



Facultad de Veterinaria
Universidad Zaragoza



Trabajo Fin de Grado en Veterinaria

Prevalencia de *Leishmania infantum* en gatos vagabundos mediante la
técnica de Aglutinación Directa Simplificada

Prevalence of *Leishmania infantum* in stray cats using the Simplified
Direct Agglutination Test

Autor/es

Jon Langa Manchón

Director/es

M^a Jesús Gracia Salinas

M^a Paz Peris Peris

Facultad de Veterinaria
2021-2022

ÍNDICE

1. RESUMEN/ ABSTRACT.....	2
2. INTRODUCCIÓN.....	2
2.1. <i>Leishmania</i>	3
2.1.1.Morfología.....	3
2.1.2.Ciclo biológico.....	4
2.1.3.Especies del Gº <i>Leishmania</i> de interés sanitario.....	5
2.1.4. <i>Phlebotomus sp.</i> como vector.....	7
2.1.5.Cultivo <i>in-vitro</i> de <i>L. infantum</i>	7
2.2. Leishmaniosis felina.....	9
2.2.1. Epidemiología.....	9
2.2.2. Patogenia y signos clínicos.....	11
2.2.3. Diagnóstico.....	13
2.2.4. Tratamiento y prevención.....	15
3. OBJETIVOS Y JUSTIFICACIÓN.....	16
4. METODOLOGÍA.....	16
4.1. Búsqueda de información.....	16
4.2. Zona de estudio y muestras a analizar.....	17
4.3. Análisis de las muestras mediante DAT Simplificada.....	17
4.3.1.Cultivo de <i>L. infantum</i> y obtención del antígeno.....	17
4.3.2.Diagnóstico serológico mediante la técnica de aglutinación directa simplificada.....	20
4.3.3.Técnica de referencia IFI.....	22
4.3.4.Análisis estadístico.....	22
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	23
5.1. Población de estudio.....	23
5.2. Cultivo de <i>L.infantum</i> y obtención del antígeno.....	23
5.3. Lectura DAT Simplificada y resultados.....	23
6. CONCLUSIONES.....	26
7. VALORACION PERSONAL.....	27
8. BIBLIOGRAFÍA.....	27
9. ANEXOS.....	32

1. RESUMEN/ ABSTRACT

La leishmaniosis es una enfermedad endémica en España, cuyo agente etiológico es *Leishmania infantum* y su principal reservorio es el perro. Es una parasitación frecuente en la especie canina mientras que apenas hay información de este proceso en la especie felina. Existen dudas respecto al papel de gato tanto en la transmisión como en la susceptibilidad a la enfermedad y existen pocos estudios de prevalencia en esta especie. La leishmaniosis se transmite por la picadura de flebotomos, por lo que animales vagabundos o aquellos que viven o duermen en el exterior están más expuestos a la parasitación. El diagnóstico se puede realizar mediante técnicas indirectas. La Técnica de Aglutinación Directa Simplificada (DAT Simplificada) se ha utilizado en la especie canina con buenos resultados, pero hasta la fecha no se ha evaluado su efectividad en la especie felina.

En este Trabajo Fin de Grado se ha realizado un estudio sobre la prevalencia de *Leishmania infantum* en la población felina callejera de Zaragoza mediante una modificación de la Técnica de Aglutinación Directa (DAT Simplificada) y posteriormente se han comparado los resultados y el protocolo con una técnica de referencia (Inmunofluorescencia Indirecta).

En este estudio se ha observado que de la población felina estudiada (n=88), un 10'2% es seropositiva frente a *L. infantum* y tras la comparación entre la DAT Simplificada y la Inmunofluorescencia Indirecta, se determina que la DAT es una técnica válida para su uso en esta especie, usando como punto de corte la dilución 1:100.

ABSTRACT

Leishmaniasis is an endemic disease in Spain, whose etiological agent is *Leishmania infantum* and the dog is the main reservoir. It is a frequent parasitization in the canine species while there is hardly any information of this process in the feline species. There are doubts about the role of the cat in both transmission and susceptibility to the disease and there are few prevalence studies in cats. Leishmaniasis is transmitted by the bite of sandflies, so stray animal or those that live or sleep outside are more exposed to parasitism. Diagnosis can be made by indirect techniques. The simplified Direct Agglutination Technique (Easy DAT) has been used in the canine species with good results, but to date its effectiveness in the feline specie has not been evaluated.

In this Final Degree Project, we have made a study of the prevalence of *Leishmania infantum* in the street feline population of Zaragoza by means of a modification of the Direct Agglutination Technique (Easy-DAT) and subsequently the results and the protocol have been compared with a technique of reference (Indirect Immunofluorescence).

In this study it has been observed that of the studied feline population (n=88), the 10'2% is seropositive against *L. infantum*, and after the comparison between the Easy-DAT and the Indirect

Immunofluorescence, it is determined that the DAT is a valid technique for its use in this species, using the 1:100 dilution as cut-off point.

2. INTRODUCCIÓN

La leishmaniosis es una enfermedad parasitaria zoonótica de distribución mundial que se produce por protozoos del género *Leishmania* mediante la picadura de insectos hematófagos del género *Phlebotomus*. Esta enfermedad afecta a un gran número de especies vertebradas, entre ellas el hombre, y siendo la especie canina el principal reservorio, causando en ella un cuadro clínico que puede ser subclínico o puede evolucionar a una enfermedad cutánea-visceral (Alvar et al., 2004).

Esta enfermedad supone un problema de Salud Pública, ya que su distribución es mundial, afectando a más de 350 millones de personas (OMS, 2010). Principalmente afecta a la cuenca mediterránea, América Central y Sudamérica y parte de Asia (Grammiccia y Gradoni, 2005).

Mientras que parece estar claro el papel de la especie canina en la leishmaniosis, en la especie felina todavía existen pocos estudios y aún no se sabe con certeza cuál es su papel en la transmisión de la enfermedad (Verde et al., 2015).

2.1. *Leishmania*

Leishmania sp. es un protozoo flagelado perteneciente al orden *Kinetoplastida* y a la familia *Trypanosomatidae* (Akhoundi et al., 2016).

Son parásitos heteroxenos, es decir, su ciclo biológico se desarrolla en dos hospedadores diferentes. Los animales vertebrados (cánidos, roedores, felinos, hombre) actúan como hospedadores definitivos mientras que los dípteros del género *Phlebotomus* actúan como hospedadores intermediarios y vectores. En el hospedador vertebrado se desarrollan en las células macrófagas del sistema fagocítico, mientras que en el hospedador invertebrado colonizan la luz del tubo digestivo (Gállego, 2003).

2.1.1. Morfología

Estos parásitos muestran una gran variedad de morfologías y formas de desarrollo para conseguir adaptarse al hospedador vertebrado y al vector (Sunter J., Gull K., 2017).

- La forma de **amastigote** es la única que se desarrolla y multiplica en el hospedador vertebrado. Coloniza el interior celular de los macrófagos del sistema fagocítico. Al observarlo al microscopio óptico, con el uso de colorantes de uso habitual en hematología, muestra una estructura muy simple. Tanto en su localización intracelular, como cuando quedan libres después de su multiplicación, presentan una forma oval de 3-5µm en la que se distingