líquido revelador, así como de la composición y densidad de la lámina de nitrocelulosa con el fin de desarrollar una prueba fiable, específica para la detección de anticuerpos circulantes en gatos. Los estudios también incluyeron el desarrollo de la técnica de uso del kit, mediante el procedimiento de ensayo con distintas combinaciones de la cantidad de suero con respecto a la solución reveladora, con el fin de optimizar y hacer lo más sencillo posible la prueba diagnóstica en clínica, tanto para gatos como para perros.
- **GENÉTICA MOLECULAR O PCR⁵⁴.** La prueba ya existe y es indistinta para cualquier especie puesto que no detecta anticuerpos, sino secuencias específicas de ADN mitocondrial del parásito. Para ello, se recolectaron muestras de tejidos y se sometieron a dicha técnica, comparándose los resultados con los obtenidos en el examen clínico, la serología y los análisis complementarios.

2. ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS

2.1. Inmunocromatografía de membrana (IC): Fueron varias las variables medidas con esta técnica:

- **LEISHMANIA INFANTUM EN PERROS Y GATOS:** Esta prueba detecta la presencia de anticuerpos caninos y felinos IgG, IgM e IgA frente a parásitos de la especie *Leishmania infantum* en suero o plasma, basada en proteínas recombinantes. Es un inmunoensayo cromatográfico de flujo lateral. Compuesto de una base lineal de color rojo con el antígeno recombinante de *L. infantum* conjugado con oro coloidal, un conjugado de IgG-oro, sobre una base tipo membrana de nitrocelulosa que, a su vez, contiene una línea de control de resultado positivo "T", rica en conjugado antígeno *L. infantum* y la otra de control de positivo "C" rica en anticuerpo IgG de cabra anti-conejo. El método general es sencillo: se colocan dos gotas de suero en el pocillo y se espera a que la migración capilar pase por encima de los conjugados. De haber anticuerpos de *Leishmania* en el suero, estos se unirán con los conjugados de *L. infantum* y se adherirán a la membrana a través del antígeno que posee dando una coloración rojiza intensa que se interpreta como resultado positivo. Si no hay coloración, no ha sucedido unión de conjugado y el resultado es negativo. Para desarrollar esta prueba se han

usado diversas proteínas recombinantes de conejo, cabra, gato, perros y usados sueros positivos de gatos previamente diagnosticados como enfermos para desarrollar la prueba.

- **RETROVIRUS EN GATOS:** Test rápido para FeL/FIV: Detección simultánea de antígeno de Leucemia Felina. (FeLV) y anticuerpos de Inmunodeficiencia Felina (FIV) en sangre entera, suero, plasma. La técnica es la misma, solo que en vez de anticuerpos contra *L infantum*, detecta el anticuerpo contra los retrovirus causantes de la Inmunodeficiencia y la leucemia felinas.
- **ZOONOSIS VECTORIALES DEL MEDITERRÁNEO:** misma técnica usada para *Leishmania infantum*, detecta la presencia de anticuerpos para *Dirofilaria immitis*, *Ehrlichia canis* y *Anaplasma phagocitophilum* en sangre o plasma canino.

2.2. Inmunofluorescencia Indirecta (IFI):

Detección de anticuerpos específicos mediante la unión en dos etapas, a un antígeno, promastigotes previamente cultivados y, en una segunda etapa, al anticuerpo de Suero de conejo marcado con el tinte de fluorocromo. Las mezclas se realizan mediante diluciones seriadas de 40, 80, 160 volúmenes. Luego se observa al microscopio de luz polarizada. El título es aquel anterior al que el observador no es capaz de detectar promastigotes marcados.

Las pruebas felinas se realizaron en los laboratorios de Urano® Veterinaria en Barcelona, empresa de análisis clínicos con la que se firmó un convenio de colaboración de I+D+i y que aportó los medios para ajustar el diseño de esta prueba de Inmunocromatografía que continúa desarrollándose en estos momentos y están estableciendo la proteína idónea para la reacción. Una parte de las muestras han sido analizadas en los laboratorios de IDEXX® como laboratorio externo independiente. Esta técnica requiere de la interpretación del observador, pero es sencilla, rápida y hay disponibilidad de antígenos en el mercado para realizar la prueba lo que la hace barata y accesible. Cuantifica la cantidad de anticuerpos circulantes en sangre a partir de una muestra periférica por lo que la obtención de la muestra es sencilla, rápida y no requiere de grandes medios para su obtención. Para su categorización se ha firmado un convenio de colaboración entre la Universidad de Málaga y Uranovet® Laboratorios.

El procedimiento se realiza colocando el suero a examinar en unos portaobjetos donde están presentes promastigotes de *Leishmania*. Los anticuerpos eventualmente presentes se fijan a los promastigotes y la positividad se evidencia utilizando anti-anticuerpos fluorescentes. En este caso también es posible determinar el título de anticuerpos utilizando diluciones seriadas del suero a examinar. La sensibilidad y la especificidad de la IFI son cercanas al 100% [7,9,10] y por este motivo es la prueba considerada de referencia por la Organización Internacional de Epizootias. Sin embargo, en esta prueba el componente subjetivo del operador es muy representativo. Al realizar toda la tanda completa de estudios diagnósticos, se podrá realizar una comparativa realista sobre las ventajas e inconvenientes de cada una de ellas. La prueba se llevará a cabo en el Laboratorio de Parasitología del Instituto Nacional de Microbiología, perteneciente al Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) en Majadahonda, Madrid, con el que la Universidad ha firmado un acuerdo de colaboración para esta investigación en particular. En todos los sujetos se repitió la serología cuantitativa para las zoonosis vectoriales del mediterráneo, independientemente del resultado obtenido en la prueba de campo rápida IC.

2.3. ELISA:

El suero por examinar⁵⁴ se coloca en un micro-pocillo recubierto con antígenos de *Leishmania*. En caso de positividad, se aprecia una reacción colorimétrica cuantificable mediante espectrofotómetro y, por tanto, no sujeta a una variabilidad subjetiva asociada al operador. Es una prueba con una especificidad y sensibilidad media-alta (70-100%). La sensibilidad es mucho más elevada si se utilizan múltiples antígenos de *Leishmania*, con lo que aumenta el número de lugares donde se pueden fijar los eventuales anticuerpos presentes en el suero. Además, permite cuantificar los anticuerpos específicos

2.4. Genética molecular (PCR):

El ADN extraído se sometió a una amplificación según protocolo LnPCR, este ensayo de nested-PCR amplifica todas las especies de *Leishmania*. La Diana es un región variable del gen codificante de SSUrRNA, luego se usaron 4 “*Primers*” o cebadores:

R1: 5'- GGT TCC TTT CCT GAT TTA CG - 3'

R2: 5'- GGC CGG TAA AGG CCG AAT AG - 3'

R3: 5'- TCC CAT CGC AAC CTC GGT T - 3'

R4: 5'- AAA GCG GGC GCG GTG CTG - 3'

CONDICIONES PCR MIX: En el laboratorio del ISCIII, la Máster Mix se prepara para varias muestras al mismo tiempo, con dos procesos de ciclado.

Primer ciclado: Colocar en gradilla tubos mini-Eppendorf numerados. La muestra se queda en el laboratorio, mientras en la sala limpia se prepara el Máster Mix (Tabla 11):

Tabla 11: Componentes de la fase de primer ciclado con los “*primers*” R1 y R2).

1ª Reacción	muestra	Añadido	Tubo
H2O	30.6 µL	estéril y destilada	826.2 µL
Buffer	5.0 µL	Biotools Buffer 10X, 2mM MgCl2	135 µL
dNTPmix	1.0 µL	Biotools dNTP mix 10mM	27 µL
R1	1.0 µL	15 pmol/ µL solución de trabajo	27 µL
R2	1.0 µL	15 pmol/ µL solución de trabajo	27 µL
Tth	1.4 µL	Biotools DNA-polymerase-1U/ µL (este en último lugar siempre)	37.8 µL

La mezcla de *primer* se coloca en un soporte a -20°C y se trasladan a la mesa de laboratorio, es decir, no se llevan las muestras a la sala limpia para no contaminar con ADN. Añadimos 40 µL del Máster Mix y 10 µL de muestra y se trasladan al termociclador. Para el control de PCR se utiliza el control + 18 µL de agua y 2 µL de suero positivo. Cada 10 o 20 muestras se coloca un tubo blanco con suero para control negativo. En la sala de Cicladores, se programa la máquina según los ciclos y temperaturas prefijados (Tabla 12)

Programa en el termociclador: 30X

Tabla 12: Programación del primer ciclo

80°C	94°C	94°C	60°C	72°C	72°C	4°C
2min	5min	30seg	30seg	30seg	5min	∞

Tamaño producto final: 603 pares de bases.

Segundo ciclado: Se vuelven a colocar en gradilla tubos de rosca con agua destilada auto clavada y se numeran igual que los del primer ciclado. Se diluyen 25 µL del primer producto de PCR en 1ml de H2O destilada estéril, y se utilizan 10 µL µL de esta dilución (dilución 1/40) como muestra de DNA para la segunda reacción. Se dejar reposar mientras se preparan los primer en la habitación limpia (tabla 13):

Tabla 13: Mezcla y contenido de la segunda tanda de trabajo con los "primers R3 y R4".

2ª Reacción	muestra	Añadido	Tubo para varias muestras
H2O	10.55 µL	estéril y destilada	305.95 µL
Buffer	2.5 µL	Biotoools Buffer 10X, 2mM MgCl2	72.5 µL
dNTPmix	0.5 µL	Biotoools dNTP mix 10Mm	14.5 µL
R3	15 pmol/µL	solución de trabajo	14.5 µL
R4	15 pmol/µL	solución de trabajo	7.25 µL
Tth	1U/µL	Biotoools Tth DNA polymerase	20.3 µL

DNA muestra 10 µL, 25 µLL volumen de reacción total

Programa del termociclador para un tamaño de producto de 353 pares de bases (Tabla 14): 30X

Tabla 14: Programación de la segunda fase de ciclado.

80°C	94°C	94°C	65°C	72°C	72°C	4°C
2min	5min	30seg	30seg	30seg	5min	∞

ELECTROFORESIS PCR: una vez obtenido el ADN amplificado, se mezcla con un colorante fluorescente y se siembra en un gel de electroforesis. La técnica se basa en las propiedades moleculares del tamaño, la forma y el punto isoeléctrico. La muestra se coloca en un lado de un rectángulo de gel polímero poroso compuesto por acrilamida y bis-acrilamida al que se añade un iniciador de la polimerización, para producir redes de poli-acrilamida, todo ello en una matriz a base de agarosa purificada. El gel sembrado se introduce en un tanque de electroforesis, donde las moléculas migrarán a través del polímero desplazándose y colocándose ordenadamente en función de sus características antes mencionadas. Luego, el gel es extraído del contenedor y se coloca en una base que se introduce en un revelador del que se obtiene una foto donde la migración queda fijada. En la imagen se obtienen unas líneas fluorescentes donde

quedan más intensos los brillos que corresponden a mayor cantidad de moléculas (las secuencias previamente cebadas en el proceso de ciclado). Si no hay presencia de dichas moléculas, el gel no queda coloreado, si hay presencia de las secuencias de nucleótidos buscados, estos se acumulan en la línea correspondiente a su punto isoeléctrico y darán una línea intensamente fluorescente, resultando la muestra positiva (Figura 28).

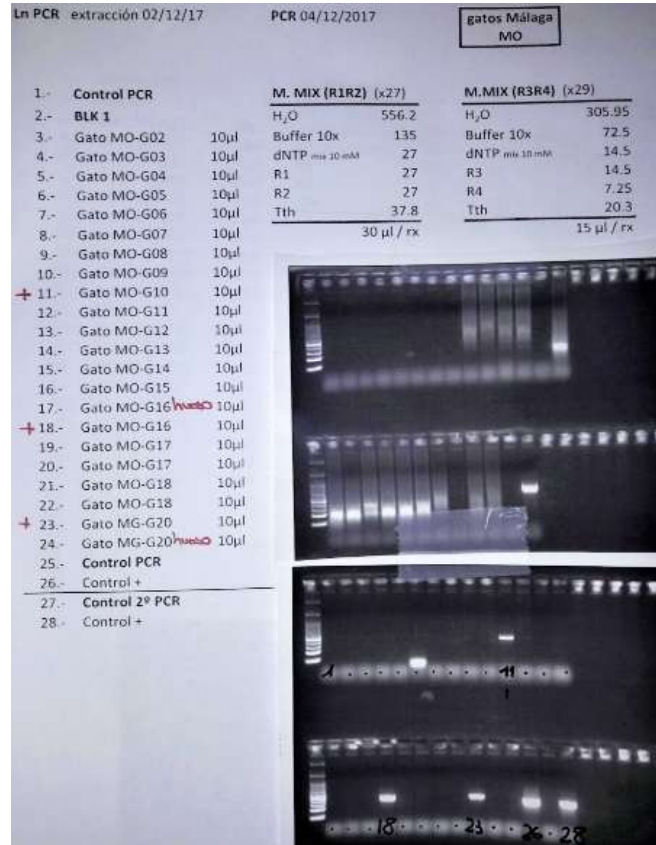


Figura 28: Ejemplo de una tanda de muestras de Médula ósea felina con resultado positivo en dos de las muestra

2.5. Microscopía clásica:

De cada muestra se separó una porción para realizar la visualización directa con microscopio óptico. Los raspados y biopsias se extendieron sobre el portaobjetos, mientras que los aspirados y líquidos se colocaron mediante frotis. Luego de fijarlos con alcohol, se les aplicó una tinción doble comercial (Diff-Quick®), que permite teñir intensamente de azul-violáceo los amastigotes, haciéndolos muy visibles en el interior de los macrófagos o fuera de ellos. El citoplasma de las células hospedadoras en cambio se ven en un tono más rosado, permitiendo la identificación inequívoca de los parásitos (Figura 29).

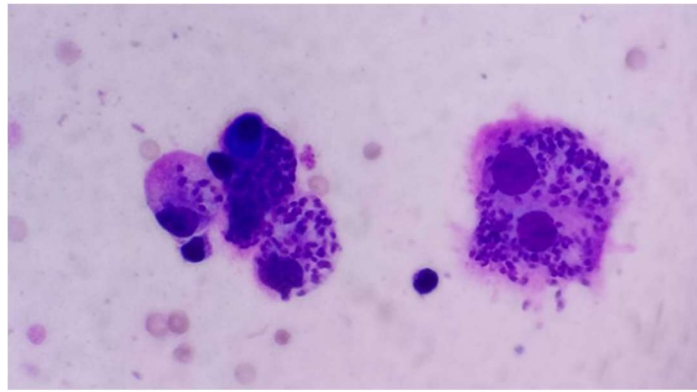


Figura 179: Amastigotes en el citoplasma de macrófagos. Fuente propia

III MÉTODOS ESTADÍSTICOS

1. ORIGEN DE LOS DATOS

- **Red RENAVE y Paquete Mínimo Básico de Datos Hospitalarios:** Casos declarados en humanos, que las mismas fuentes oficiales consideran muy por debajo de la cifra real, ya que la mayoría de los casos cutáneos no llegan ni a detectarse/diagnosticarse.
- **Informe RAIA:** Casos positivos en perros (no existe información oficial sobre gatos) declarados por los veterinarios que realizaron el diagnóstico. A nivel oficial se considera que la cantidad total está por debajo de la real ya que no todos los veterinarios declaran la enfermedad y en muchos casos no llega ni a diagnosticarse.
- **Paquete de datos obtenidos durante el estudio:** La población objeto de estudio está compuesta por perros y gatos seleccionados en diversos lugares. Dado el tamaño de la muestra (unos 6000 animales), los resultados pueden ser considerados relevantes y un buen marcador de la situación real existente.

Centros de acogida temporal de animales (Figura 30):

- Parque Zoosanitario Municipal de Rincón de la Victoria.
- Parque Zoosanitario de la Mancomunidad de la Axarquía.
- Parque Zoosanitario Este de la Diputación de Málaga.
- Parque zoosanitario de Marbella y San Pedro de Alcántara
- Parque Zoosanitario de Mijas y Fuengirola.
- Parque Zoosanitario Municipal de Torremolinos.

Centros veterinarios que han colaborado en la atención/hospitalización de animales con Leishmaniosis que forman parte de este estudio o que han proporcionado casos para seguimiento y toma de muestras:

- Clínica Veterinaria Málaga.
- Clínica veterinaria Animal Friend (Vélez Málaga).
- Clínica veterinaria Colmillos y Garras.
- Francisca Rosselló Rigo, Veterinaria Clínica.
- Clínica Veterinaria Cuatro Gatos.
- MiVet Hospital Veterinario Málaga este, Vélez Málaga.
- Clínica Veterinaria Nerja, Málaga.
- Clínica Veterinaria San Fernando, Málaga.
- Hospital Veterinario de Referencia Blue Care Partners, Mijas.

Protectoras y asociaciones con presencia o actividad en Málaga que han proporcionado casos o sujetos para toma de muestra y seguimiento de casos y han colaborado económicamente en la financiación de este estudio:

- Asociación protectora de animales “Greyhound Friends UK”, con sede en Reino Unido y presencia en Costa del Sol.
- Asociación Protectora de Animales “Compañeros en el camino”, son presencia en Torremolinos y Benalmádena.
- Asociación Protectora de Animales “Axarquía Animal Rescue” con sede en Reino Unido y Alemania y actividad en la Comarca de la Axarquía.
- Asociación “Tikas Dogs with Leishmania needing Homes”, con presencia en la UE.
- Asociación “Podenco Pair”, con sede en Reino Unido y actividad en Málaga.
- Asociación Protectora de Animales “Pedigree dogs for Adoption and wanted in Spain”, con sede en Reino Unido y actividad en Málaga.
- Refugio de animales “Triple A Marbella”, que ha financiado una parte importante de esta investigación y proporcionado sujetos al estudio.
- Asociación Protectora de Animales “Give a Dog a Home Rescue” con sede en Reino Unido y actividad en Málaga que aparte de sujetos, también ha participado en la financiación de este proyecto.
- “Anihelp Tierhilfe”, con sede en Berna, Suiza y actividad en toda la UE.
- “Hundesuche Bundesweit und Grenzländer” UE.
- Hunde ohne Zukunft, Holanda.
- Hund sucht Hütte - retten statt züchten, Austria.
- Brühler Samtpfotenhilfe e.V., Alemania.

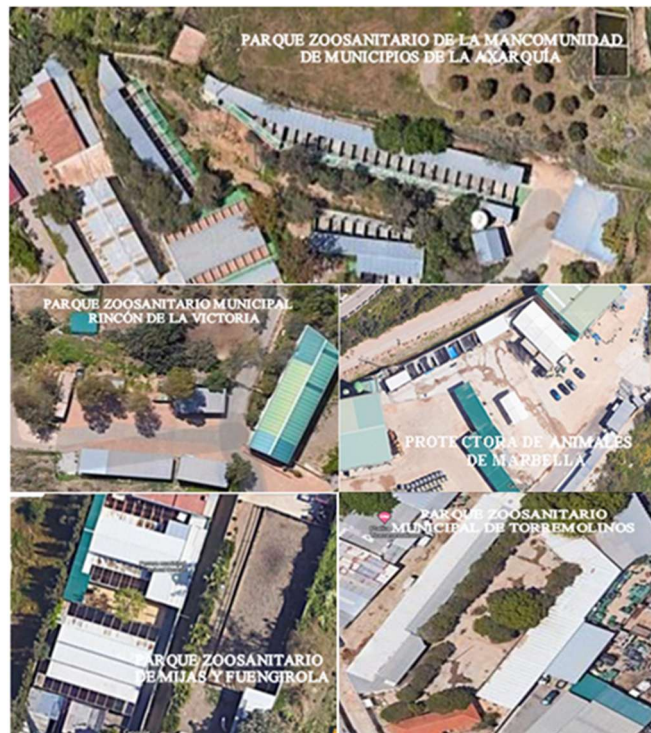


Figura 30: Zonas de recogida principal de muestras. Fuente Google maps

2. TRANSFORMACIÓN Y TRATAMIENTO ESTADÍSTICO DE LOS DATOS

Se ha usado la herramienta Excel_Ink (Paquete Microsoft Office 365®) para anotar todos los resultados, codificarlos y analizarlos. Todos los cálculos se realizaron en doble listado, uno informático y otro manual para comparar resultados y detectar fallos.

En la tabla general, se anotaron los datos obtenidos y a partir de ahí se crearon nuevas tablas con los datos ordenados por columnas, según el interés o relación buscada.

Al tratarse de resultados en su mayoría analíticos, cada valor daba el resultado de variables continuas, lo que dificultaba los cálculos estadísticos cuando, en realidad, la información necesaria era si los valores se ajustaban a la media fisiológica para la especie en un animal sano o si el valor estaba por encima o por debajo de esa media. Para ello, a cada resultado se le adjudicó un valor numérico de Cero (0), si el valor de la variable estaba dentro de la media de animales sanos; Uno (1), si el valor que tomaba la variable estaba por encima de la media de animales sanos, es decir, un incremento patológico del valor de la variable y meno uno (-1), para aquellos valores de cada variable que estuviesen por debajo de la media, es decir, valores disminuidos patológicamente. Las columnas fueron ordenas por fracción.

- **Variables discretas:** 0 para resultado negativo, 1 para resultado positivo. Dentro de este grupo están las técnicas de serología, de microscopía, de PCR, presencia o no de signos clínicos como pérdida de peso, presencia de nódulos cutáneos o linfadenopatías.
- **Variables continuas:** Tras agrupar los resultados en una tabla con el valor que toma la variable en cada sujeto, se ha comparado cada resultado puntual con el valor o rango de valores aceptados como fisiológicos. Dentro de este grupo están los valores de GOT o GLU. Los resultados se consideraron como altos, bajos o fisiológicos y se les asignó un valor teórico de -1 para resultado negativo (por ejemplo, linfopenia), 0 para resultados dentro de la normalidad fisiológica (por ejemplo, Hematocrito en el rango normal) y 1 para incrementos de magnitud de la variable (como hiper-gammaglobulinemia).

Cálculo del Ratio de portadores/enfermos, tendencias, Cálculo de la media, mediana, moda, varianza y Desviación típica. En una distribución normal, aproximadamente el 68% de los datos se hallan comprendidos entre una desviación estándar (SD) a ambos lados de la media, casi el 95% de la distribución se encuentran entre dos SD a ambos lados de la media, y, aproximadamente, el 99,7% de los datos están entre tres SD a ambos lados de la media. A partir de esta propuesta, se calculó la media, la mediana y la moda de los datos obtenidos para tomar consciencia de cuáles fueron las medidas de la tendencia central. La mediana, al estar menos afectada que la media por los valores atípicos, aportó una mejor visión de la tendencia central en los datos sesgados.

También se calcularon tanto el intervalo o recorrido, como la desviación estándar y la varianza ya que las tres constituyen una forma de apreciar la dispersión o diseminación del conjunto total de datos obtenidos. Todos estos cálculos se realizaron

con la agrupación de datos medios de cada mes en todo el tiempo que duró la fase de recogida de muestras.

Se fueron anotando los resultados de cada sujeto en una tabla, por orden cronológico y se estudiaron los casos uno a uno, considerando positivos a aquellos que cumplieren los tres puntos del diagnóstico: signos clínicos en la exploración, analítica compatible y, al menos, una técnica diagnóstica (serología, microscopía o PCR) positiva. Se listaron todos los sujetos considerados infectados y se tabularon los resultados de todas las variables clínicas recogidas asignándoles un valor teórico en función del tipo de variable.

Partiendo de los datos de las fuentes oficiales consultadas y los obtenidos durante el estudio, se han calculado, por un lado las tasas relativas de crecimiento intermensual, $TRC = \sum_{M12}^{M1} \left[\left(\frac{M2-M1}{M2} \right) \right]$, así como la suma de las prevalencias medias anuales para incluir los cambios de valor a raíz del Confinamiento de 2020 de cada comarca por separado y se han calculado las tasas de variación interanual (r) tanto para dichos periodos antes y después de la pandemia, como para evaluar la evolución creciente o decreciente de la incidencia en cada territorio. De esta manera se han homogenizado los datos de dos poblaciones distintas, los resultados se han tabulado y luego se han representado gráficamente mediante un histograma $r_{t+t/t} = \left[\frac{y_{t-1}-y_t}{y_t} \right]$ donde se le resta al valor del año anterior Y_{t-1} el valor del año en curso Y_t y se divide dicha diferencia por el valor del año en curso. El resultado se expresa en tantos %. Luego se comparan los resultados de ambas áreas geográficas asignando un color para cada área en una representación gráfica.

- 2.1. Para el cálculo de la Prevalencia:** Con los datos obtenidos se obtuvieron las medias mensuales de los animales infectados sin síntomas y los enfermos, así como de los sanos y se elaboró una tabla de evolución media anual. Se agruparon en infectados y no infectados por años y se compararon con los datos proporcionados por fuentes oficiales para Seres Humanos. Mediante la representación gráfica de los resultados obtenidos en comparación con los publicados oficialmente.
- 2.2. Para el estudio de la Ecología** La información sobre los datos geográficos, climatológicos y demográficos provienen de fuentes oficiales. Los datos obtenidos durante el muestreo se ordenaron en dos tablas, una por cada zona geográfica, y se agruparon en meses y años para compararlos entre sí. Los resultados de las muestras obtenidas se agruparon en dos tablas diferentes, una para la zona Oeste, preminentemente Residencial y Turística y la zona Este o Axarquía, agraria y residencial. En la primera columna se anotó la fecha de ingreso al estudio. En la segunda columna el número de etiqueta o identificación del sujeto. En las siguientes columnas se anotaron los resultados de los análisis realizados a cada tipo de muestra en orden a origen y aplicación.

2.3. Para el estudio de los hospedadores domésticos: Se calculó la media general de los resultados dividido entre los años de estudio comparado con los datos aportados por las autoridades y dividido por el número total de años estudiados. De esta manera se igualaron las categorías de los datos y su relación porcentual con respecto a la población. Los datos buscados y obtenidos fueron ordenados por la fracción y el tipo de variable (tabla:

Variables continuas: Aquellas cuyo resultado consiste en una numeración con hasta tres decimales, procedentes todas de analíticas de laboratorio (Tabla 15).

Tabla 15: Variables continuas según el proceso analítico.

Fracción sanguínea	Nombre de la Variable
Proteinograma: proteínas separadas por electroforesis en función de su peso molecular.	Proteínas Totales (PT)
	Albúmina (ALB)
	Cociente Albúminas/Globulinas (A/G)
	Globulinas Totales (GT)
	Globulinas Alfa 1 (A1)
	Globulinas Alfa 2 (A2)
	Globulinas Beta (BG)
	Globulinas Gamma (GG)
Hemograma Ordenados por fracciones y función fisiológica	Leucocitos (LEU)
	Neutrófilos Núcleo en Cayado (CY)
	Neutrófilos Segmentados (SG)
	Basófilos (BAS)
	Eosinófilos (EOS)
	Linfocitos (LINF)
	Monocitos (MON)
	Hematocrito (HTO)
	Hemoglobina (HB)
	Recuento de eritrocitos (GR)
	Recuento de Reticulocitos (RET)
	Recuento de Plaquetas (PLQ).
	VCM
	HCM
	CHCM
	RDW
VPM	
Bioquímica Componentes del suero/plasma de relevancia en la valoración del estado del paciente	Urea (BUN),
	Creatinina (CREA)
	Dimetil-arginina Simétrica (SDMA)
	GOT (AST)
	GPT (ALT)
	Fosfatasa Alcalina (ALKP)
	Glucosa (GLU)

Variables discretas:

- **Serología:** Nivel de anticuerpos frente a *L. infantum* presentes en sangre de los sujetos, con tres categorías discretas, Cero para ausencia total de anticuerpos (0), Uno (1) para sujetos con niveles serológicos considerados patológicos y Dos (2) para aquellos sujetos con serología positivas pero por debajo del punto de corte establecido por el laboratorio para considerarlos enfermos, inclusión necesaria ya que determinadas formas de presentación o estados de la enfermedad pueden arrojar niveles bajos de anticuerpos, a pesar de tener activa la enfermedad. Este mismo método se aplicó para el resto de las enfermedades infecciosas de cada especie.
- **Amplificación por PCR:** Resultados correspondientes a la presencia de material genético del parásito, con categorización de Cero (0) para la ausencia del parásito en la muestra y el momento de su extracción y Uno (1) para indicar la presencia del parásito. Las muestras se tomaron de Bazo (BZ), Ganglios Linfáticos (GGL), Piel (PIEL), Mucosas (MUC), Conjuntiva (CNJ) y Paquete hepato-esplénico en fetos no natos (BB).
- **Citología:** Observación microscópica bajo tinción comercial para detectar la presencia de amastigotes, con categorización cero si no hay ningún amastigote visible o uno si se detecta alguno.

2.3.1. Para los objetivos en la especie Canina.

a. **¿Existen Comorbilidades de tipo vectorial que incrementen el potencial infectivo de los portadores?:** Se incluyeron análisis de aquellas enfermedades que suelen presentarse con más frecuencia, las llamadas “Zoonosis Vectoriales del Mediterráneo” (ZVM o MVBZ por sus siglas en inglés), que conforman un grupo de enfermedades de las que los perros y gatos son reservorio y que conllevan un potencial riesgo epidemiológico para la Salud Pública. Para su inclusión, se priorizaron aquellos cuyo diagnóstico fuese compatible económica y metodológicamente con los empleados para la detección de la leishmaniosis en los sujetos reclutados. Se procedió a ampliar la tabla estadística con los resultados obtenidos en cada animal. Se incluyeron aquellos sujetos que, siendo positivos a otras enfermedades, no lo fueron en Leishmaniosis y así poder establecer si existe una relevancia real entre la infección por *L. infantum* y las otras enfermedades mediante una comparación directa usando el Coeficiente de Correlación. Al tratarse de pruebas serológicas, las variables eran de tipo discreto por lo que se les asignó una categorización de Cero para resultados negativos y Uno para resultados positivos. Se tabularon los sujetos infectados de cada una de las zoonosis vectoriales incluidas en el estudio, Anaplasmosis, Babesiosis, Ehrlichiosis, Dirofilariosis y se ordenaron según las comorbilidades presentadas (Tabla 16)

Tabla 16: Combinaciones de Zoonosis del Mediterráneo.

	ANA.	BAB.	EHR.	DIROF.	LEISH.
ANA.	ANA. SOLA	ANA. + BAB.	ANA. + EHR.	ANP. + DIROF.	ANA. + LEISH.
BAB.		BAB. SOLA	BAB. + EHR.	BAB. + DIROF.	BAB. + LEISH.
EHR.			EHR. SOLA	EHR. + DIROF.	EHR. + LEISH.
DIROF.				DIROF. SOLA	DIROF. + LEISH.
LEISH.					LEISH. SOLA

Tabla 17: diseño de la tabla de comorbilidades

A continuación, se tabularon también aquellos sujetos que presentaron dos o tres enfermedades al mismo tiempo. Con los datos anotados en la tabla de frecuencias, se representaron las combinaciones en una gráfica que mostrase la proporción entre estas relaciones o comorbilidades.

b. **Cálculo del riesgo epidemiológico sobre la salud pública de la globalización y las adopciones internacionales:** Los datos recopilados fueron ordenados y comparados con el destino de los animales adoptados en países del norte de Europa, creando un mapa de puntos críticos donde puedan aparecer brotes si los portadores entran en contacto con vectores competentes. Se han calcularon la medias mensuales y anuales, así como los incrementos interanuales de cada enfermedad y los datos se extrapolaron a la información disponible sobre adopciones internacionales. Se han proyectado las tendencias de crecimiento (negativo, nulo o creciente) de cada una de ellas para un futuro próximo. Los sujetos infectados fueron ordenados en columnas según su país de destino y después se exportaron los datos a un mapa de riesgo donde se incorporaron los hábitats actuales y potenciales del vector en función del incremento de temperaturas debido al cambio climático. El número total de sujetos exportados se ponderó para obtener una línea de tendencia y calcular la población potencial de infectados disponibles en los distintos territorios. Estos cálculos, incluyendo también al resto de zoonosis vectoriales estudiadas para las comorbilidades, se presentaron en el Congreso andaluz de Congreso Andaluz de Microbiología (Málaga 2018) así como una comunicación con una muestra más extensa que se presentó en el Congreso Andaluz de Salud Pública Veterinaria (Córdoba, 2021 y Málaga 2022).

c. **Estudio epidemiológico del efecto del confinamiento por la pandemia de SARS-CoV-19:** A mitad del estudio se declaró la pandemia de coronavirus que alteró sustancialmente el enfoque y afectó gravemente a los datos obtenidos, sobre todo al cálculo de tendencias, ya que el aislamiento de los animales y sus propietarios varió la epidemiología general. Es por ello por lo que se tomó la decisión de agrupar los datos en fracción Prepandemia y fracción Pandémica y se compararon los resultados.

2.3.2. Para los objetivos en la especie Felina:

a. Valoración de las técnicas diagnósticas

Una vez categorizados los resultados, se enfrentaron por parejas entre sí y frente a otras pruebas como PCR, serología y Clínica. Se agruparon los resultados en una tabla comparativa de los métodos elegidos (en esta fase se eliminó la ELISA y se valoró solo IFI e IC/LF).

Del mismo modo anterior, se enfrentaron los resultados de las PCR de los distintos órganos con los resultados de los PAAF de esos mismos órganos vistos al microscopio.

Luego se compararon estos resultados con la clínica y la analítica y se enfrentaron los resultados mediante el cálculo de correlación.

X	Y
A	A
B	B
C	C
N	N

$$r = \frac{\sum[(x_i - \bar{x}) \times (y_i - \bar{y})]}{\sqrt{\sum(x_i - \bar{x})^2 \times \sum(y_i - \bar{y})^2}}$$

$$\bar{X} = \frac{\sum(a + b + c \dots + n)}{\mu}$$

$$\bar{Y} = \frac{\sum(A + B + C \dots + N)}{\mu}$$

Donde μ es el tamaño total de la muestra, y las letras alfabéticas, los valores que toma cada variable (técnica serológica X, clínica, microscopía y genética Y) en cada sujeto.

Se realizó el cálculo de la prevalencia de sujetos infectados respecto a los enfermos clínicos. Para la valoración de enfermos frente a infectados, se tomaron como referencia los valores tanto de perros como de seres humanos, ya que la infección, cuando avanza a enfermedad clínica, es de esperar muestre la misma patogenia y desarrolle los mismos síntomas clínicos en todas las especies al tratarse del mismo parásito. En este caso, se tomaron todas las variables y se tabularon por cada sujeto adjudicándoles un valor teórico para el cálculo de frecuencias (Tabla 18).

Tabla 18: Cálculo de las frecuencias de cada variable.

SUJETO	VALOR	FRECUENCIA ABSOLUTA f_i	FRECUENCIA RELATIVA $h_i\%$
$n_1, n_2 \dots n_{6472}$	$(N_n < a) \rightarrow -1$	$\sum_{N=-1} [-(N_1 + N_2 \dots + N_n)]$	$\frac{f_i}{\sum N_{at}} \times 100$
	$(a < N_n < b) \rightarrow 0$	$\sum_{P=0} (N_1 + N_2 \dots + N_n)$	$\frac{f_i}{\sum_{\substack{N > a \\ N < v}} Nt}$
	$(N_n > b) \rightarrow 1$	$\sum_{R=1} (N_1 + N_2 \dots + N_n)$	$\frac{f_i}{\sum N_{bt}} \times 100$

Donde N es cada sujeto individual, N, P y R la medida que toma ese sujeto en particular para la variable en curso, a y b son los valores mínimo y máximo respectivamente que delimitan el rango de valores “fisiológicos” o sanos de la variable, valores por debajo de a se les categoriza como **-1**, valores dentro del rango \overline{ab} son categorizados como **0** y valores por encima de b se categorizan como **1**. A continuación se suman todos valores iguales, obteniéndose las **frecuencias absoluta** (f_i) y su proyección porcentual o **frecuencia relativa porcentual** $h_i\% = \frac{f_i}{N} \times 100$, asignándose así una frecuencia relativa para cada variable recogida, ya agrupadas en valor positivo, negativo o neutro. Los resultados se agruparían por tipo de análisis (hemograma, bioquímica, proteinograma...) y se representarían por separado en polígonos de frecuencia horizontal en el que se aprecia la incidencia de cada variable y su relación con las demás.

Ahora bien, ¿se influyen las unas a las otras? Para esa pregunta, había que comprobar la correlación entre variables, tanto las correlaciones esperadas, como las hipotéticas (resultados felinos). Esto se calculó mediante la prueba de Chi cuadrado proponiendo los resultados conocidos en perro como hipótesis para gato:

$$X^2 = \sum \frac{(f_o - f_e)^2}{f_e}$$

Siendo f_o la frecuencia observada y f_e la frecuencia esperada.

A Partir de ahí se estableció la hipótesis:

H₀ supone que las variables son dependientes una de otra.

H₁ supone que las variables son independientes.

Se calcularon las frecuencias esperadas f_e : producto de multiplicar el total de la fila por el total de su columna de valor y dividirlo por el tamaño de la muestra, según la tabla de

contingencia de la que representamos un ejemplo de comparación entre los niveles de albúmina sérica con los de gammaglobulina sérica (Tabla 19):

Tabla 19: Ejemplo del cálculo del enfrentamiento de dos variables con tres posibles resultados, la gammaglobulinemia y la albuminemia.

Gammaglobulinemia Vs Albuminemia	Hipo-gamma- globulinemia GG = -1	Normo-gamma- globulinemia GG = 0	Hiper-gamma- globulinemia GG = 1	TOTALES DE FILA
Hipoalbuminemia ALB = -1	a	b	c	$\sum a + b + c$
Normoalbuminemia ALB = 0	d	e	f	$\sum d + e + f$
Hiperalbuminemia ALB = 1	g	h	i	$\sum g + h + i$
TOTALES DE COLUMNA	$\sum a + d + g$	$\sum b + e + h$	$\sum c + f + i$	N

Tabla 20: Tabla matriz de contingencia como ejemplo de cálculo, en este caso la Gammaglobulinemia enfrentada a la Albuminemia.

A partir de aquí calculamos las sumas de filas y columnas:

$$C_1 = \left[\left(\sum a + d + g \right) \times \left(\sum a + b + c \right) \right] \times 10^{-2}$$

$$C_2 = \left[\left(\sum b + e + h \right) \times \left(\sum a + b + c \right) \right] \times 10^{-2}$$

$$C_3 = \left[\left(\sum c + f + i \right) \times \left(\sum a + b + c \right) \right] \times 10^{-2}$$

$$C_4 = \left[\left(\sum a + e + g \right) \times \left(\sum d + e + f \right) \right] \times 10^{-2}$$

Obteniéndose finalmente la suma de todas ellas:

$$X^2 = \left[\frac{(a - C_1)^2}{C_1} \right] + \left[\frac{(b - C_2)^2}{C_2} \right] + \left[\frac{(c - C_3)^2}{C_3} \right] \dots \left[\frac{(i - C_9)^2}{C_9} \right]$$

Luego se determina el X^2_c (crítico), sabiendo que los datos están en f =3 filas y a=3 columnas, calculamos el **grado de libertad** k

$$k = (f - 1) \times (a - 1) = 4$$

Y el nivel de significancia del 5%, para enfrentar hipótesis damos una confianza del 5%, $\alpha=0.05$ y $P_1=0.95$; así se puede buscar en las tablas específicas el $X_{c^2_{4;0.05}}$

Buscamos el valor en las tablas y lo enfrentamos al resultado de X^2

- Si $X^2 < X_c$ (**crítico**), las variables están vinculadas
- si $X^2 > X_c$ es mayor, no hay vinculación.

Esto se realizó con todas aquellas variables que mostraron significancia, es decir, cuyas frecuencias se hallaban parejas en repetidos individuos portadores, como el ejemplo citado del binomio albuminemia-Gammaglobulinemia, urea-creatinina, etc.

b. Diseño de un algoritmo diagnóstico felino: Cada una de las variables alteradas en una frecuencia con desviación de la media podría ser indicativa de la enfermedad, por ello, con todos los datos ordenados se procedió a realizar una comparación entre variables, partiendo de los mismos criterios usados para el diagnóstico en Seres Humanos y Perros y extrapolando dichos criterios a la hora de enfrentar estadísticamente el valor de cada variable en cada animal. Se calculó el valor Chi cuadrado y el coeficiente de correlación de Pearson (según tipo de variable) y se sometió a cada variable a una comparación dentro de su mismo grupo estadístico (variables clínicas, analíticas, genéticas y otras pruebas), luego se enfrentaron los grupos entre sí para la elaboración del algoritmo diagnóstico.

Aunando los datos ordenados y tabulados, hechas las gráficas y calculados los parámetros, se estableció un algoritmo de diagnóstico fundamentado tanto a las frecuencias de presentación de las variables contempladas como la correlación y la significancia entre ellas. Basándonos en los datos obtenidos, se enfrentaron los conjuntos de datos que presentaron una significancia alta (directa o inversamente proporcional) por encima de 0.6 puntos y se agruparon por tipo de signo clínico, luego se agruparon en confrontación de frecuencias y a partir de ahí se diseñó el algoritmo.

SECCIÓN 5ª
RESULTADOS EN FUNCIÓN DE LOS OBJETIVOS PARCIALES

1. PREVALENCIA: La prevalencia en humanos tiene una distribución geográfica correlativa a la prevalencia en el reservorio principal, siendo Málaga una provincia con una alta presencia tanto en perros como en humanos, el patrón se repite en otras provincias e incluso comunidades autónomas (como Baleares) aunque hay algunas excepciones que pueden ser explicadas por la movilidad de la población, sobre todo en época estival en la que una alta proporción de la población pasa algún tiempo en los lugares de alta prevalencia tanto del hospedador humano como canino (Figura 31).

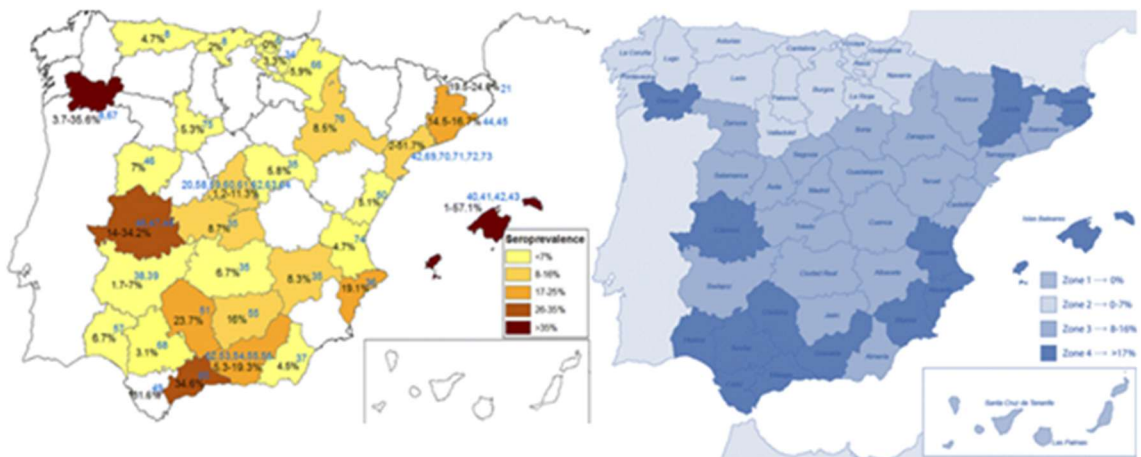


Figura 31: Casos declarados en perros (mapa en marrón) y los declarados en personas (mapa en azul) en el que se aprecia la correlación entre reservorios animal y Humano para la Provincia de Málaga en la última década.

2. ECOLOGÍA: Diferencias entre los modelos agrario y turístico-urbano ¿Las diferencias entre el modelo urbano y el agrario afectan a la prevalencia? Si observamos una comparativa simple entre infectados y sanos, podemos apreciar que hay más infectados que sanos en su totalidad, pero es que, además, la proporción de los infectados en la Comarca de la Axarquía es mucho mayor que en la Costa del Sol (Figura 32).

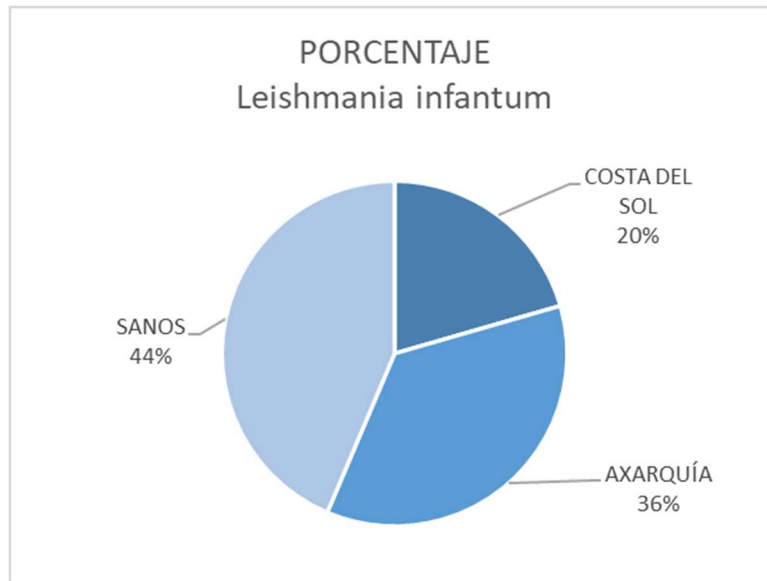


Figura 32: Proporción de infectados y sanos

Depurando los resultados encontramos que además de doblar la proporción de infectados en la Comarca de la Axarquía, el riesgo de infección es más del doble para un perro que resida en esta área respecto a uno que viva en la Costa del Sol (Figura 33).

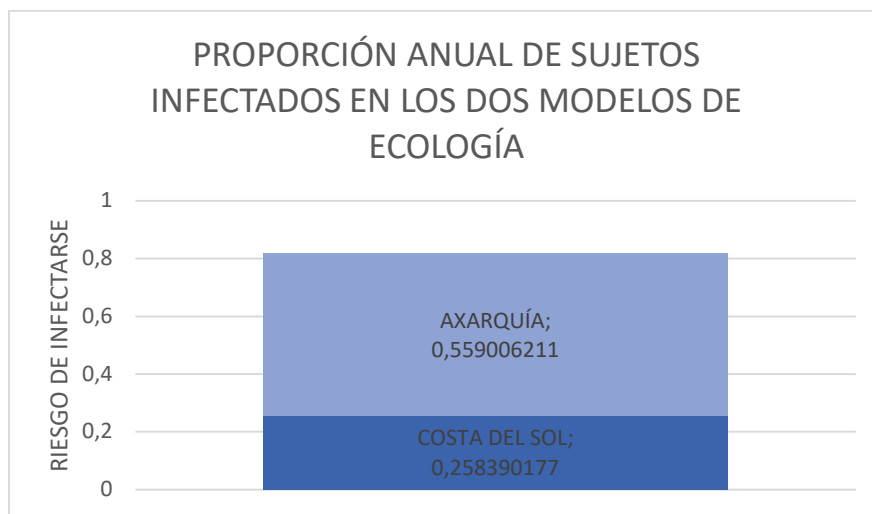


Figura 33: Riesgo de infección en función de la proporción de infectados entre ambos territorios

Si afinamos más el estudio de los datos, aunando los resultados de cada mes por separado (recordemos que se trata de una infección dependiente de la actividad de un vector artrópodo al que la climatología afecta en su ciclo vital y con un periodo de prepatencia de entre uno y dos meses), comprobamos que la dispersión respecto a la media de infectados, en cada mes del año, es diferente en cada área geográfica, pero además, cuando intentamos establecer una regresión lineal sobre cada zona geográfica, los datos brutos anuales se alejan mucho de la recta y el coeficiente de ajuste R^2 es muy bajo en ambos casos, 0.24 y 0.33, por lo que ambas líneas no son demasiado predictivas de cómo va a evolucionar la enfermedad en los reservorios en un futuro. No obstante,

las dos rectas están muy cercanas, lo que indica que la tendencia, aunque incierta desde el punto de vista de predicción, sí que es similar en ambos territorios puesto que se mantienen casi paralelas. El coeficiente de correlación en este caso es de 0.56, con cierta relevancia que confirma la similitud de comportamiento evolutivo. Es evidente que, al estar en la misma franja climática, aunque la prevalencia de infectados sea distinta, el comportamiento de la infección siga patrones similares si los vectores están sujetos a las mismas presiones climáticas y su actividad es similar en ambas zonas para cada periodo de tiempo concreto (figura 34).

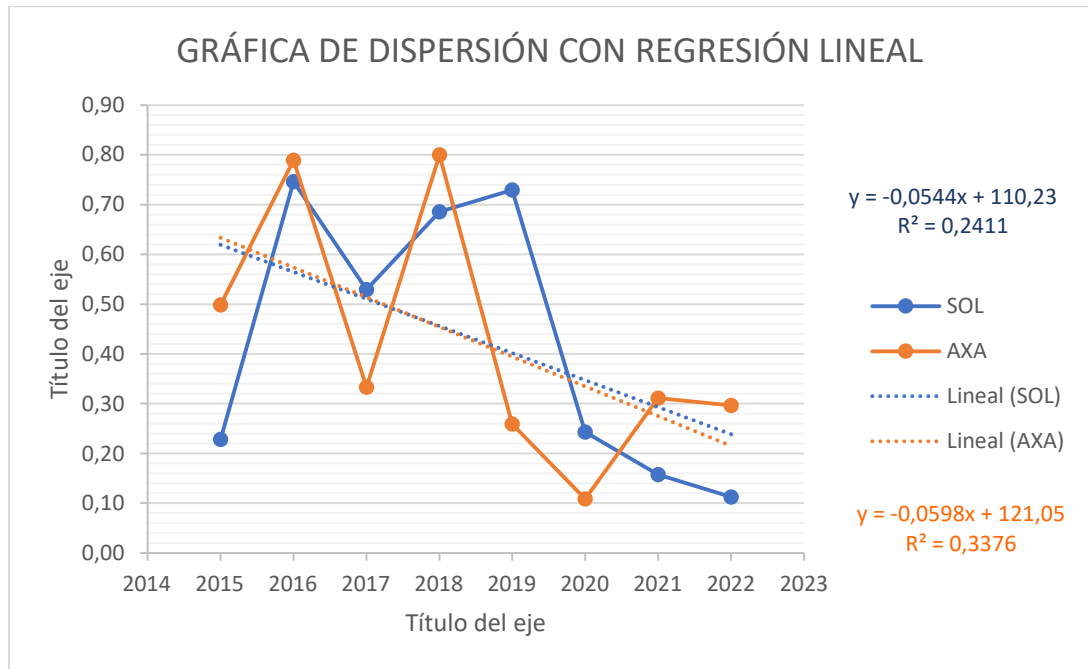


Figura 34: Dispersión y regresión, tendencias por territorios y temporada

Esto también se cumple cuando aplicamos el cálculo de la media móvil, la incidencia en ambas costas es distinta, pero siguen patrones *moderadamente similares* en su evolución a lo largo del tiempo. En ambas zonas, las tendencias se desploman a partir del confinamiento y sólo a finales del año 2022 comienza a notarse un repunte en la incidencia de la Comarca de la Axarquía, mientras que la Costa del Sol continúa con una tendencia a la baja (Figura 35).

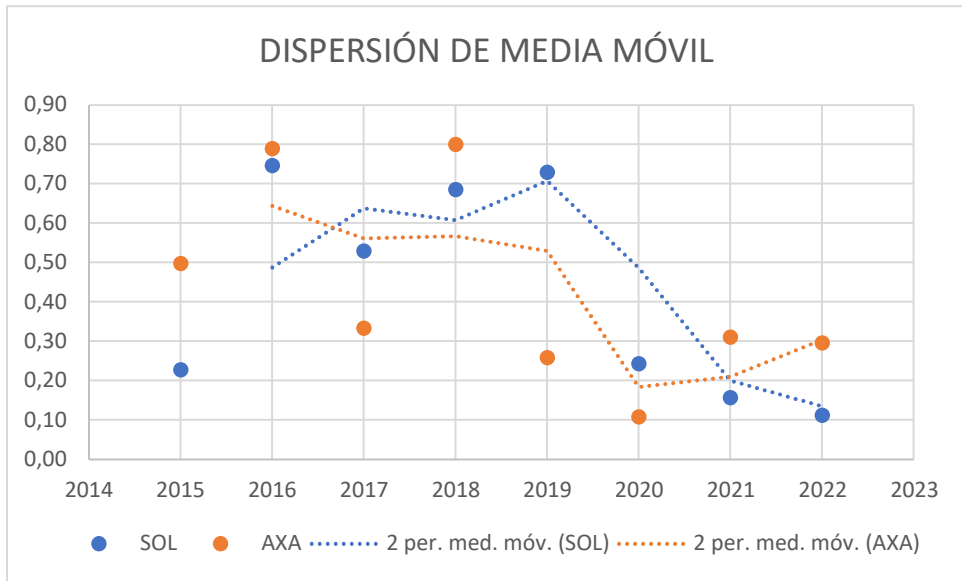


Figura 35: dispersión media móvil

Con respecto a la climatología, la gran variabilidad en cuanto al periodo de prepatencia, unido a la dependencia del binomio parásito-vector en el que la situación inmunológica del hospedador es vinculante al avance de la infección, nos da una dispersión intermitente con grandes desviaciones respecto a la media pero, comparando ambas regresiones lineales, vemos que el comportamiento es homogéneo antes y después de la pandemia, es decir, el comportamiento general de la infección no ha variado (Figura 36).

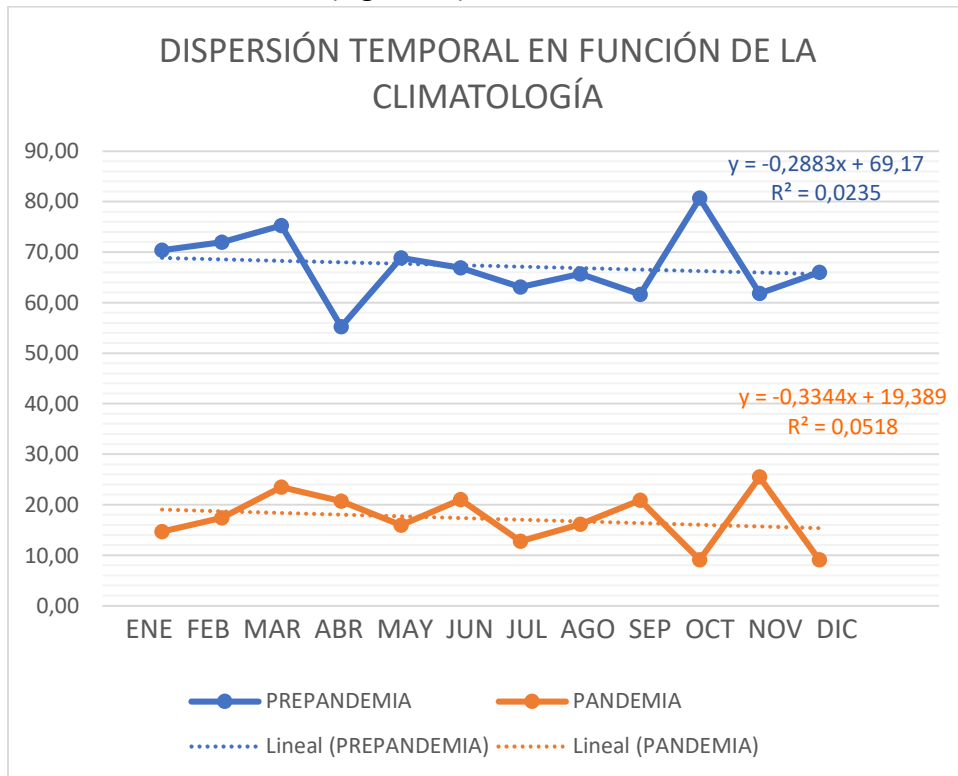


Figura 36: Comportamiento en función de la climatología.

Hospedadores domésticos: Estado epidemiológico en ambas especies:

3. OBJETIVOS EN EL PERRO La incidencia, pese a sufrir altibajos entre años, se mantiene en el tiempo siempre por encima del 50% de sujetos infectados, hasta llegar al confinamiento, cuando ésta se sitúa por debajo del 25%, algo que obliga a esperar al menos tres años más para comprobar si la tendencia se invierte o se estabiliza. Esta bajada de reservorios infectados da una oportunidad de estudiar el crecimiento de la enfermedad en los próximos años y comprobar el patrón de crecimiento.

3.1. Zoonosis vectoriales comórbidas: Qué otras zoonosis vectoriales portan los cánidos y qué relación hay con la leishmaniosis.

Comparando el porcentaje anual de sujetos expuestos a los microorganismos responsables de las 4 principales zoonosis verticales del mediterráneo, encontramos que la proporción entre sujetos expuestos solo a contagiarse de Babesiosis o Ehrlichiosis es el doble de los que pueden contraer estas enfermedades además de leishmaniosis, es decir, ambos rondan algo menos del 50% de probabilidad de sufrir ambas enfermedades a la vez. Sin embargo, hay una proporción de 3:1 en el caso de Anaplasmosis, parece que dicha enfermedad es menos común encontrarla asociada a leishmaniosis que las otras dos enfermedades transmitidas por garrapatas (Tabla 21).

Tabla 21: Porcentaje anual de zoonosis en portadores exportados.

% ANUAL de expuestos				Proporción	Riesgo comparado
Leishmaniosis + Anaplasmosis	2,18	Anaplasmosis	6,64	3,04	67,12%
Leishmaniosis + Babesiosis	12,64	Babesiosis	26,55	2,10	52,40%
Leishmaniosis + Ehrlichiosis	9,64	Ehrlichiosis	19,55	2,03	50,70%
Leishmaniosis + Dirofilariosis	2,55	Dirofilariosis	2,00	0,79	69,42%
Leishmaniosis	86,09	Sin otras zoonosis	23,90	0,28	72,24%

Por otro lado, otra zoonosis transmitida por díptero como es la **Dirofilariosis** muestra una tendencia contraria, es decir, hay más probabilidades de tener ambas enfermedades que contraer solo Dirofilariosis sola siendo casi un 70% más probable que contraiga las dos enfermedades juntas que solo leishmaniosis. Esto pone de

manifiesto que las condiciones geo climáticas afectan de distinto modo a los vectores dípteros que, a las garrapatas, Además, la protección frente a las garrapatas es más eficaz, sencilla, barata y está mucho más extendida entre los propietarios que la protección ante los dípteros. Existe una gran cantidad de productos repelentes y acaricidas en el mercado, tanto de uso tópico (collares, pipetas, lociones) como de uso interno (tabletas acaricidas) que eliminan las garrapatas en las primeras dos horas de la picadura, dificultando la posibilidad de que trasmitan algún patógeno.

A este resultado hemos de añadir que la tendencia de crecimiento era más o menos estable con ligera disminución antes de la pandemia y tras el confinamiento, el crecimiento resultó negativo. El comportamiento normal (prepandémico) como se ha comentado, consta de altibajos lo que se traduce en que la **recta de tendencia** tiene una dispersión elevada mientras que, tras el confinamiento, el desplome del crecimiento interrumpió la evolución natural de la infección, por lo que serán necesarios varios años para comprobar si la tendencia se mantiene, se eleva o disminuye.

El comportamiento del resto de enfermedades no tiene relación entre ellas, pero todas experimentaron alteraciones a raíz del confinamiento que ha imposibilitado realizar una proyección en el tiempo sobre su futuro comportamiento. En todas ellas habrá que comenzar de nuevo los estudios para tener una idea de cómo van a evolucionar (Figura 35), ya que la recta de proyección correspondiente a la Pandemia (color naranja) consta solo de tres puntos para su cálculo, no incluyendo la recuperación posterior, una vez los canes pueden volver a salir a la calle y los portadores y posibles receptores vuelven a estar susceptibles de contactar con el vector.

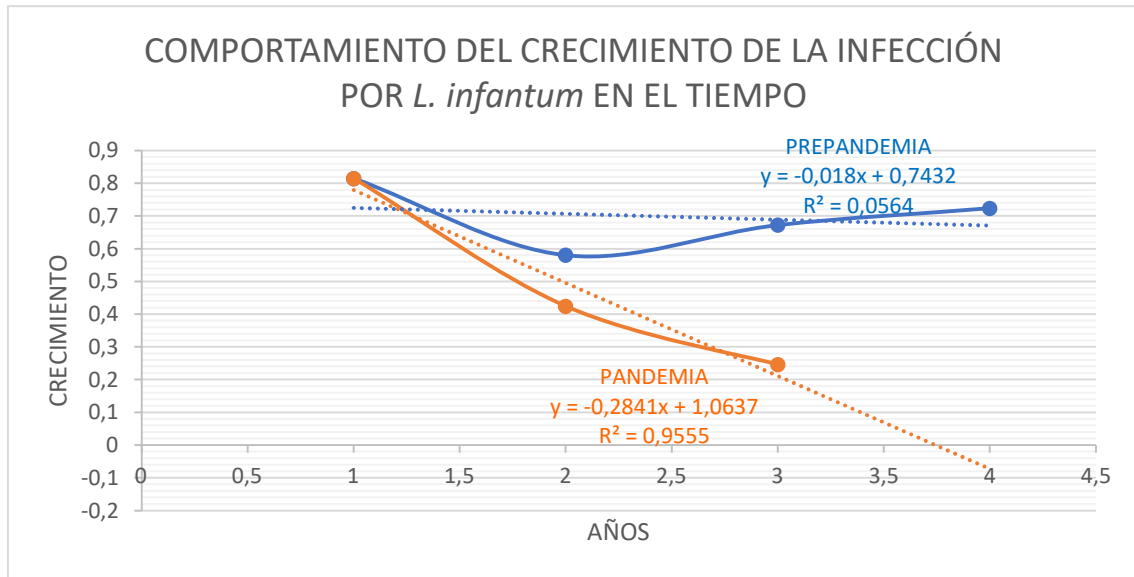


Figura 35: Comparación de la evolución de la presencia de *Leishmania infantum* antes y después del confinamiento y su proyección de evolución.

Con respecto al resto de zoonosis del Mediterráneo (Figura 36), hay una tendencia a la baja en *A. phagocytophilum* y en *E. canis*, siendo a la alza en las otras dos, no apreciándose correlación entre ellas, pese a que tres son transmitidas por el mismo vector. Lo que sí puede verse claramente es que las rectas de las 4 enfermedades se cruzan antes y después de la pandemia, invirtiéndose las tendencias, lo cual se interpreta como que el aislamiento de los portadores/receptores corta el ciclo de transmisión. Dichos cruces de rectas son mucho más pronunciados precisamente en las enfermedades transmitidas por garrapatas que en las que tienen como vector el mosquito, lo que resulta esperable teniendo en cuenta que las garrapatas requieren del contacto directo con el Hospedador, siendo este el que debe desplazarse a la zona infestada, mientras que los dípteros poseen mucha mayor movilidad geográfica y eso les facilita el acceso a los Hospedadores mamíferos.

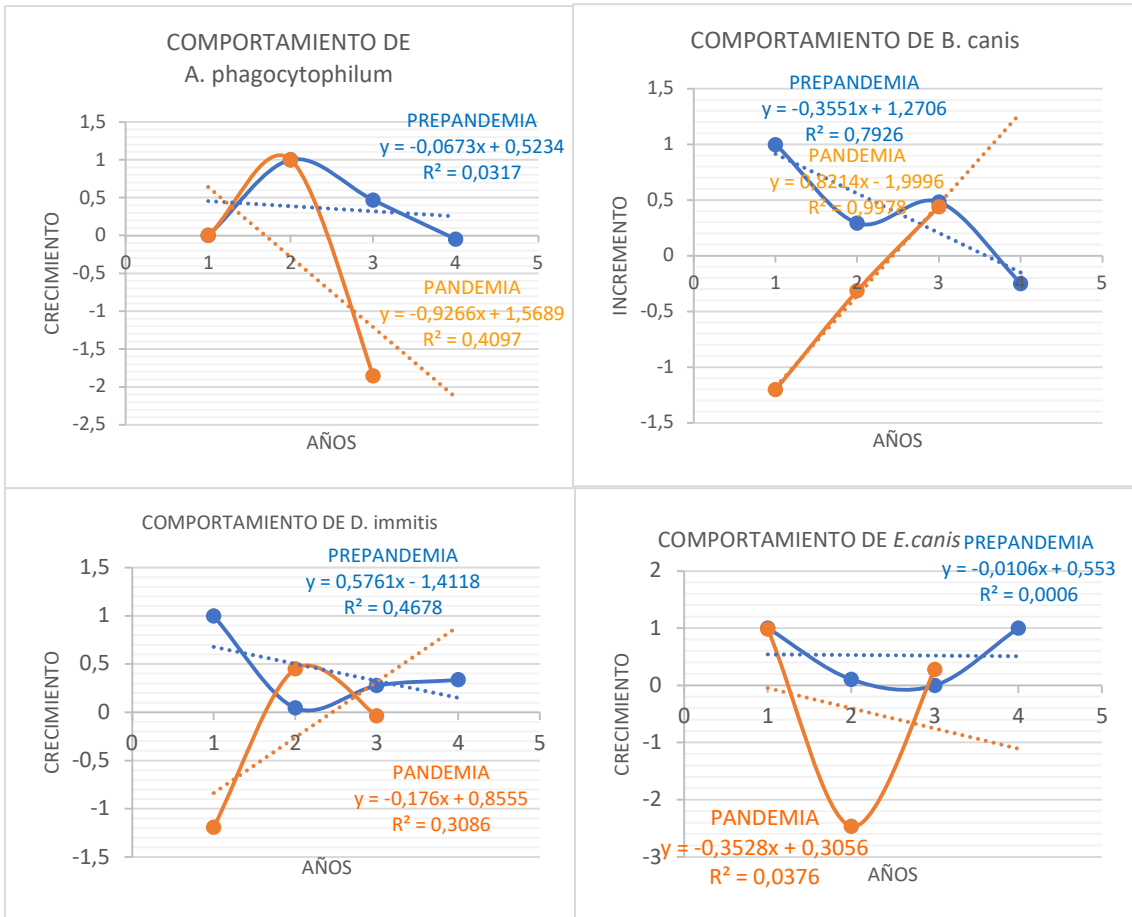


Figura 36: Evolución de la tendencia de crecimiento de medias anuales antes (2016-2019) en azul y después (2020-2022) en naranja del confinamiento en la infección por *L. infantum*, *A. phagocytophilum*, *B. canis*, *D. immitis* y *E. canis*

La evolución anual se vio fuertemente influenciada por el confinamiento durante la pandemia de Coronavirus (Figura 37).

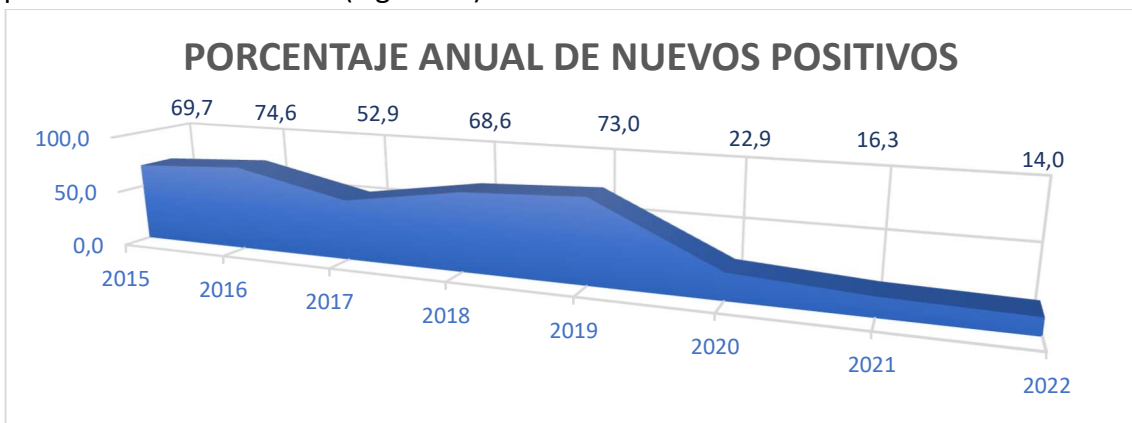


Figura 37: Evolución anual de la incidencia.

Con respecto al comportamiento estacional, se puede apreciar que sigue un patrón de subidas y bajadas periódicas pero que la tendencia general es estable en el periodo de prepandemia, con un pico o valor atípico al empezar el confinamiento,

pero que poco después vuelve a mostrar el mismo comportamiento mostrado hasta el momento (Figura 38).

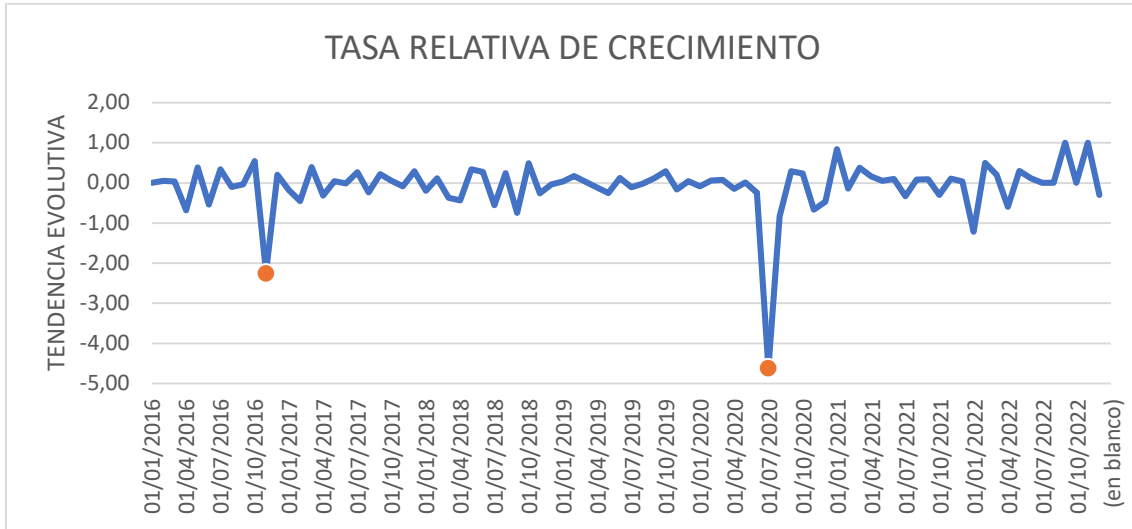


Figura 38: Evolución continua desde 2016

A mediados de 2016 también hay un valor atípico no tan intenso como el de 2020 pero sí llamativo, sin que se hayan encontrado explicaciones para ello. Según el informe anual de la AEMT®, el 2016, se considera un año extremadamente cálido en la Axarquía y muy cálido en la Costa del sol, algo más húmedo que la media en la Costa del Sol, pero en la media en la Axarquía (Figura 39).

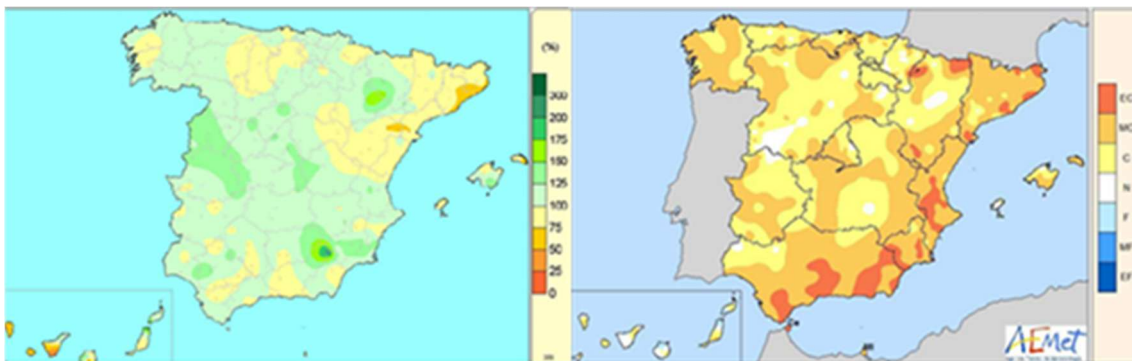


Figura 39: Media de precipitaciones (en verde) y temperaturas (en ocre) correspondientes al año 2016.

Fuente AEMET

Tampoco se encontraron otras alteraciones medioambientales graves como incendios, estando la actividad en la media (Figura 40) ni hay datos de fumigaciones intensivas, por lo que este valor atípico queda sin resolver por el momento.

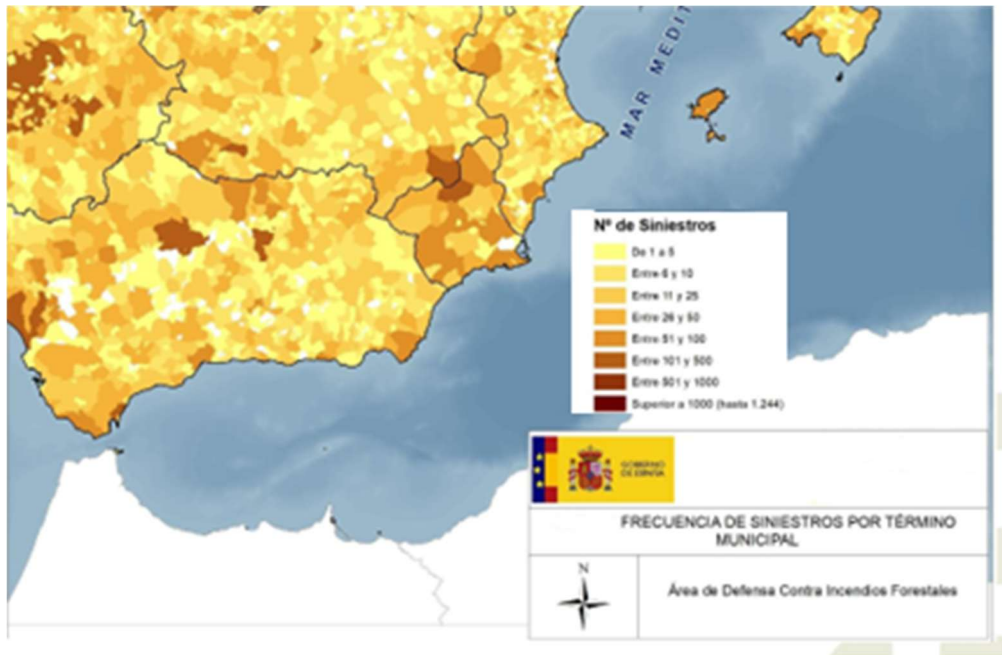


Figura 40: Suma total de incendios forestales declarados en 2016.

3.2. Proponer un nuevo término Epidemiológico: La “Transmisión Diferida Facilitada”: Comprobar cuántos animales portadores y/o enfermos han viajado adoptados a nuevos asentamientos en Europa y otros lugares del mundo, responder a la cuestión de si se están creando Exonodos de la enfermedad en los destinos. Evaluar el riesgo para la Salud Pública.

Siendo España un país de origen de numerosas adopciones internacionales, el flujo de animales que salen de nuestro territorio es de interés epidemiológico. Hay que tener en cuenta que las cifras reflejadas en este estudio señalan solo aquellos sujetos reclutados para este estudio, a los que se les puede hacer un seguimiento completo a través del chip de identificación, y abarca animales de Málaga (Figura 41).

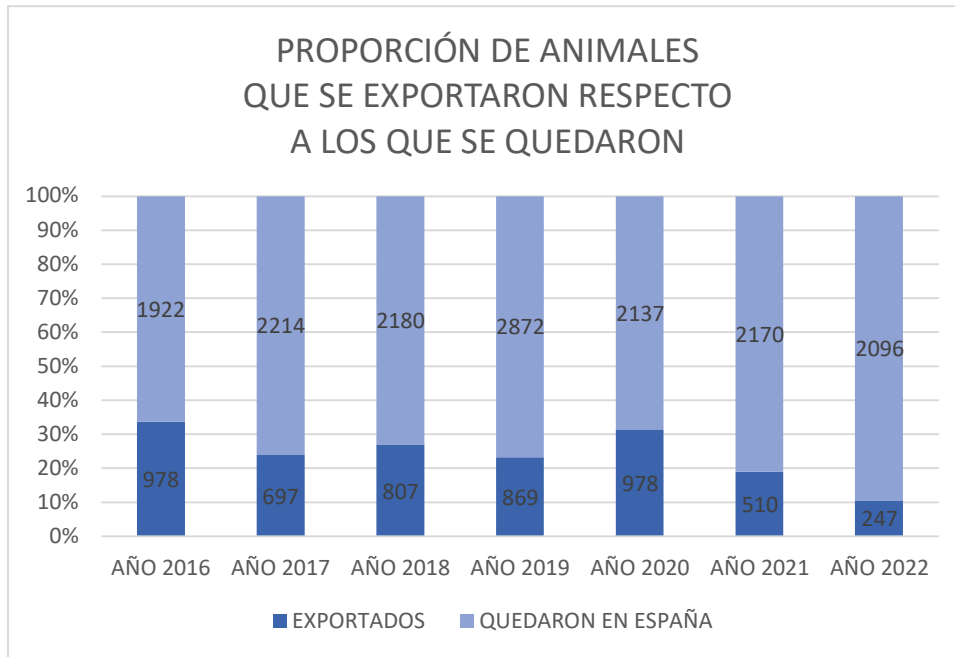


Figura 41: Relación entre el total de animales exportados (azul oscuro) con respecto a los que se quedaron (azul claro) cada año del estudio.

La tendencia de exportación siempre ha estado por debajo del 35% y ha ido sufriendo altibajos a lo largo del periodo estudiado, habría que esperar algunos años para poder observar si esta tendencia se mantiene en el tiempo, porque aparentemente, desde la Pandemia, las adopciones internacionales han ido disminuyendo (Figura 42).

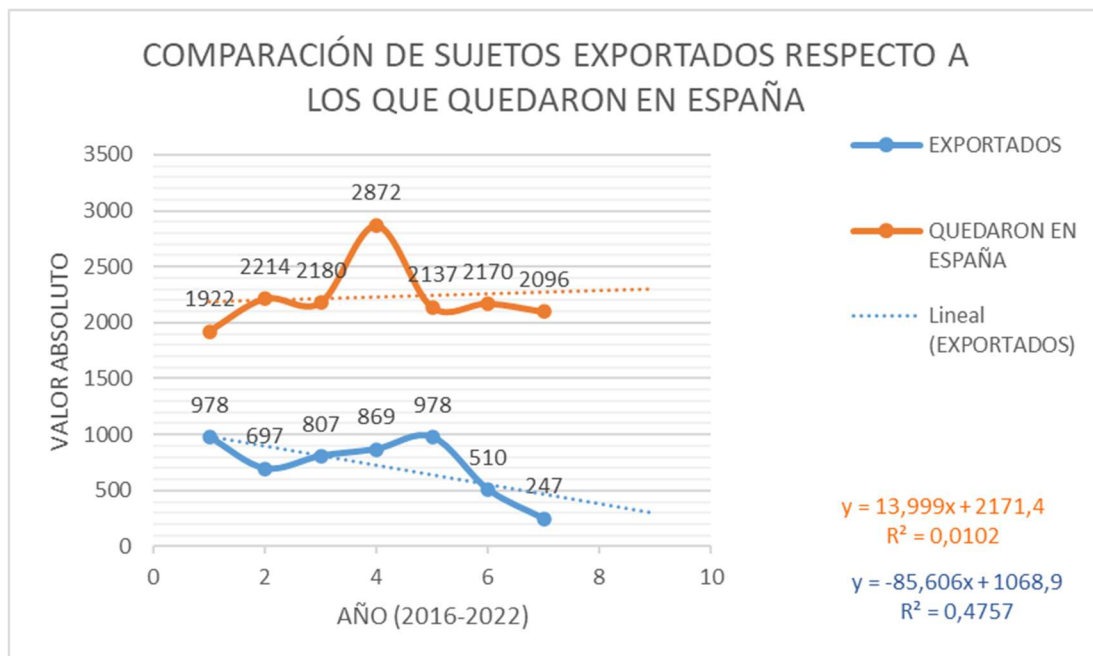


Figura 42: Relación entre los perros adoptados que permanecieron en España con respecto a los enviados al extranjero a lo largo de los 7 años de estudio, así como la tendencia y su proyección los prevista para los siguientes 3 años. La caída de exportaciones se ha visto algo compensada con el incremento de las adopciones nacionales, pero en la actualidad se están acumulando animales en los refugios.

Si calculamos la recta de tendencia, se confirma la apreciación gráfica respecto a la disminución de adopciones a lo largo de los años y vemos que, además, se corresponde con un ligero incremento de los animales que se quedan aquí. Las tendencias no se influyen unas a otras, puesto que el coeficiente de correlación entre ambos lineales de tendencia o pronóstico es de sólo 0.13 puntos.

En 2019 hubo un número atípico de animales acogidos y casi dos tercios de ellos se quedaron en nuestro país. Los que se marcharon lo hicieron a diversos países, tanto dentro fuera de la UE (Figura 43).



Figura 43: Porcentaje anual medio de animales enviados a cada país del total de los envíos internaciones estudiados.

Los mayores importadores de perros desde España son Alemania y Reino Unido. Esto está motivado, principalmente, porque los residentes extranjeros de nuestra provincia que colaboran con las protectoras son naturales de esos países. El perfil medio del voluntario que trabaja con Asociaciones es de una persona jubilada que reside en vivienda unifamiliar aislada (chalé o finca) y que acoge algunos animales seguidos de familiares jóvenes que han venido a convivir con sus padres o abuelos o que han nacido aquí, pero continúan teniendo vinculación con sus países de origen. Además, hay algunos que están muy implicados en la salida de los animales y actúan como intermediarios entre las asociaciones en sus países de origen y los centros en nuestro país. De las Asociaciones que han querido colaborar en este estudio, la mayoría son extranjeras que tienen o una sede en Málaga o colaboradores que envían los animales a su país de destino.

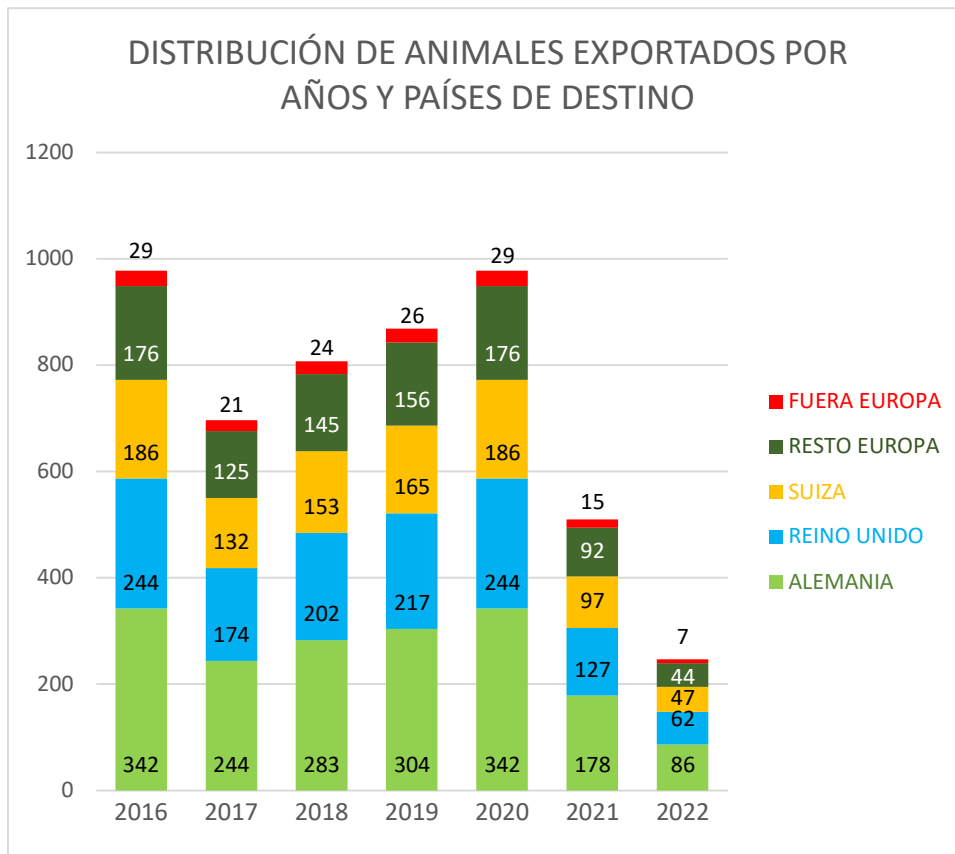


Figura 44: Relación comparativa del número de ejemplares destinados a adopciones internacionales con respecto a cada país de destino habitual, a lo largo de 7 años.

La proporción de perros exportados fuera de España se mantiene proporcional si medimos la tendencia dentro de un mismo año, de cada destino con respecto a los siguientes años (Figura 44). Alemania y Reino Unido son los destinos principales y a lo largo de los años, se mantiene la proporción entre ellos. Lo mismo pasa con Suiza y el resto de Europa. Las exportaciones fuera de Europa (continente) siguen siendo vestigiales y se corresponde en su mayoría con Estados Unidos y algunos países de Sudamérica como Chile o Argentina, no porque se envíen allí, sino porque los adoptantes son naturales de esos países y se llevan a los animales con ellos al poco de adoptarlos o incluso avisan, durante el proceso de adopción, que se van a llevar al extranjero y eso queda anotado en su ficha y es tenido en cuenta luego para el etiquetado de cada sujeto (Figura 45).

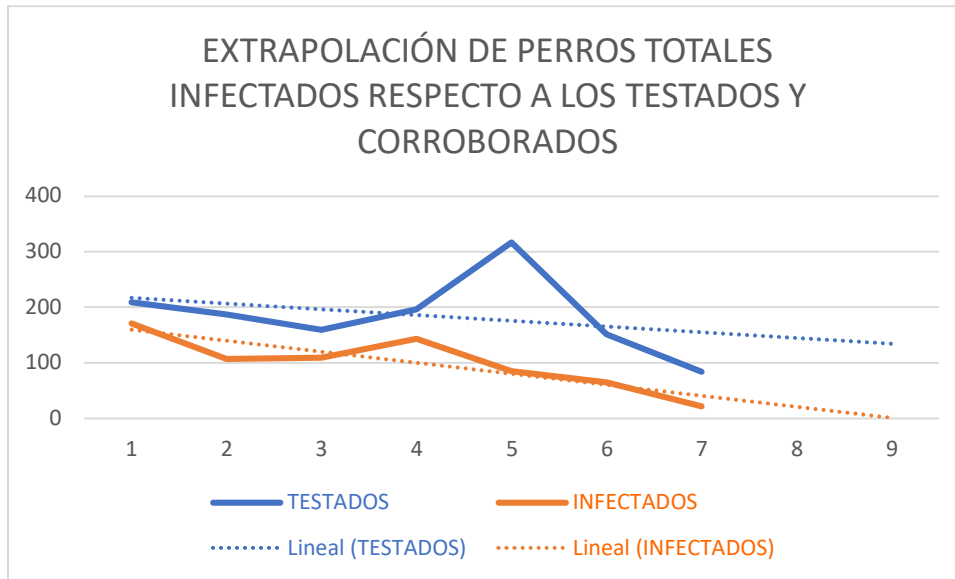


Figura 45: Sujetos analizados en su totalidad y su tendencia en el tiempo con respecto a los que resultaron infectados y su evolución en el mismo periodo de tiempo, desde el año 1 (2016) hasta el año 7 (2022) y su proyección esperada hasta 2025.

Las pruebas fueron disminuyendo con el tiempo, porque a raíz de la Pandemia, la cantidad de voluntarios disponibles para poder hacer un correcto seguimiento de los animales disminuyó, lo que obligó a eliminar un mayor número de sujetos debido a los criterios de exclusión. No obstante, la muestra sigue siendo lo suficientemente amplia como para considerar los resultados correctos y se mantiene la tendencia a la baja detectada a partir del confinamiento por la Pandemia (Figura 46).

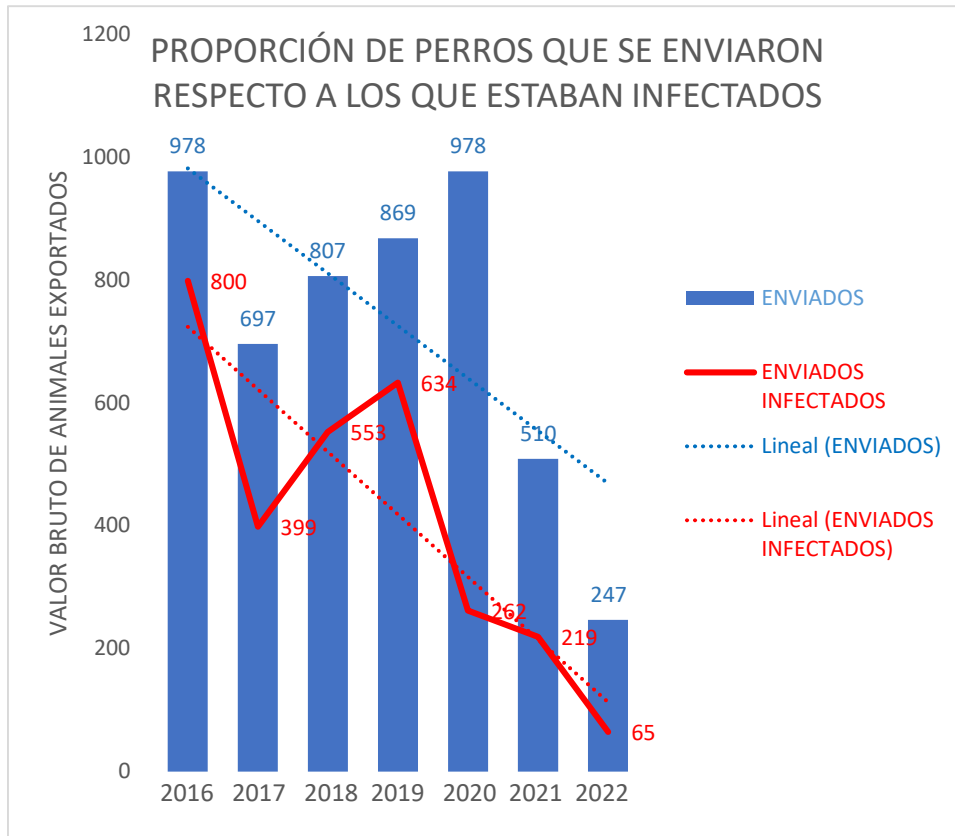


Figura 46: Valor absoluto y tendencia anual de los perros enviados infectados de *L. infantum* con respecto a todos los ejemplares enviados en el mismo año, de la misma zona y desde los mismos refugios.

Extrapolando las proporciones de perros infectados con respecto a los testados y a los datos de animales exportados por años, nos encontramos de nuevo la misma situación: altibajos prepandemia y tendencia intensa a la baja a partir de la Pandemia; no obstante, la cantidad bruta de animales infectados sigue siendo alta, sobre todo teniendo en cuenta que no todas las asociaciones realizan estas pruebas.

4. OBJETIVOS EN EL GATO

De una muestra de 532 gatos que entraron en el estudio (una vez aplicados los criterios de exclusión) se encontró que 98 de ellos fueron **positivos** a alguna forma de diagnóstico de **infección** por *L. infantum*. Eso sitúa la **prevalencia provisional** en el 18.42%.

4.1. Valoración de las técnicas diagnósticas disponibles: comparar cada técnica diagnóstica como indicador de enfermedad/portabilidad.

a. **Inmunofluorescencia Indirecta o IFI: ¿es una técnica fiable.** un total de 48 sujetos dieron reacción positiva (9.12% de la muestra y el 48.96% del total de positivos). El punto de corte se situó en 1/80 diluciones, aunque hubo cierta cantidad de animales que presentaron positividad en las diluciones de 1/40 y 1/20.

b. **Enzimo-Inmunoanálisis de Adsorción o ELISA: ¿es una técnica fiable? ¿se puede establecer una prueba comercial?** La técnica ELISA que se estaba desarrollando en un principio con los sueros y pruebas realizadas en este estudio y a través de la colaboración entre Uranolab y la UMA no llegó a materializarse, ya que los resultados de la cata inicial que se realizó sobre una veintena de animales aportaron resultados contradictorios. Se intentó con dos proteínas recombinantes y no daba lo esperado, sobre todo al enfrentar los resultados con los de IFI; así que se decidió no aportar más presupuesto al estudio y quedó el de Inmuncromatografía rápida de Membrana (IC en adelante).

c. **Inmuncromatografía de Membrana o IC/LF: ¿es posible realizar una prueba rápida? ¿es esta fiable? ¿tiene utilidad comercial? ¿es sencillo su uso por parte del veterinario clínico?** tras varias tandas de pruebas con cada suero problema, con el objeto de ajustar la velocidad con la que el suero conjugado corría por la matriz de nitrocelulosa, así como la cantidad de suero problema y de conjugado revelador, se obtuvieron varias combinaciones que están siendo ahora mismo valoradas por la empresa patrocinadora y en breve serán puestas en el mercado. Las instrucciones de la técnica aún no están registradas/patentadas, por lo que no se pueden incluir los resultados en este texto. Sí podemos anotar los resultados finales de la misma, en los que se aprecia una altísima sensibilidad sin dar falsos negativos. 84 muestras arrojaron un resultado positivo, casi el doble que los resultados de la IFI y coinciden con aquellos sujetos que presentaron resultados por debajo del punto de corte en la técnica cuantitativa.

d. **Genética molecular o PCR: ¿cuál es la prevalencia de portadores? ¿hay relación entre el número de portadores y los enfermos? ¿hay relación de comorbilidades?** El órgano que mayor frecuencia de ADN del parásito mostró fue el bazo, además seguido de la médula ósea. La piel y las mucosas están una decena de puntos por debajo y en ninguno de los hisopados de mucosa conjuntival se detectó *L. infantum*, por lo que se ha desestimado la técnica por el momento (Figura 47).

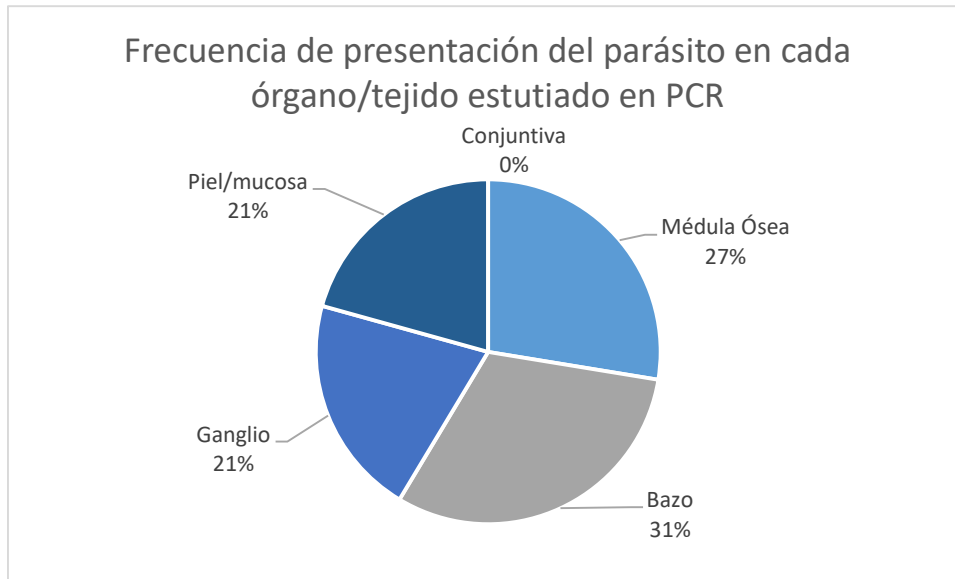


Figura 47: Representación de los órganos diana principales para *L. infantum*.

De los 98 gatos infectados, solo un 16% mostró todas las técnicas serológicas positivas y al menos un órgano positivo por PCR, pero esos 25 animales también presentaban al menos tres marcadores clínicos y analíticos compatibles.

e. Microscopía directa: ¿es una técnica fiable? ¿aporta algo? No todas las muestras fueron observadas en su totalidad, tanto por falta de tiempo como de medios para teñirlas todas, tan solo se prepararon muestras positivas y se encontró que, aquellas en las que se había observado algún amastigote, también habían dado positivo en la prueba de PCR, mientras que algunas negativas, sí que resultaban positivas en la PCR, tras varias tandas de intentos, se llegó a la conclusión de que la técnica no era fiable y se dejaron de recopilar datos.

4.2. Diseño de un algoritmo diagnóstico en gatos: ¿se puede establecer una tanda de pruebas que ayuden al veterinario clínico a confirmar o descartar la enfermedad o la portabilidad? ¿qué conclusiones se pueden sacar de la comparación de los resultados?: Uno de los objetivos principales de este estudio es comprobar el *papel real* que juegan en el mantenimiento y transmisión del parásito. ¿Son portadores?, ¿sufren la enfermedad? Para poder contestar a esta pregunta, primero debemos *poner en valor* los *métodos diagnósticos* disponibles para una especie hasta ahora poco estudiada, ya que no hay un consenso general de cómo diagnosticar la infección y la enfermedad en esta especie. Se han publicado estudios aislados con una población relativamente pequeña y en algunos casos, pese a contar con una población grande, las pruebas realizadas dejaron demasiadas variables fuera. En este caso, como se ha expuesto en el capítulo anterior, tanto el tamaño de la muestra como las variables tenidas en cuenta permiten establecer unos cánones diagnósticos avalados estadísticamente que sirvan como herramienta diagnóstica a futuros investigadores y a los veterinarios clínicos.

En primer lugar, se identificaron aquellos sujetos que mostrasen **signos clínicos** compatibles con la infección, tal y como se manifiestan en perros^{15,16,29}, por ello se

realizó un examen médico que incluyó la condición corporal y nutricional, el aspecto general del pelo, el estado de los dientes, la apreciación de inflamaciones o problemas en las articulaciones, salud de las uñas, aspecto, tacto y presencia de alteraciones en las mucosas y líneas mucocutáneas de nariz, labios, conjuntiva y encías temperatura rectal, palpación de los ganglios accesibles (poplíteos, preescapulares, retrofaríngeos, cervicales, submandibulares y en aquellos sujetos en los que se pudo, los mesentéricos) (Figura 48).

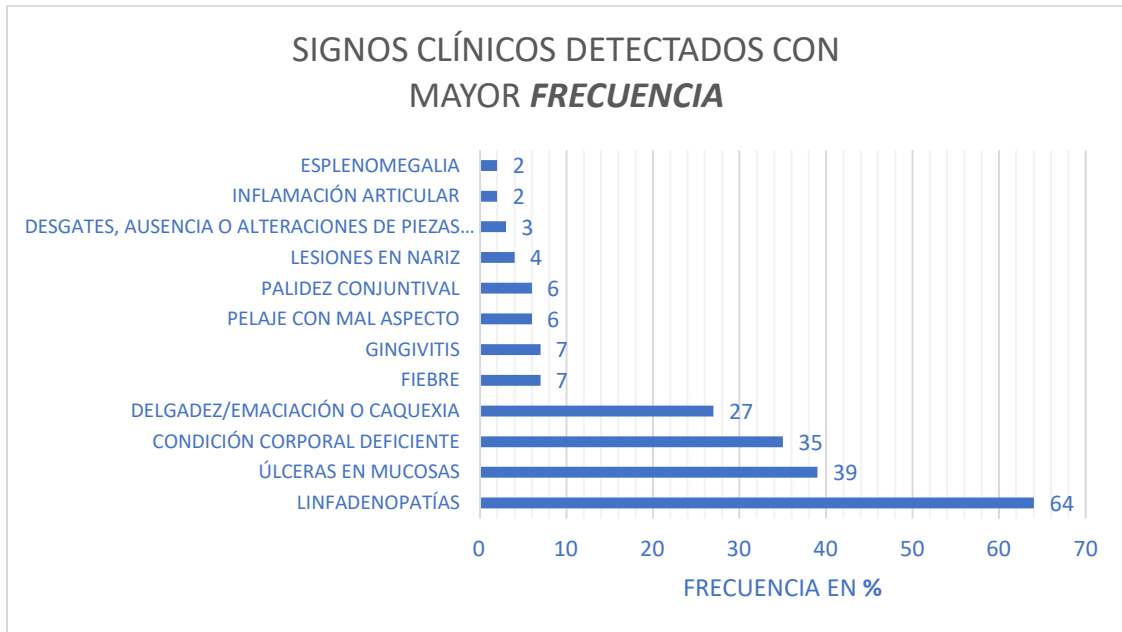


Figura 48: Frecuencia de las alteraciones encontradas en el examen clínico. En el eje de abscisas se indica la frecuencia con la que se presentan las presencia (valor 1) o ausencia (valor 0) de signos clínicos compatibles con infección por *L. infantum*. En el eje de ordenadas se enumeran de menor a mayor las variables (discretas) estudiadas con presencia en animales portadores o enfermos.

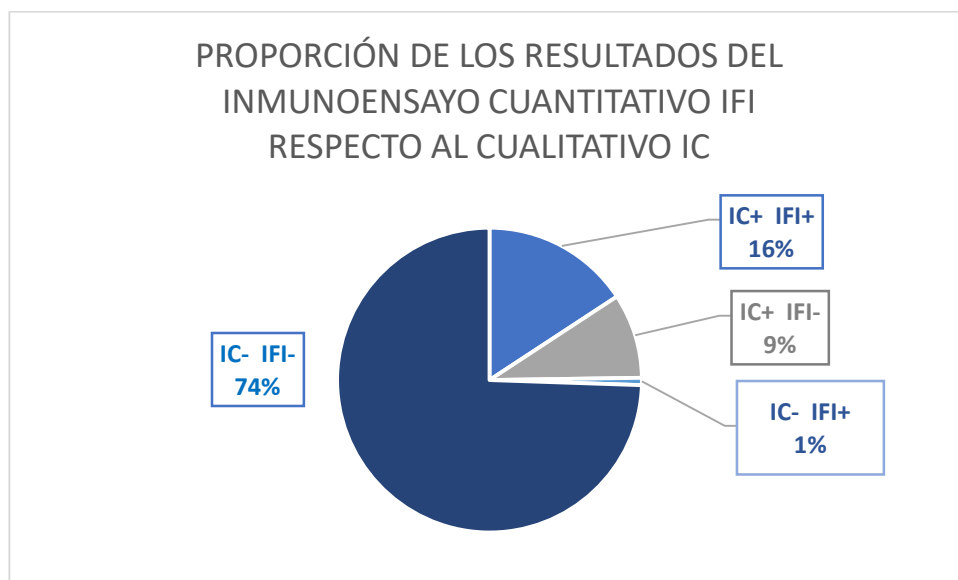
A continuación, se ordenaron los resultados obtenidos de las pruebas serológicas, tanto cuantitativas (IFI y ELISA) como cualitativas (inmunocromatografía de membrana). En conjunto, el 26% de los sujetos estudiados presentaron anticuerpos anti-leishmania en al menos, una de las dos técnicas seleccionadas. El estudio de la técnica de ELISA tuvo que ser detenido, pues tras una cata inicial con 40 individuos, entre los que había algunos identificados como infectados por PRC o Microscopía o por las otras pruebas indirectas, no se logró establecer un adecuado protocolo en el aislamiento de la proteína recombinante más adecuada, el estudio se pospuso hasta después de la Pandemia de SARS-COVID-19 y continúa desarrollándose hoy en día.

En cuanto al **Inmunoensayo** por IFI, se usó un conjugado de promastigotes de uso comercial. No obstante, la técnica sigue desarrollándose y actualizándose ya que, cuando se intentó aplicar el punto de corte habitual de 1/80 diluciones, los resultados arrojaron casi la mitad de los sujetos presuntamente infectados que los que mostraron resultados dudosos de 1/40 o 1/20 diluciones.

Cabe señalar que aquellos individuos que presentaban resultados dudosos, sí que dieron un resultado positivo en la prueba rápida o **Inmunocromatografía de**

membrana que se estaba sometiendo a pruebas de campo bajo un acuerdo de colaboración con la empresa Uranovet®, dentro de una serie de estudios destinados a la comercialización de una plataforma fiable para su uso conjunto en perro o gato. La labor de calcular la especificidad y fiabilidad corrió a cargo del propio laboratorio y con comprobación ciega en otros dos centros de investigación independientes

En la Universidad de Málaga y bajo el acuerdo citado, se realizaron las pruebas de trabajo clínico, es decir, se fueron probando los distintos conjugados reveladores, así como la calidad de la tira de nitrocelulosa, la cantidad de muestra y conjugado a usar y otras variables para la elaboración de las instrucciones de uso más adecuadas para el profesional clínico veterinario y potencial comprador del producto. Los resultados no pueden ser aún citados en esta tesis pues están sujetos a secreto comercial, pero se espera que en pocos meses la empresa publique los resultados finales de todo el proyecto de I+D+i que incluyen varias pruebas de zoonosis vectoriales que sirvan para perro y gato, con una aplicación informática que transforme una prueba cualitativa en semicuantitativa. La prueba usa una proteína de conejo según las especificaciones de la casa comercial (Figura 48).



*Figura 48: comparativa de las dos técnicas serológicas planteadas, Inmunofluorescencia indirecta contra Inmunocromatografía de Membrana en pruebas. Se establecieron las 4 combinaciones posibles de la tabla de frecuencias de cada una de ellas y contabilizadas por cada sujeto individual. Se realizó una distribución de frecuencias en las que se enfrentaron los dos únicos resultados posibles (variables discontinua), positivo o negativo, presencia o no de anticuerpos específicos con *L. infantum*, Siendo el signo – un resultado negativo (valor 0) y + un resultado positivo (valor 1).*

La identificación del parásito por técnicas de PCR u observación microscópica mostraron una presencia aparente de un 21% de animales infectados sobre el total. De todos ellos, el bazo fue el que con mayor frecuencia mostró presencia de *L. infantum*, debiendo señalar que, en más de la mitad de estos animales, no había signos clínicos ni laboratoriales que indicasen una infección clínica, sino que parecía que el parásito se encontraba latente en este órgano sin causar enfermedades (Figura 49).

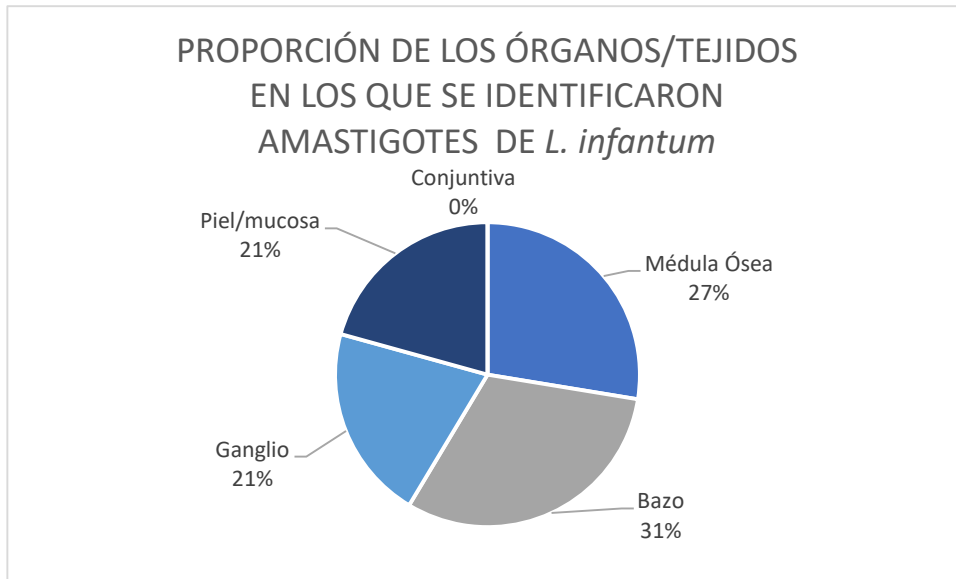


Figura 49: Resultados de la identificación del parásito por técnicas de PCR o/y observación microscópica en frotis y biopsias de tejidos. Media aritmética entre ambos valores y expresados en porcentaje con respecto al total de sujetos que aportaron resultados positivos en ambas técnicas en, al menos, un tipo de muestra.

Se prestó especial interés en la detección de hembras preñadas, pues uno de los objetivos del estudio era poder describir al menos un caso de transmisión vertical, pero de las seis hembras positivas con fetos o embriones, en ningún caso se encontró presencia del parásito ni por PCR ni por microscopía. Al tratarse de una muestra tan pequeña, el resultado no se ha considerado relevante.

Una vez ordenados y calculados los valores de las variables de Serología, Genética u Observación Microscópica directa y los parámetros de la Inspección Clínica, el cuarto pilar sobre el que descansa el diagnóstico corresponde a las pruebas complementarias y los hallazgos encontrados fueron ordenados en los tres grupos según las tablas de frecuencias en las alteraciones con respecto a los valores habituales considerados fisiológicos en un animal sano.

En el hemograma encontramos la linfocitosis y la neutrofilia como rasgos más característicos, incremento de monocitos circulantes, pérdida de glóbulos rojos y de la hemoglobina son alteraciones frecuentes, junto con anomalías en el frotis sanguíneo, la disminución de los eritrocitos no se ve compensada por la producción suficiente de reticulocitos, por lo que la anemia es de tipo poco o no regenerativa. Las plaquetas, que en perro sí suelen verse alteradas, en cambio en gatos no es frecuente, al menos en la media total, porque en aquellos sujetos con enfermedad visceral avanzada sí que se detectó trombocitopenia en la mayoría de los sujetos (Figura 50).

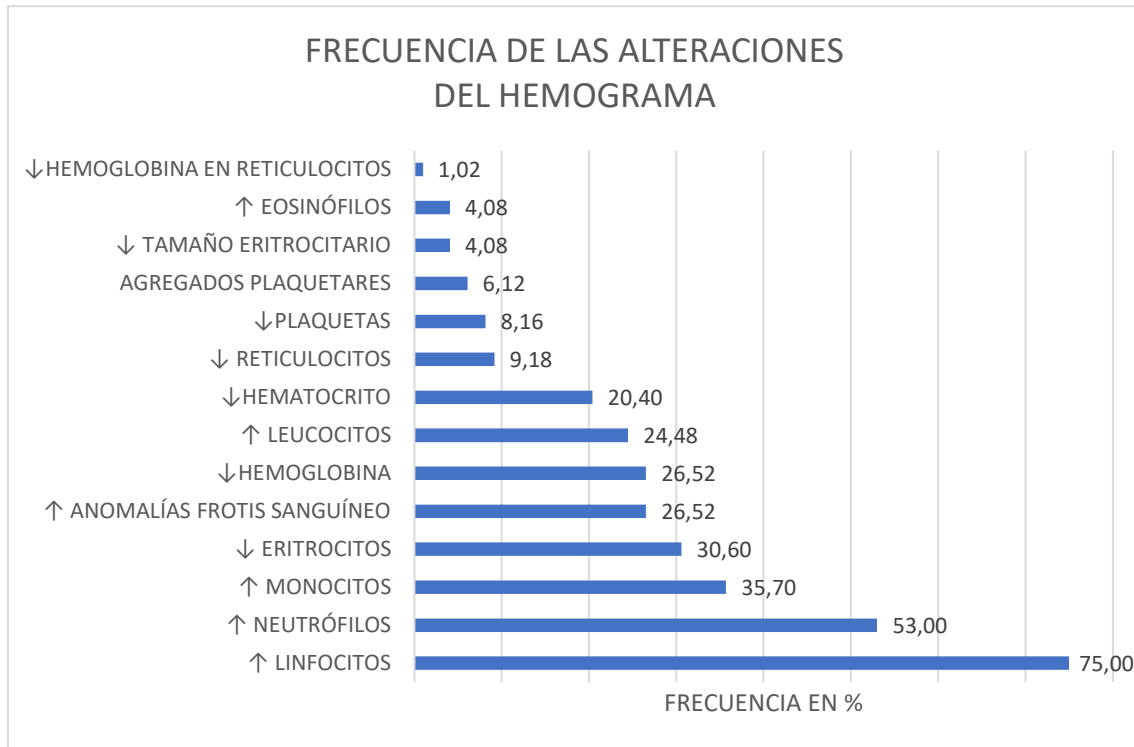


Figura 50: Frecuencia de las anomalías halladas en el análisis hematológico con una marcada linfocitosis y monocitosis. Las anomalías del frotis fueron más comunes de lo habitual. En el eje de abscisas se indica la frecuencia con la que se presentan las desviaciones de la media de las variables hematológicas en tanto por cien en animales portadores o enfermos. En el eje de ordenadas se enumeran de menor a mayor las variables estudiadas con presencia en animales portadores o enfermos. Las flechas indican en dirección hacia arriba cuando la desviación de la media es hacia la derecha (valor incrementado) y hacia la izquierda cuando la desviación de la media es hacia la izquierda (valor disminuido).

La proteinograma es la fracción sanguínea que presenta mayores alteraciones, con una alta frecuencia de sujetos hipergammaglobulinemia e hipoalbuminemia (Figura 51).

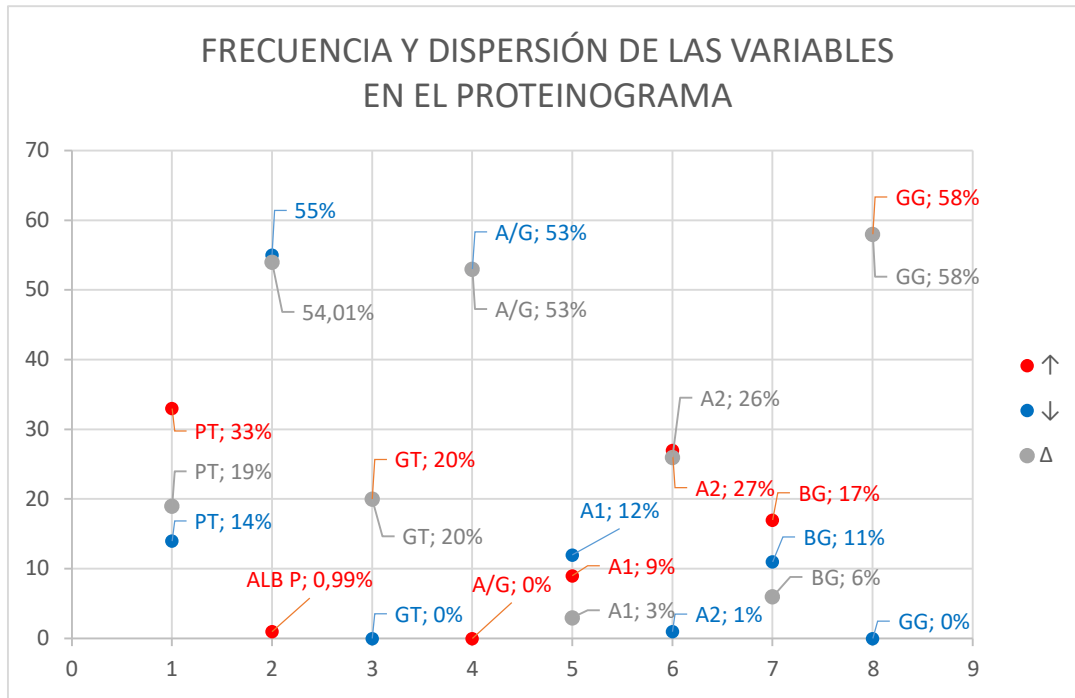


Figura 51: Representación de las frecuencias de las fracciones proteicas en sangre con cálculo de la desviación (en gris) entre niveles elevados (en rojo) o disminuidos (en azul) con respecto a los valores fisiológicos para cada variable. 1-PT: Proteínas totales, 2-ALB: Albúmina sérica, 3-GT: Globulinas totales en suero, 4-A/G: Cociente Albúmina/Globulinas, 5-A1: Globulinas alfa 1, 6-A2: Globulinas alfa 2, 7-BG: globulinas beta, 8-GG: gammaglobulinas.

Cuando se enfrentaron los resultados de los valores con una mayor frecuencia de alteración (Albúmina y Gammaglobulinas), se encontró un coeficiente de correlación de -0.94 puntos, altos niveles de gammaglobulinas van casi siempre asociados a bajos niveles de albúmina. Estos resultados coinciden con lo esperado y, además, se corresponden con la lista de alteraciones de las proteínas séricas caninas de la que se extrapoló la hipótesis. Queda corroborada por lo tanto la relación inversa. Esto manifiesta que, de forma parecida a como ocurre en perros y Seres Humanos, el hígado se ve afectado disminuyendo la producción de ALB cuando el Sistema Inmune responde por la Vía de Th2, coincidiendo con el incremento de la concentración de anticuerpos circulantes (Figura 52).

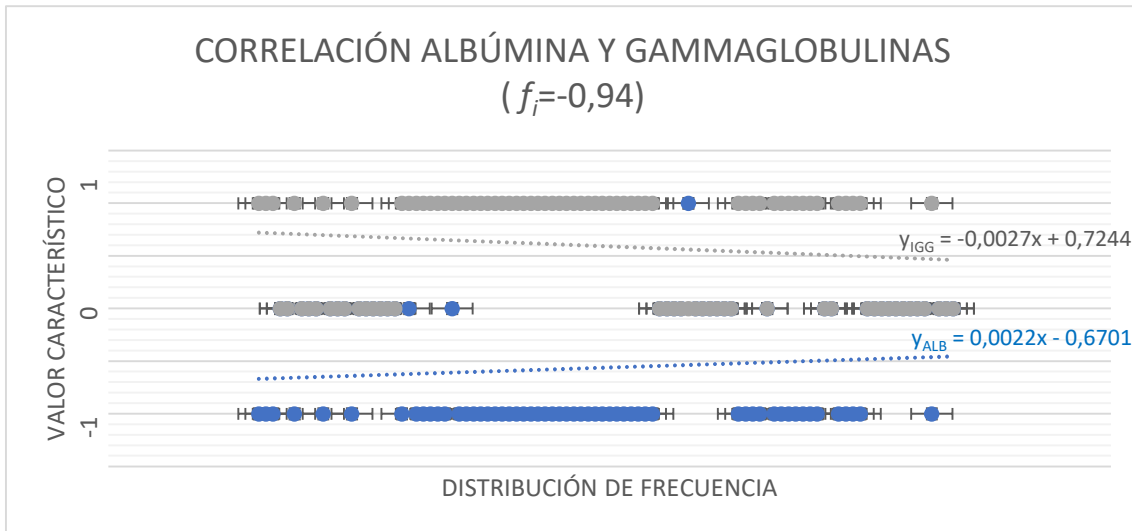


Figura 52: Relación entre la albuminemia y la gammaglobulinemia en sujetos infectados. La relación entre ambas variables es inversa, correspondiendo la infección activa con enfermedad y síntomas con el aumento de gammaglobulinas y la disminución de la albúmina sérica. La relación entre el resto de las variables entre sí (otras combinaciones) no alcanzó un valor representativo.

La bioquímica (Figura 53) señala al hígado como órgano que más se ve afectado en la infección visceral, encabezando las frecuencias de alteraciones con las transaminasas GOT y GPT. Le sigue el riñón con una marcada tendencia al índice de fallo renal (SDMA), y una incapacidad de filtrar la gran cantidad de restos del catabolismo proteico, estando incrementada más frecuentemente la Creatinina que la urea.

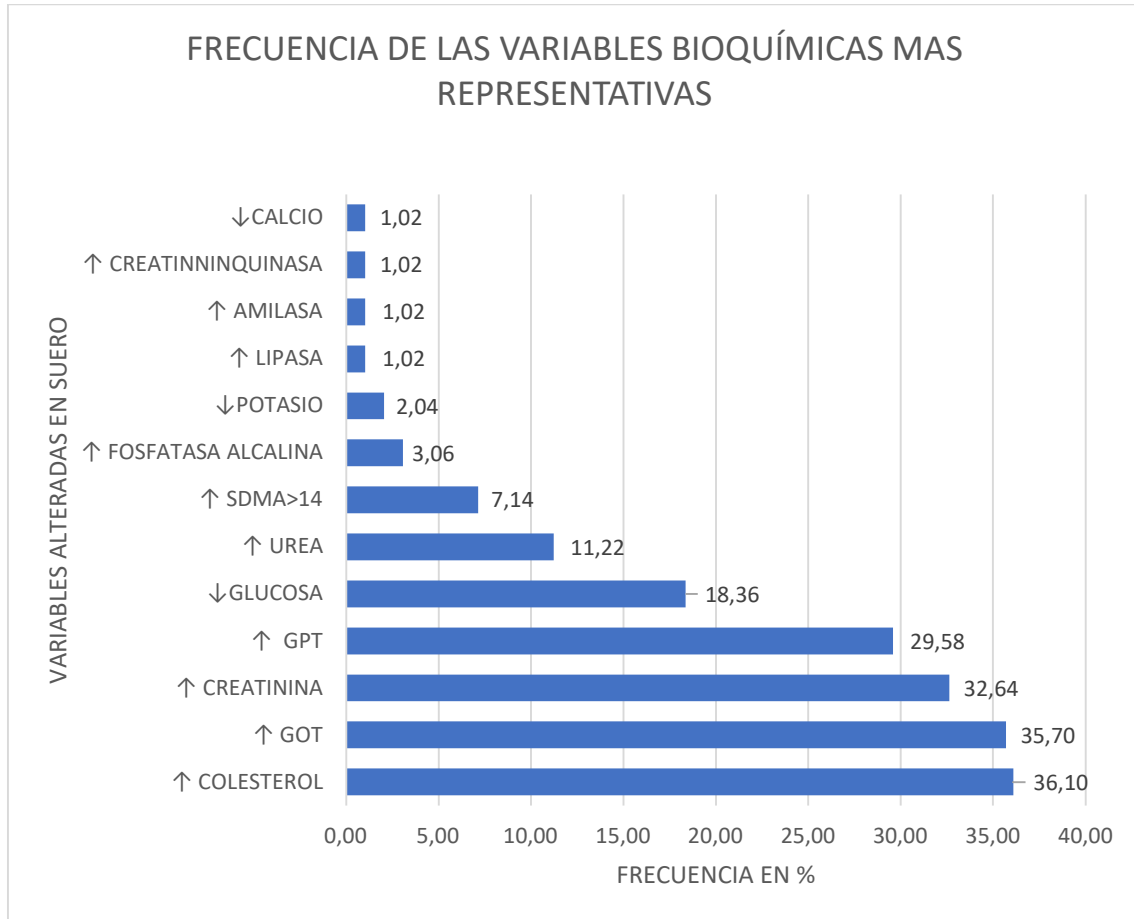


Figura 53: Frecuencias comparadas y ordenadas de menor a mayor de las alteraciones bioquímicas encontradas. En el eje de abscisas se indica la frecuencia con la que se presentan las desviaciones de la media de las variables analíticas en tanto por cien en animales portadores o enfermos. En el eje de ordenadas se enumeran de menor a mayor las variables estudiadas con presencia en animales portadores o enfermos. Las flechas indican en dirección hacia arriba cuando la desviación de la media es hacia la derecha (valor incrementado) y hacia la izquierda cuando la desviación de la media es hacia la izquierda (valor disminuido).

Hay que señalar la existencia de casos de leishmaniosis cutánea, sobre todo la restringida a los chancros de inoculación, en los que apenas hay alteraciones de los parámetros sanguíneos ni clínicos, así como una tendencia a no presentar anticuerpos detectables por ninguna de las técnicas de serología. (Figura 54).



Figura 54: Úlceras en un gato con Leishmaniosis cutánea.

Las lesiones pueden pasar desapercibidas al propietario si no tiene un contacto muy estrecho con el animal, ya que en ocasiones están en zonas donde no se ven a simple vista o no son evidentes (Figuras 55 y 56)



Figuras 55 y 186: Lesiones cutáneas macroscópicas en pulpejos, orejas y nariz. En la primera foto se aprecia claramente la dermatitis, pero en las tres siguientes no es tan visible. Los puntos blancos muestran las zonas donde las muestras arrojaron la identificación del parásito por microscopia y por PCR de raspado profundo.

La principal forma de detección fue mediante la presencia de los nódulos, chancros, descamaciones y grietas. La confirmación se produjo mediante técnicas de PCR o por identificación directa del parásito en observación microscópica de frotis a partir de raspado profundo o biopsia de las lesiones o por PAAF del ganglio regional (poplíteo en patas traseras, preescapular en patas delanteras, retrofaríngeos, submandibulares y cervicales en cabeza) (Figura 57).

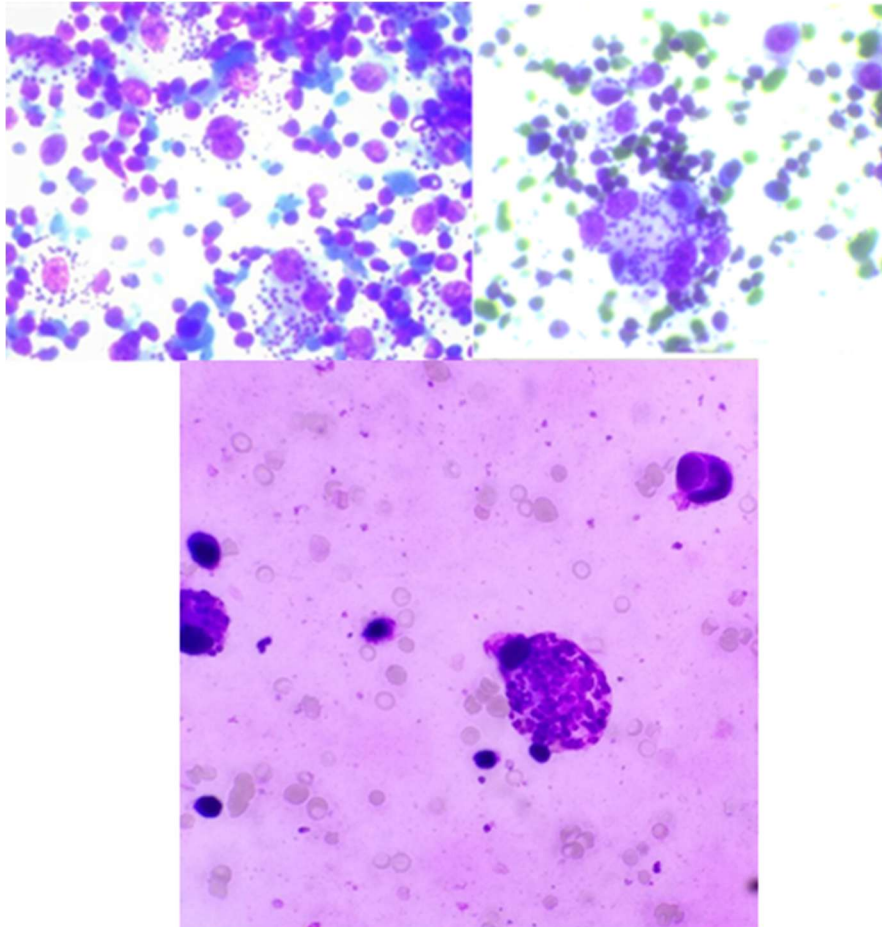


Figura 57: Observación de amastigotes en frotis teñido con Reactivo comercial Diff-Quick® de las lesiones mostradas en los sujetos de la Ilustración 37.

La presencia de otros patógenos puede afectar al sistema inmune de forma que una infección por *L. infantum* latente se active por la entrada de un nuevo patógeno y el animal desarrolle la enfermedad clínica o un gato previamente infectado de algún patógeno, sea infectado por *L. infantum* y no sea capaz de poner en marcha la respuesta adecuada, desencadenando una infección clínica activa. Aunque las investigaciones previas han mostrado que los retrovirus felinos más comunes, Fel y FIV pueden ser coinfectantes que favorezcan el desarrollo de leishmaniosis clínica, en este estudio, hemos encontrado que el patógeno más frecuente en coinfección con *L. infantum* es el Coronavirus entérico felino. (Figura 58).

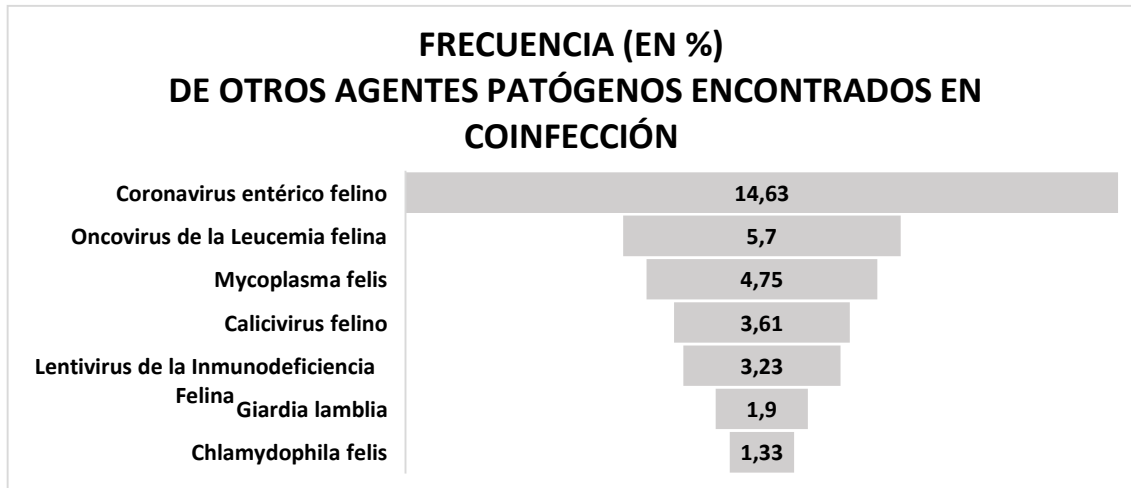


Figura 58: Otros patógenos habituales felinos encontrados en coinfección con *L. infantum*, expresado en %.

También se ha dado un solo caso de Bartonelosis felina que desembocó en infección clínica de Leishmaniosis, pero se trata de un caso aislado.

SECCIÓN 6ª

CONCLUSIONES

Tras un análisis profundo de los datos obtenidos y razonando lo que estos aportan, queda claro que la situación de la Leishmaniosis en Málaga está completamente descontrolada. En realidad, está descontrolada en toda España, pero en nuestra provincia la prevalencia es muy alta, aunque, afortunadamente, hay una resistencia de las personas a la enfermedad gracias al avanzado nivel sanitario del que disfrutamos, con una población mucho más sana que en otros territorios del mundo donde la Leishmaniosis hace estragos. Pero que tengamos un Sistema Sanitario fuerte no es motivo para que relajemos las medidas de prevención, puesto que, si algo nos ha enseñado la naturaleza, es que los patógenos pueden cambiar rápidamente su comportamiento y no estamos exentos de que pueda aparecer alguna cepa más virulenta o que seamos colonizados por especies^{57,58} que sean capaces de vencer las barreras inmunológicas de la población autóctona.

También sabemos que los gatos, pese a presentar una resistencia natural a la enfermedad, son capaces de mantener la infección inactiva por tiempo indeterminado y conforman un reservorio que hay que tener en cuenta a la hora de valorar el riesgo epidemiológico para la población. La población de gatos es desconocida, pero se estima que es, al menos, igual a la de perros. El número de canes infectados es mucho mayor, pero salvo en centros de adopciones, rehalas y lugares de alojamiento grupal de perros, los canes se encuentran diseminados por los hogares en los que conviven. Sin embargo, los gatos se dividen en dos modalidades de población: por un lado, los que viven como mascotas en hogares, ya sea de forma individual o varios miembros de una misma manada y aquellos llamados Asilvestrados, ferales o “callejeros”, que viven en sociedades complejas de numerosos miembros, donde se acumulan individuos que pueden concentrar patógenos en un mismo punto o nodo desde el que diseminar la enfermedad. Sabiendo que determinadas infecciones como Coronavirus, FIV, FeL pueden desencadenar el desarrollo de una infección activa y que estos virus están ampliamente repartidos por la población asilvestrada, podemos aventurar que una colonia de gatos sin control sanitario puede representar un riesgo epidemiológico para la población de canes y de Seres Humanos en la zona donde se sitúa dicha colonia. Por ello la vigilancia de estos reservorios debería considerarse de importancia en la evaluación de la enfermedad con controles periódicos aleatorios en dichos nodos potenciales.

Tanto gatos domésticos como ferales pueden ser diagnosticados puesto que este estudio ha demostrado que la infección o la enfermedad clínica son detectables por los métodos de diagnóstico disponibles en el mercado para los veterinarios clínicos. La detección de enfermedades y parasitaciones que comprometan la respuesta inmune de los felinos debería ser un factor determinante para realizar una prueba que identifique al parásito o la infección, según el modelo propuesto en el capítulo anterior (animal aparentemente sano o animal enfermo). Estos dos algoritmos aportan la guía necesaria

para identificar portadores y enfermos. La guía fue publicada tanto en revista indexada como en revista de divulgación para veterinarios, tanto en España como en Portugal, por lo que la detección de estos animales no debería ser complicada a partir de ahora. Las pruebas son tan fiables tanto para los gatos como para los perros, pero la interpretación requiere el punto de vista del veterinario clínico.

La vigilancia del vector es algo que ya se produce de manera efectiva y contamos con abundante información de su población y densidad, lo que hace falta ahora es aunar esos conocimientos con la carga parasitaria que presentan los ejemplares que se capturan periódicamente y cruzar dichos datos con la prevalencia de la zoonosis en esa zona, tanto en reservorios como en Humanos. Sería una información enormemente valiosa si se pudiesen obtener datos de tendencias de las distintas especies por territorios para poder compararlos con los datos de la población humana, mes a mes, año a año, y así poder establecer medidas de control y planes de erradicación.

La formación de los Profesionales de la Atención Primaria, a la hora de identificar las lesiones nodulares y ulcerosas únicas en personas de zonas de riesgo, debería estar incluida en programas de vigilancia que lleven a mejorar el conocimiento real de pacientes infectados. Esta formación debería incluir conocimientos de la enfermedad, actualización periódica de la epidemiología local y métodos de diagnóstico en el propio Centro de Salud, sobre todo para las formas cutáneas, de forma que éstas no pasen desapercibidas para el Sistema Sanitario. El método fácil y el bajo coste de una prueba dermatológica de identificación del parásito, hace viable esta propuesta.

Los profesionales veterinarios deben mejorar su conocimiento de la enfermedad y tener algún tipo de inspección institucional para asegurar que se están declarando todos los casos de leishmaniosis que se detectan. Esto puede ser realmente sencillo con la implantación del modelo de receta electrónica, creando un listado de medicamentos antimicrobianos que no puedan ser recetados en modelo en papel, solamente bajo receta electrónica. Con ello, se posibilita que las inspecciones se lleven a cabo de forma automatizada a través del sistema informático y así poder comprobar que cada animal recetado ha sido declarado como infectado. Del mismo modo, la detección o diagnóstico laboratorial positivo por parte de laboratorios independientes debería ser controlado y estos emitir un listado periódico de diagnósticos positivos que posibiliten a las autoridades sanitarias veterinarias el control de la prevalencia real.

Otro modelo alternativo para dicho control sería el crear un “visado” basado en el ya existente para la Farmacia Humana^{60,61}, de manera que la prescripción de un medicamento leishmanicida deba llevar un sello de control o visado del Colegio Oficial de Veterinarios o del Consejo Andaluz de Colegios de Veterinarios que supervise que el animal es realmente positivo, que el tratamiento sigue unas pautas previamente establecidas y científicamente consensuadas y que se ha declarado correctamente.

Tanto los animales tratados (perros y gatos) como el resto de los perros aparentemente sanos, deberían someterse anualmente a un análisis serológico y de obligado cumplimiento y cuyo resultado sea anotado en su documento sanitario

(Pasaporte Europeo) en la “Sección VIII: Otros tratamientos parasitarios” o en su ficha clínica del Registro Andaluz de Identificación Animal, el mismo registro donde se anotan los tratamientos obligatorios por Ley^{59,67,68,69,70,71,72,73,74,75,76}.

Por último, proveer los medios necesarios para crear un sistema eficaz de ayuda al control de esta zoonosis porque como se indicó en el estudio⁶² de 2019 y los centros de alojamiento de animales donde éstos se concentran en grandes cantidades, son nodos que, por un lado, atraen al vector por la alta densidad de animales de los que alimentarse y, por otro, pueden resultar un riesgo para la Población Humana colindante. Muchos de estos centros carecen de las condiciones económicas suficientes para afrontar medidas de control y, sobre todo, los tratamientos leishmanicidas o preventivos debido al alto coste de dichos medicamentos en el mercado. Habría que buscar una manera de posibilitar la atención a estos reservorios con el fin de proteger a las Personas que viven en las cercanías de estos centros.

Es muy importante que las autoridades conozcan este riesgo y sepan la situación en la que se encuentran los reservorios tanto de Leishmaniosis como del resto de zoonosis vectoriales citadas en este estudio y tomen medidas con el fin de reforzar la detección y control de vectores, reservorios infectados. También es un ejercicio de responsabilidad hacia nuestros países vecinos el establecer medidas para el control de estas enfermedades y trazar las estrategias para evitar la creación de Exonodos y prevenir la **Transmisión Diferida Facilitada** en lo posible. Por ello, proponemos las siguientes medidas:

Incrementar la vigilancia sobre las zoonosis vectoriales del Mediterráneo y establecer medidas de control de calidad de las declaraciones tanto en reservorios como en la población.

Es necesaria la creación de grupos de control multidisciplinares que vigilen constantemente la situación dentro de un modelo One Health como el que recientemente se ha creado entre la Universidad de Málaga y el Colegio Oficial de Veterinarios, o el grupo que aúna los Colegios Oficiales de las profesiones Sanitarias de Nuestra provincia (Medicina, Veterinaria, Enfermería, Fisioterapia etc.). Dichos grupos tendrían la labor de diseñar programas para cruzar datos entre Vectores, Medio Ambiente, Climatología, Salud Pública, Veterinaria, Epidemiología.

La adopción y tránsito de animales de compañía dentro y fuera de nuestras fronteras no debe reducirse solo a unas pocas enfermedades. Dicho tránsito no es una necesidad vital para los Ciudadanos y sí una responsabilidad frente al resto de la población, por lo tanto, el coste económico del control de dichos movimientos debe recaer en los responsables de dichos movimientos. Por ello, es recomendable que un observatorio One Health monitorice constantemente la situación de las zoonosis en los territorios de la Unión Europea y dictamine de forma periódica cuáles de estos patógenos deben ser monitorizados y controlados, estableciendo listados anuales de enfermedades que deberán ser detectadas y certificadas antes de autorizar el tránsito de dichos animales fuera de nuestras fronteras. El sistema TRACES^{77,78,79,80,81} debe ser

reforzado y las Autoridades Sanitarias del país de destino deben conocer el estado en el que llegan los animales, así como los futuros propietarios. Una de las premisas, que deberían ser obligatorias para la adopción internacional de mascotas, es que el futuro adoptante o, en su defecto, la asociación receptora, exprese de forma inequívoca que conoce la situación sanitaria del animal del que se van a hacer responsables, y que pueden afrontar económicamente los tratamientos y seguimientos necesarios para evitar que el animal se convierta en un portador efectivo de las zoonosis que lleva en su interior.

Este requisito debería ser extendido a las adopciones dentro de nuestro territorio. Los futuros adoptantes deberían firmar un documento de adhesión a un programa de vigilancia y control de zoonosis y cumplir con revisiones periódicas de sus animales, así como comprometerse al control sanitario de sus animales y a la prevención de la transmisión de zoonosis.

Las Autoridades deben elaborar normas para dicha vigilancia, estableciendo controles periódicos de las mascotas, a través del sistema de Identificación Animal que ya prevé la declaración de enfermedades. Dicho programa podría incrementar su actividad anotando los tratamientos obligatorios anuales elaborados por una Comisión Interdisciplinar de Vigilancia de Zoonosis.

De realizarse dicho proyecto, las Administraciones Públicas tendrían que hacerse cargo de controlar que dichas normas se cumplen proporcionando los medios de inspección necesarios para su correcto desarrollo.

Como medida última, deberían desarrollarse campañas divulgativas dirigidas a la población en general, informando de los conceptos One Health, zoonosis, enfermedades vectoriales, prevención y control de estas mediante campañas en los medios de comunicación. Una cuestión interesante por valorar sería la implementación de estos contenidos, adaptados a cada etapa de desarrollo, como materias transversales en los estudios obligatorios (colegios e institutos) a fin de concienciar a los futuros adultos sobre el cuidado de la Salud, propia y de los demás y poner en valor la labor individual que cada uno puede aportar al conjunto de la ciudadanía y al bienestar de los animales.

En cuanto a los gatos, se puede llegar al diagnóstico de dos maneras diferentes. En primer lugar, aquellos SIN signos clínicos que hagan sospechar que portan la infección. Son individuos que han entrado en contacto con el patógeno hace poco tiempo y, o están eliminando de manera efectiva los parásitos o no serán capaces de eliminarlo, pero aún no han tenido tiempo de mostrar síntomas.

En cualquier caso, los signos clínicos no son evidentes o son tan leves que el propietario no les ha dado importancia o no los ha detectado. Dentro de este grupo están las presentaciones cutáneas leves en forma de chancros de inoculación aislados o descamaciones leves o la uveítis. El gato con lesiones de este tipo debería ser controlado mediante raspado profundo de los nódulos y lesiones y posterior PCR o identificación por observación microscópica. En aquellos pacientes con uveítis, el cribado de infección por *Leishmania* debería entrar en el diferencial.

En estos casos, puede ocurrir que aun dando positivo en las técnicas de identificación del parásito, no haya alteraciones analíticas y que la serología resulte negativa. Esto no descarta ni confirma la infección clínica. Puede resultar un chancro autolimitante si el animal responde correctamente o un punto de distribución a partir del cual los parásitos se diseminen por el resto del organismo si falla la respuesta inmunitaria. Para ello, el clínico debe realizar una punción del ganglio regional y tratar de detectar el parásito, ya que su punto de diseminación linfática ocurre a partir de este primer punto de entrada. En cambio, si la diseminación es por vía sanguínea, cabe esperar que, en pocas semanas, empiecen a aparecer anticuerpos detectables por técnicas serológicas, así que todo animal que presente lesiones cutáneas con presencia del parásito deberá ser monitorizado a las pocas semanas para comprobar si la infección avanza o es combatida efectivamente. Es evidente que ese animal, aparte del tratamiento local a base de leishmanicida sublesional, debería beneficiarse de un tratamiento inmunomodulador que le ayude a su sistema inmune a combatir los parásitos que hayan podido acceder a su sistema circulatorio y linfático.

En referencia a las uveítis, si el paciente no presenta anticuerpos anti-leishmania, es difícil confirmar la infección por lo que deberá ser monitorizado pasadas unas semanas de la identificación del problema.

En aquellos gatos que presenten una identificación del parásito por técnicas de microscopía o PCR en lesiones cutáneas, sería aconsejable realizar nuevas tomas de muestras de varios puntos distintos y de ganglios para intentar encontrar parásitos que nos orienten a una infección diseminada. Esto cuenta con una dificultad doble: por un lado, la pericia del clínico al realizar la toma de la muestra y, por otro lado, la desigual presencia del parásito tanto en el tiempo como en el espacio corporal que puede darnos falsos negativos. Si hay una confirmación de infección y diseminación, entonces el tratamiento leishmanicida sistémico sería lo aconsejable mientras que, si solo se presenta lesión nodular o ulcerosa local, el tratamiento intra y sublesional podría ser suficiente. No obstante, tanto en el caso de infección clínica cutánea como infección localizada y la sospecha, nos lleva al monitoreo cíclico del animal cada 8 semanas.

Por otro lado, podemos encontrar animales que, estando aparentemente sanos, en un chequeo de salud, encontremos alteraciones analíticas como las que mayor frecuencia han mostrado en el estudio. En estos casos lo más razonable es realizar una serología cuantitativa y en caso de resultar negativa, buscar lesiones de las que extraer muestra para identificación del parásito.

En aquellos animales a los que se les pretenda realizar un chequeo rápido, sería aconsejable incluir en las series de inmunocromatografía de membrana, una prueba de detección de anticuerpos anti *L. infantum*, que en el caso de resultar positivo, y mientras no esté aún en el mercado la prueba semicuantitativa en la que este proyecto ha tomado parte, sería recomendable realizar una serología por IFI, examen clínico profundo y detallado y analítica completa que incluya hemograma, bioquímica y proteinograma.

Si analítica, clínica y serología con compatibles, no es necesario demostrar la presencia de parásito, siendo estos tres parámetros suficientes para proponer el inicio de un tratamiento sistémico completo.

Contrastando y comparando los resultados obtenidos, finalmente se ha elaborado un algoritmo que podría servir a los veterinarios en ejercicio clínico como de guía para el diagnóstico de Leishmaniosis felina, así como una categorización clínica que ayude al veterinario a enfocar cada caso de la manera más adecuada, tanto por la salud del animal como por la prevención de la diseminación de la enfermedad a nuevos reservorios o al propio Ser Humano.

Si se trata de un animal SANO al que se le ha descubierto algún signo compatible, se aplica el algoritmo de la (Figura 59).

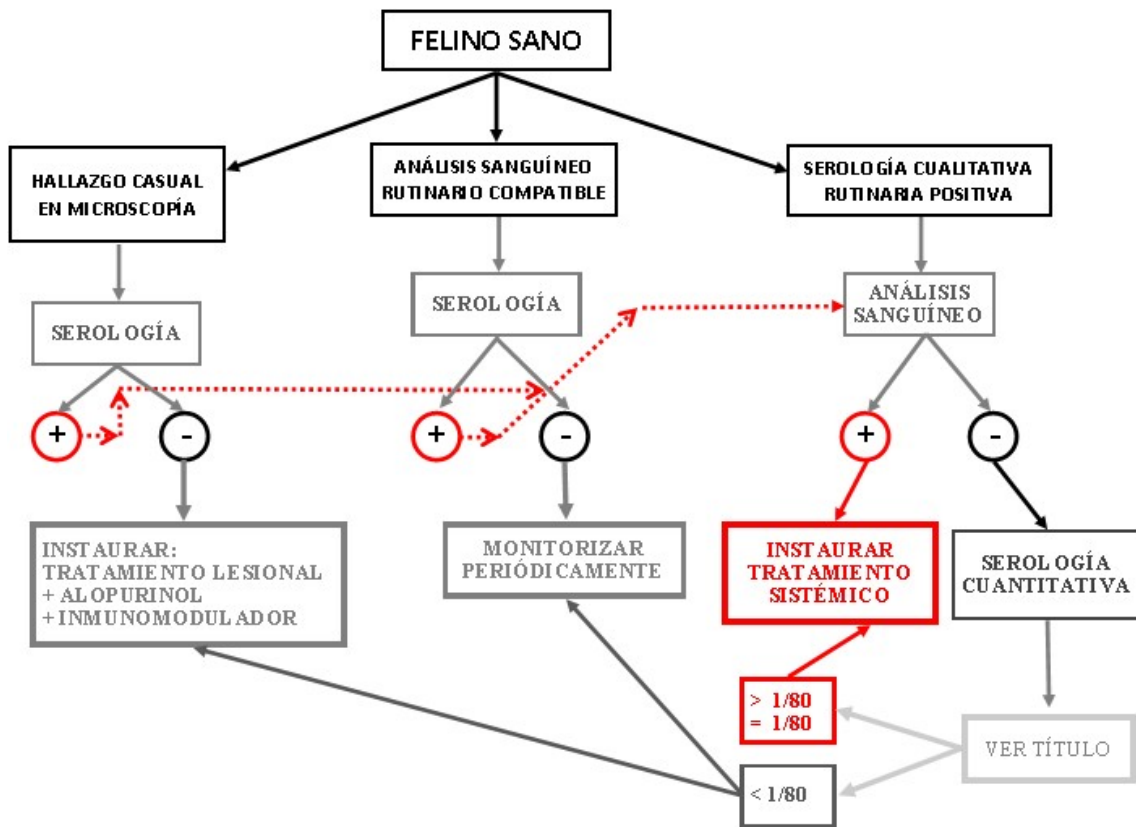


Figura 59: Algoritmo diagnóstico en gatos aparentemente sanos.

En estos animales, si se han encontrado amastigotes en un nódulo cutáneo o una úlcera, se debe realizar serología cuantitativa y en caso de ser negativa, instaurar un tratamiento intra y sublesional, además de ayudar al organismo a combatir los parásitos mediante un leishmanioestático como el alopurinol y un inmunomodulador inespecífico como la domperidona. En estos casos es también recomendable el uso de nutracéuticos que ayuden a mejorar el sistema inmune y a prevenir otras patologías. Si la serología es

positiva, hay que valorar el estado general del paciente realizando un análisis sanguíneo completo que incluya hemograma, bioquímica y proteinograma.

En cualquier serología positiva, la valoración del hemograma es fundamental para establecer el estado general del paciente y la proporción de proteínas para diseñar el tratamiento más adecuado. Las serologías cualitativas son meramente informativas de la presencia de anticuerpos, pero comprobar su número mediante una IFI se hace imprescindible para valorar cómo está respondiendo el sistema inmune y establecer el tipo de tratamiento a proporcionar.

Los títulos de anticuerpos inferiores (pero distintos de cero) al punto de corte de cada laboratorio deben ser valorados como animales que han estado en contacto con el patógeno y, desde el punto de vista de Salud Pública, lo responsable es aplicar un tratamiento leishmanioestático, inmunomodulador y monitorizar periódicamente al gato el resto de su vida, ya que los amastigotes pueden quedar acantonados en bazo por tiempo indefinido. Desde el punto de vista epidemiológico, deberían considerarse como portadores inaparentes potenciales.

En los títulos de IFI iguales o superiores al punto de corte del laboratorio, el parásito ha superado las barreras defensivas del gato y su sistema inmune ha fabricado suficientes anticuerpos como para que se produzca un cuadro clínico de infección activa y esto nos obliga a aplicar un tratamiento leishmanicida completo, junto a un leishmanioestático crónico al menos un año y tratamiento inmunomodulador periódico, cuya pauta aún está siendo objeto de estudio.

Cuando un gato presenta signos clínicos compatibles que hagan pensar al clínico en una leishmaniosis, se aplica el algoritmo reflejado en la (Figura 60).

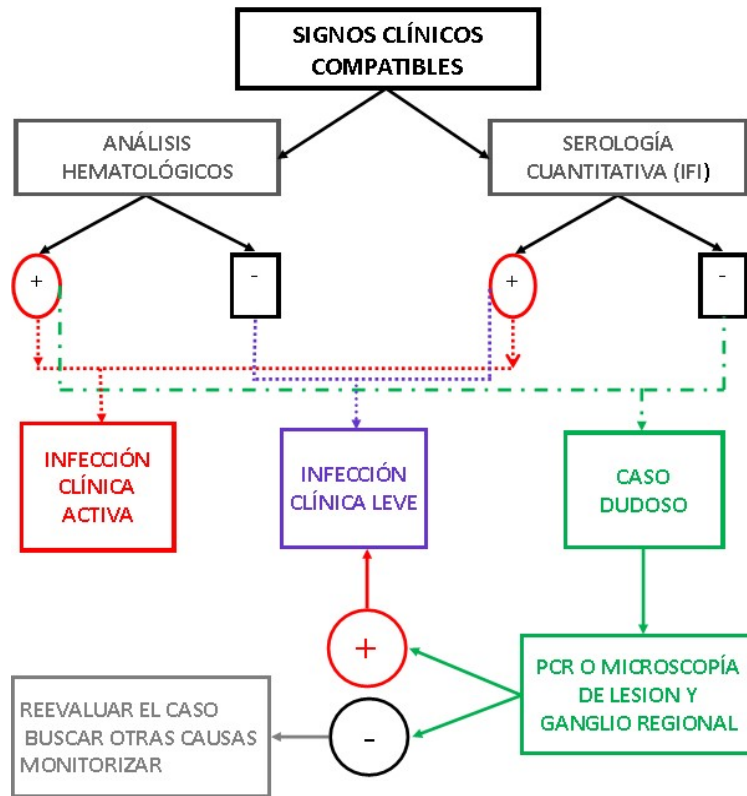


Figura 60: Algoritmo diagnóstico en gatos clínicamente sospechosos.

Aquellos animales que presenten la combinación de algunas de las alteraciones que mostraron mayor frecuencia en los signos clínicos, linfadenopatías, TRC aumentados, palidez de mucosas, condición corporal deficiente o malnutrición deberán considerarse sospechosos y las pruebas para detectar el parásito o los anticuerpos específicos, deberán realizarse a la mayor brevedad posible.

Otras alteraciones menos frecuentes pero presentes en sujetos positivos también deben incluir la infección por *L. infantum* en el cuadro diferencial del diagnóstico. El hecho de presentar una infección por *L. infantum* no descarta la coinfección por otros patógenos al igual que la detección de anticuerpos para los patógenos habituales en gato no descarta la coinfección por *L. infantum*. En ambos casos hay que cribar la lista de enfermedades probables sin descartar ninguna.

Una vez incluida la infección por *L. infantum* en el diagnóstico diferencial, el siguiente paso es la realización de pruebas serológicas para identificar tanto la presencia de anticuerpos anti-leishmania como su número, ya que altas proporciones de anticuerpos pueden orientar hacia mayores alteraciones derivadas de la respuesta humoral del animal. Junto a las pruebas serológicas, la analítica es el otro pilar fundamental en el diagnóstico y valoración del estado del paciente, debiendo incluir hemograma completo (incluyendo frotis sanguíneo), proteinograma y bioquímica general. Estos son los cuatro pilares sobre los que se asienta el abordaje de la Leishmaniosis.

En las pruebas que se realizan, podemos encontrar una serología negativa o muy baja, por debajo del punto de corte del laboratorio. Esto sucede si el animal ha estado en contacto con el parásito, pero no ha avanzado la infección, ya que los anticuerpos

permanecen en sangre una media de tres meses y en el caso de que el gato haya eliminado los parásitos, aún pueden quedar anticuerpos circulantes. También puede ser el caso contrario, que acabe de ser picado por el vector y que su organismo esté organizando la defensa. En tercer lugar, podemos encontrar infecciones subclínicas en las que los amastigotes quedan aislados en piel, en las lesiones nodulares, chancros o úlceras y no hayan provocado una respuesta generalizada. En estos casos, está indicada la realización de pruebas de identificación parasitaria, ya sea por microscopía o por PCR de raspados profundos o biopsias de las lesiones, además de un PAAF del ganglio regional correspondiente, ya que esta es una valiosa información que nos indica si la infección está avanzando por vía linfática. La no presencia o detección de los amastigotes en ganglio no descarta que, pasado un tiempo, no ocurra la diseminación, por lo que en gatos que hayan dado bajos niveles de anticuerpos con confirmación de presencia de *L. infantum* en la piel, pero ganglio negativo, aparte del tratamiento adecuado, el sujeto deberá ser monitorizado periódicamente para evaluar si la infección ha sido contenida o está avanzando. En cualquiera de los tres casos, está indicada la terapéutica adecuada y una monitorización periódica.

En los casos en que la serología sea claramente positiva pero los resultados analíticos no sean llamativos, podemos encontrarnos con otro caso de infección subclínica o en los podrónomos de una infección activa, el animal debe ser tratado y monitorizado de cerca con serologías y pruebas seriadas cada pocas semanas.

Por último, una serología negativa con analítica compatible, siempre nos creará la duda de si estamos ante un caso subclínico o si se trata de otra enfermedad. Ante la duda, además de ampliar el cuadro diferencial, siempre podemos repetir las pruebas dos meses después, tiempo suficiente para que la infección se active y avance.

ABREVIATURAS

®	Marca comercial registrada
aa/aaaa	Año
AEMT	Agencia Estatal de Meteorología
BID	Cada 12 horas
CACV	Consejo Andaluz de Colegios de Veterinarios
cc.	Centímetros cúbicos
CER/CES	Captura-Esterilización-Reintroducción/ Captura-Esterilización-Suelta
CIMES	Centro de Investigaciones Médico-Sanitarias
EDO	Enfermedad de Declaración Obligatoria
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético
ELISA	del inglés Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay - ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
FEL	Feline Leukemy, leucemia felina
FIG.	Figura
FIV	Feline InmunoDeficiencia, inmunodeficiencia felina
IC/LF	Inmunocromatografía/Lateral Flow
ID	Intradérmica
IFI	InmunoFluorescencia Indirecta
IM	Intramuscular
ISCI	Instituto de Salud Carlos III
IV	Intravenoso
IVL	Intravenoso lento
JJAA	Junta de Andalucía
LYD	Limpieza y desinfección
mg/kg	Miligramos por kilogramo de peso vivo
ml/kg	Mililitros por kilogramo de peso vivo
mm	Mes
NaCl	Cloruro Sódico
NET 10	NaCl+EDTA+TRIS al 10%
OVH	Ovariohisterectomía
PAAF	Punción y aspiración con Aguja Fina
PCR	del inglés Polymerase Chain Reaction
PCR Lamp	Amplificación isotérmica mediada por bucle del inglés Loop-mediated isothermal amplification
PO	Vía oral
QID	Cada 6 horas
RG	Ringer Lactato
SC	Subcutáneo
SID	Cada 24 horas
TID	Cada 8 horas
TRIS	tris(hidroximetil)aminometano
UMA	Universidad de Málaga

BIBLIOGRAFÍA

- 1 Domingo García Almagro. Leishmaniosis cutánea. Tesis doctoral UCM.2004. ISBN: 84-669-2810-3
- 2 F. Fariñas, Sandra L. Leishmaniosis: una visión general de la enfermedad. Clinifectovet Multimédica. 1 (2018) 1-14. ISSN 2604-6369.
- 3 Velez, R. et Al. Seroprevalence of canine infection with *L. infantum* in the Mediterranean region and identification of risk factors: Preventive Veterinary Medicine, 162 (2019) 67-75, DOI 10.1016/j.prevetmed.2018.10.015
- 4 Sistema de Información Geográfica de Datos Agrarios (SIGA) del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (MAPAMA)
- 5 Guías OMS. Leishmaniosis, www.WHO.int/es/news-room/fact-sheet/detail/leishmaniosis. 2 marzo 2020
- 6 M.K. Chatzis et Al. Evaluation of clinicopathological abnormalities in sick cats naturally infected by *L. infantum*. Heligon Pub. 6 (2020) e 05177. DOI 10.1016/j.heligon.2020.e05177
- 7 Morsy, T.A., et Al. Cats as reservoir hosts of human parasites in Amman, Jordan. Egypt. Soc. Parasitol. (1980) 10 (1) 5-18
- 8 J.A. Navarro et Al., Histopathological lesions in 15 Cats with Leishmaniosis. J. Comp. Path. 2010 (143) 297-302. DOI 10.1016/j.jcpa.2021.03.003
- 9 Manolis K. C. et Al., Evaluation of Indirect Immunofluorescence antibody test and Enzyme-linked Immunosorbent Assay for the Diagnosis of Infection by *L. infantum* in Clinically normal and sick cats. Experimental Parasitology 147 (2014) 54-59 DOI 10.1016/j.exppara.2014.10.0040014-4894
- 10 Susan L. et Al., AAEP Feline Retrovirus Testing and Management Guidelines. Journal of Feline Medicine and Surgery 22 (2020) 5-30. DOI 10.1177/1098612X19895940
- 11 Dirección General de Salud Pública (Consejería de Sanidad. Comunidad de Madrid); Colegio Oficial de Veterinarios de Madrid. Brote de leishmaniasis en Fuenlabrada y

- otros municipios de la Comunidad de Madrid: El papel de las liebres y los conejos como reservorios. Madrid: Comunidad de Madrid; 2017.
- 12 Molina R, Jiménez MI, Cruz I, Iriso A, Martín-Martín I, Sevillano O, et al. The hare (*Lepus granatensis*) as potencial sylvatic reservoir of *Leishmania Infantum* in Spain. Vet Parasitol 2012; 190(1-2):268-71
 - 13 L. Moral Gil. ¿qué ha sido de la Leishmaniasis?. An. Esp. Pediatr. Vol 1: 49:5-10 (1998)
 - 14 Manual OMS de Procedimientos para la Vigilancia y Control de la Leishmaniosis en las Américas 2019 ISBN 978-92-75-32063-1
 - 15 Laia Solano-Gallego · Guadalupe Miró . LeishVet guidelines, Research Support, Non-U.S. Gov't. DOI 10.1186/1756-3305-4-86
 - 16 Maria G. Pennisi. Leishmaniosis of Companion Animals in Europe: An Update. Veterinary Parasitology. 208 (2015) 35-47. DOI 10.1016/j.vetpar.2014.12.023
 - 17 Eva V. & Annamaria Passantino. Stray Dog and cat Laws and Enforcemen in Czech Republic and Italy. An. Ist. Sanit. 48 (2012) 10^o-1: 97-104. DOI 10.4415/ANN_12_01_16
 - 18 V. Rougeron et Al. First Clinical Case of Cutaneous Leishmaniasis Due to *L. braziliensis* in a Domestic Cat from French Guaiiana. Veterinary Parasitology 181 (2011) 325-328. DOI 10.1016/j.vetpar.2011.04.028
 - 19 Leishmaniasis en Andalucía, periodo 2003 – 2018. Sistema de Vigilancia Epidemiológico, BES 1219; 24-12 (2019) ISSN 1887-2530
 - 20 González-Beaton M J. et Al. Kaposi´s Sarcoma-like lesions and other nodules as cutaneous involent in AIDS-related visceral leishmaniasis. Br. J. Dermatol. 143 (2000) 1316-1318.
 - 21 Barrio J. et Al. *Leishmania* infection occurring in Herpes Zoster lesions in an HIV-positive patient. Br. J. Dermatol. 134 (1996) 164-166
 - 22 Borreau E. et Al. Interleukin (IL)-13 is the predominant Th2 cutokine in localized cutaneous leishmaniasis lesions and reder specific CD4+ T cell unresponsive to IL-12. J. Infect. Dis. 183 (2001) 953-959

- 23 Cima/Agencia Española del Medicamento. , sección Humana.
<https://cima.aemps.es/cima/publico/home.html>
- 24 Cimavet. Agencia Española del Medicamento. Sección Veterinaria.
<https://cimavet.aemps.es/cimavet/publico/home.html>
- 25 <https://www.vademecum.es/>
- 26 <https://www.sorianatural.es/producto/leishwow-perros-30kg>
- 27 <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>
- 28 Resultados de la vigilancia epidemiológica de las enfermedades transmisibles.
 informe anual. AÑOS 2017-2018 N.I.P.O. e-pub: 834-20-012-5
- 29 Rosa Gálvez, Ana Montoya et Al. Latest trends in *Leishmania infantum* infection in dogs in Spain, Part I: mapped. seroprevalence and sand fly distributions. Parasites Vectors (2020) 13:204. DOI. 10.1186/s13071-020-04081-7
- 30 J. Giner, A. Basurco, et Al. First report on natural infection with *Leishmania infantum* in a domestic ferret (*Mustela putorius furo*) in Spain, Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports, 19 (2020) 100369. ISSN 2405-9390, DOI 10.1016/j.vprsr.2020.100369.
- 31 www.juntadeandalucia.es/medioambiente/web/Bloques_Tematicos/Estado_Y_Calidad_De_Los_Recursos_Naturales/Suelo/Contaminacion_pdf/Evaluacion.pdf
- 32 https://www.juntadeandalucia.es/medioambiente/web/Bloques_Tematicos/Estado_Y_Calidad_De_Los_Recursos_Naturales/Suelo/Criterios_pdf/Tipologia.pdf
- 33 https://www.juntadeandalucia.es/medioambiente/web/Bloques_Tematicos/Estado_Y_Calidad_De_Los_Recursos_Naturales/Suelo/Criterios_pdf/Malaga.pdf
- 34 Informe Epidemiológico de las Enfermedades Transmisibles y no Transmisibles en Andalucía. Monografía nº 08 (2021) vol 26. ISSN: 2695-5989
- 35 "Leishmaniasis en Andalucía, periodo 2003 - 2018. Vol. 24, nº 12 BES 1219 viernes, 22 de marzo 2019. Dirección General Salud Pública y Ordenación Farmacéutica Consejería de Salud y Familias. JJAA. ISSN 1887-2530"

- 36 Epke A. Le Rutte, Roosmarijn van Straten, Paul A.M. Overgaaouw, Awareness and control of canine leishmaniosis: A survey among Spanish and French veterinarians, *Veterinary Parasitology*, 253 (2018) 87-93, ISSN 0304-4017,
- 37 Sandra López Fernández, Carmen Chicharro et Al. How Covid-19 Isolate Afected to the Epidemiology (Prevalence) of Main Mediterranean Vector-Borne Diseases (VBD) in Dogs. *Biomedical Journal of Scientificand Technical Research*. 49-4 (2023). <http://dx.doi.org/10.26717/BJSTR.2023.49.007835>
- 38 Simões-Mattos L, Mattos MR,et Al. The susceptibility of domestic cats (*Felis catus*) to experimental infection with *Leishmania braziliensis*. *Vet Parasitol*. 2005 Feb 28;127(3-4):199-208. doi: 10.1016/j.vetpar.2004.10.008.
- 39 Vides JP, Schwardt TF, Sobrinho LS, Marinho M, Laurenti MD, Biondo AW, Leutenegger C, Marcondes M. *Leishmania chagasi* infection in cats with dermatologic lesions from an endemic area of visceral leishmaniosis in Brazil. *Vet Parasitol*. 2011 May 31;178(1-2):22-8. doi: 10.1016/j.vetpar.2010.12.042.
- 40 Ozon C, Marty P, Pratlong F, Breton C, Blein M, Lelièvre A, Haas P. Disseminated feline leishmaniosis due to *Leishmania infantum* in Southern France. *Vet Parasitol*. 1998 Feb 28;75(2-3):273-7. doi: 10.1016/s0304-4017(97)00174-x.
- 41 Spada E, Canzi I, Baggiani L, Perego R, Vitale F, Migliazzo A, Proverbio D. Prevalence of *Leishmania infantum* and co-infections in stray cats in northern Italy. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. 2016 Apr;45:53-8. doi: 10.1016/j.cimid.2016.03.001.
- 42 Maia C, Pimenta P, Cardoso L. Feline leishmaniosis in Portugal-some remarks on disease and infection. *J Feline Med Surg*. 2015 Dec;17(12):1081-2. doi: 10.1177/1098612X15616996.
- 43 Morelli S, Colombo M, Dimzas D, Barlaam A, Traversa D, Di Cesare A, Russi I, Spoletini R, Paoletti B, Diakou A. *Leishmania infantum* Seroprevalence in Cats From Touristic Areas of Italy and Greece. *Front Vet Sci*. 2020 Dec 11;7:616566. doi: 10.3389/fvets.2020.616566.

- 44 Nasereddin A, Salant H, Abdeen Z. Feline leishmaniasis in Jerusalem: serological investigation. *Vet Parasitol.* 2008 Dec 20;158(4):364-9. doi: 10.1016/j.vetpar.2008.09.022.
- 45 Sobrinho LS, Rossi CN, Vides JP, Braga ET, Gomes AA, de Lima VM, Perri SH, Generoso D, Langoni H, Leutenegger C, Biondo AW, Laurenti MD, Marcondes M. Coinfection of *Leishmania chagasi* with *Toxoplasma gondii*, Feline Immunodeficiency Virus (FIV) and Feline Leukemia Virus (FeLV) in cats from an endemic area of zoonotic visceral leishmaniasis. *Vet Parasitol.* 2012 Jun 8;187(1-2):302-6. doi: 10.1016/j.vetpar.2012.01.010.
- 46 Longoni SS, López-Céspedes A, Sánchez-Moreno M, Bolio-Gonzalez ME, Sauri-Arceo CH, Rodríguez-Vivas RI, Marín C. Detection of different *Leishmania* spp. and *Trypanosoma cruzi* antibodies in cats from the Yucatan Peninsula (Mexico) using an iron superoxide dismutase excreted as antigen. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 2012 Sep;35(5):469-76. doi: 10.1016/j.cimid.2012.04.003.
- 47 Pennisi MG, Cardoso L, Baneth G, Bourdeau P, Koutinas A, Miró G, Oliva G, Solano-Gallego L. LeishVet update and recommendations on feline leishmaniasis. *Parasit Vectors.* 2015 Jun 4;8:302. doi: 10.1186/s13071-015-0909-z.
- 48 Navarro JA, Sánchez J, Peñafiel-Verdú C, Buendía AJ, Altimira J, Vilafranca M. Histopathological lesions in 15 cats with leishmaniasis. *J Comp Pathol.* 2010 Nov;143(4):297-302. doi: 10.1016/j.jcpa.2010.03.003.
- 49 Dedola C, Zobba R, Varcasia A, Visco S, Alberti A, Pipia AP, Scala A, Pinna Parpaglia ML. Serological and molecular detection of *Leishmania infantum* in cats of Northern Sardinia, Italy. *Vet Parasitol Reg Stud Reports.* 2018 Aug;13:120-123. doi: 10.1016/j.vprsr.2018.05.003.
- 50 Oliveira TM, Pereira VF, Benvenga GU, Martin MF, Benassi JC, da Silva DT, Starke-Buzetti WA. Conjunctival swab PCR to detect *Leishmania* spp. in cats. *Rev Bras Parasitol Vet.* 2015 Apr-Jun;24(2):220-2. doi: 10.1590/S1984-29612015016.
- 51 Chatzis MK, Andreadou M, Leontides L, Kasabalas D, Mylonakis M, Koutinas AF, Rallis T, Ikononopoulos J, Saridomichelakis MN. Cytological and molecular detection of

- Leishmania infantum* in different tissues of clinically normal and sick cats. Vet Parasitol. 2014 May 28;202(3-4):217-25. doi: 10.1016/j.vetpar.2014.02.044.
- 52 Manual Terrestre de la OIE 2021. Cap. 3.1.11.
www.woah.org/fileadmin/Home/esp/Health_standards/tahm/3.01.11_Leishmaniosis.pdf
- 53 CARVALHO S.F., LEMOS E.M., COREY R. & DIETZE R. (2003). Performance of recombinant K39 antigen in the diagnosis of Brazilian visceral leishmaniasis. Am. J. Trop. Med. Hyg., 68, 321–324
- 54 CORTES S., ROLAO N., RAMADA J. & CAMPINO L. (2004). PCR as a rapid and sensitive tool in the diagnosis of human and canine leishmaniasis using *Leishmania donovani* s.l.-specific kinetoplastid primers. Trans. R. Soc. Trop. Med Hyg., 98, 12–17."
- 55 FISA R., RIERA C., GÁLLEGO M., MANUBENS J. & PORTÚS M. (2001). Nested PCR for diagnosis of canine leishmaniasis in peripheral blood, lymph node and bone marrow aspirates. Vet. Parasitol., 99, 105–111."
- 56 OLIVA G., SCALONE A., FOGLIA MANZILLO V., GRAMICCIA M., PAGANO A., DI MUCCIO T. & GRADONII L. (2006). Incidence and time course of *Leishmania infantum* infections examined by parasitological, serologic, and nested-PCR techniques in a cohort of naive dogs exposed to three consecutive transmission seasons. J Clin Microbiol. 2006 Apr;44(4):1318-22. doi: 10.1128/JCM.44.4.1318-1322.2006.
- 57 Lenea Campino, Sofía Cortes et Al. The first detection of *Leishmania major* in naturally infected *Sergentomyia minuta* in Portugal. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Frio de Janeiro Vol 108 (2013)
- 58 Daniel Bravo-Barriga, Ricardo Parreira, Carla Maia, Juan Blanco-Ciudad, Maria Odete Afonso, Eva Frontera, Lenea Campino, Juan Enrique Pérez-Martín, Francisco Javier Serrano Aguilera & David Reina. 2016. "First molecular detection of *Leishmania tarantolae*-like DNA in *Sergentomyia minuta* in Spain". Parasitology Research, 115 (3), 1339-44.
- 59 <https://www.raia.es/index.php?operacion=legislacion>

- 60 "Real Decreto 618/2007, de 11 de mayo, por el que se regula el procedimiento para el establecimiento, mediante visado, de reservas singulares a las condiciones de prescripción y dispensación de los medicamentos.
- 61 Resolución, de 30 de noviembre de 2021, de la Dirección y Gerencia del Servicio Andaluz de Salud, sobre gestión y control del visado de recetas.
- 62 López SM. Sustitución y uso de medicamento de humana para el tratamiento de leishmaniosis en perros. *Farmacéuticos Comunitarios*. 2019 Sep 30;11(3):13-18. doi:10.5672/FC.2173-9218.(2019/Vol11).003.03. ISSN 1885-8619 © SEFAC (Sociedad Española de Farmacia Familiar y Comunitaria).
- 63 Federico Benjamín Galacho Jiménez. Modelo territorial desarrollado por el planeamiento urbanístico de los años noventa del Siglo XX en la Costa del sol. *Baetica. Estudios de Arte, Geografía e Historia*, 31, 2009, 35-59. ISSN: 0212-5099
- 64 José María Orellana Macías. Evaluación de la capacidad de acogida del territorio para usos urbanos mediante el uso de SIG y técnicas de evaluación multicriterio. El caso de la urbanización difusa en la Axarquía (Málaga). eu-repo/semantics/bachelorThesis-eu-repo/semantics/openAccess. <https://riuma.uma.es/xmlui/>
- 65 Caracterización agraria del territorio de la Oficina Comarcal Agraria "Axarquía-Costa de Málaga", provincia de Málaga, septiembre 2014. INFORME Del área de gestión agraria y pesquera de Andalucía, Consejería de Agricultura, Pesca y Desarrollo Rural.
- 66 Evaluación de la eficacia de un extracto de *Artemisia annua* en leishmaniosis canina. Rosa Tejada Rascón, Virginia Iniesta Orozco. *Revista de Fitoterapia* 2021; 19 (1): 43-60
- 67 Orden de 10 de mayo de 2006, de la Consejería de Gobernación, por la que se crea el fichero automatizado de datos de la Consejería de Gobernación denominado Registro Central de Animales de Compañía.
- 68 Orden de 14 de junio de 2006, de la Consejería de Gobernación, por la que se desarrolla el Decreto 92/2005, de 29 de marzo, por el que se regulan la identificación y los registros de determinados animales de compañía en la Comunidad Autónoma de Andalucía. Y Corrección de errores del Anexo III de la Orden de 14 de junio de 2006, de la Consejería

- de Gobernación, por la que se desarrolla el Decreto 92/2005, de 29 de marzo, por el que se regula la identificación de los registros de determinados animales de compañía en la Comunidad Autónoma de Andalucía (BOJA núm. 125, de 30.6.2006)
- 69 Decreto 92/2005, de 29 de marzo, por el que se regulan la identificación y los registros de determinados animales de compañía en la Comunidad Autónoma de Andalucía.
- 70 Decreto 246/2011, de 19 de julio, por el que se modifica el Decreto 92/2005, de 29 de marzo, por el que se regulan la identificación y los registros de determinados animales de compañía en la Comunidad Autónoma de Andalucía y el Decreto 42/2008, de 12 de febrero, por el que se regula la tenencia de animales potencialmente peligrosos en la Comunidad Autónoma de Andalucía, para su adaptación a la Ley 17/2009, de 23 de noviembre, sobre el libre acceso a las actividades de servicios y su ejercicio
- 71 Decreto 133/2005, de 24 de mayo, de distribución de las competencias establecidas en la Ley 11/2003, de 24 de noviembre, de protección de los animales, entre las Consejerías de Gobernación y de Agricultura y Pesca.
- 72 Decreto 42/2008, de 12 de febrero, por el que se regula la tenencia de animales potencialmente peligrosos en la Comunidad Autónoma de Andalucía.
- 73 Orden de 28 de mayo de 2008, de la Consejería de Gobernación, por la que se desarrolla el Decreto 42/2008, de 12 de febrero, que regula la tenencia de animales potencialmente peligrosos en la Comunidad Autónoma de Andalucía, en relación con el Decreto 92/2005, de 29 de marzo, que regula la identificación y registro de determinados animales de compañía
- 74 Ley 11/2003, de 24 de noviembre, de Protección de los Animales.
- 75 Orden de 9 de mayo de 2017, por la que se modifican la Orden de 14 de junio de 2006, que desarrolla el Decreto 92/2005, de 29 de marzo, por el que se regulan la identificación y los registros de determinados animales de compañía en la Comunidad Autónoma de Andalucía, y la Orden de 28 de mayo de 2008, que desarrolla el Decreto 42/2008, de 12 de febrero, que regula la tenencia de animales potencialmente peligrosos en la Comunidad Autónoma de Andalucía.
- 76 Orden de 5 de agosto de 2021, por la que se modifican la Orden de 14 de junio de 2006 que desarrolla el Decreto 92/2005, de 29 de marzo, por el que se regulan la identificación y los registros de determinados animales de compañía en la Comunidad Autónoma de Andalucía, y la Orden de 28 de mayo de 2008, que desarrolla el Decreto 42/2008, de 12 de febrero, que regula la tenencia de animales potencialmente peligrosos en la Comunidad Autónoma de Andalucía.
- 77 Reglamento (UE) 2017/625 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 15 de marzo de 2017, relativo a los controles y otras actividades oficiales realizados para garantizar la

aplicación de la legislación sobre alimentos y piensos, y de las normas sobre salud y bienestar de los animales, sanidad vegetal y productos fitosanitarios, y por el que se modifican los Reglamentos (CE) n.º 999/2001, (CE) n.º 396/2005, (CE) n.º 1069/2009, (CE) n.º 1107/2009, (UE) n.º 1151/2012, (UE) n.º 652/2014, (UE) 2016/429 y (UE) 2016/2031 del Parlamento Europeo y del Consejo, los Reglamentos (CE) n.º 1/2005 y (CE) n.º 1099/2009 del Consejo, y las Directivas 98/58/CE, 1999/74/CE, 2007/43/CE, 2008/119/CE y 2008/120/CE del Consejo, y por el que se derogan los Reglamentos (CE) n.º 854/2004 y (CE) n.º 882/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo, las Directivas 89/608/CEE, 89/662/CEE, 90/425/CEE, 91/496/CEE, 96/23/CE, 96/93/CE y 97/78/CE del Consejo y la Decisión 92/438/CEE del Consejo (Reglamento sobre controles oficiales) Texto pertinente a efectos del EEE.

- 78 Reglamento de Ejecución (UE) 2019/1715 de la Comisión de 30 de septiembre de 2019 por el que se establecen las normas para el funcionamiento del sistema de gestión de la información sobre los controles oficiales y sus componentes (Reglamento SGICO)
- 79 Reglamento de Ejecución (UE) 2020/2235 de la Comisión, de 16 de diciembre de 2020, por el que se establecen normas para la aplicación de los Reglamentos (UE) 2016/429 y (UE) 2017/625 del Parlamento Europeo y del Consejo por lo que respecta a los modelos de certificados zoosanitarios, los modelos de certificados oficiales y los modelos de certificados zoosanitarios-oficiales para la entrada en la Unión y los desplazamientos dentro de la Unión de las partidas de determinadas categorías de animales y mercancías, así como la certificación oficial relativa a dichos certificados, y se derogan el Reglamento (CE) nº 599/2004, los Reglamentos de Ejecución (UE) nº 636/2014 y (UE) 2019/628, la Directiva 98/68/CE y las Decisiones 2000/572/CE, 2003/779/CE y 2007/240/CE (Texto pertinente a efectos del EEE).
- 80 Reglamento de Ejecución (UE) 2021/403 de la Comisión de 24 de marzo de 2021 por el que se establecen normas para la aplicación de los Reglamentos (UE) 2016/429 y (UE) 2017/625 del Parlamento Europeo y del Consejo por lo que respecta a los modelos de certificados zoosanitarios y los modelos de certificados zoosanitarios-oficiales para la entrada en la Unión y los desplazamientos entre Estados miembros de las partidas de determinadas categorías de animales terrestres y sus productos reproductivos y a la certificación oficial relativa a dichos certificados, y por el que se deroga la Decisión 2010/470/UE

- 81 Reglamento de ejecución (UE) 2021/547 de la Comisión de 29 de marzo de 2021 por el que se modifica el Reglamento de Ejecución (UE) 2019/1715 en lo que respecta a los procedimientos para el establecimiento y la utilización de ADIS y EUROPHYT, la expedición de certificados zoosanitarios, certificados oficiales, certificados zoosanitarios/oficiales y documentos comerciales electrónicos, la utilización de firmas electrónicas y el funcionamiento de TRACES, y por el que se deroga la Decisión 97/152/CE.

ANEXO DE AVALES Y PUBLICACIONES

1	<p>Sandra López Fernández, Carmen Chicharro, Javier Nieto, Carrillo, Fernando Fariñas Guerrero, Eduardo Martínez Manzanares and Encarnación Clavijo Frutos. <i>How Covid-19 Isolate Affected to the Epidemiology (Prevalence) of Main Mediterranean Vector-Borne Diseases (VBD) in Dogs.</i> Biomed J Sci & Tech Res 49(4)-2023. BJSTR. MS.ID.007835. ISSN: 2574 -1241. DOI: 10.26717/BJSTR.2023.49.007835 https://biomedres.us/fulltexts/BJSTR.MS.ID.007835.php</p>
2	<p>Sandra López Fernández, Carmen Chicharro², Javier Nieto², Fernando Fariñas Guerrero³, Eduardo Martínez Manzanares , Encarnación Clavijo Frutos and Eugenia Carrillo <i>Feline Leishmaniasis Diagnostic Algorithm</i> Current Trends on Biotechnology & Microbiology, DOI: 10.32474/CTBM.2023.03.000170 ISSN: 2644-1381 Research Article https://lupinepublishers.com/biotechnology-microbiology/pdf/CTBM.MS.ID.000170.pdf</p>
3	<p>López SM. <i>Sustitución y uso de medicamento de humana para el tratamiento de leishmania en perros.</i> Farm Comunitarios. 2019 Sep 30;11(3):13-18. doi: 10.5672/FC.2173-9218. (2019/Vol11).003.03 https://www.farmaceticoscomunitarios.org/es/journal-article/sustitucion-uso-medicamento-humana-tratamiento-leishmania-perros</p>
4	<p>Sandra López Fernández, Fernando Fariñas Guerrero, Carmen Chicharro, Eugenia Carrillo, Encarnación Clavijo, Eduardo Martínez-Manzanares. <i>Extracción de Médula ósea para el diagnóstico de Leishmaniosis en Gatos</i> Revista Argos Volumen 9 Número 2011 2019/9. Páginas 58-60 Editor Grupo ASIS, ISSN1699-7875 https://www.portalveterinaria.com/pdfjs/web/viewer.php?file=/upload/riviste/Argos211_MR.pdf#page=62</p>
5	<p>Fernando Fariñas Guerrero, Sandra López Fernández <i>Leishmaniosis: una visión general de la enfermedad</i> Clininfectovet - Revista de enfermedades infecciosas e inmunología veterinaria, Volumen 1, Número 1, Páginas 2-14. Multimédica Ediciones Veterinarias - ISSN 2604-6369 https://revistas-veterinaria.multimedica.es/clininfectovet/leishmaniosis-una-vision-general-de-la-enfermedad/</p>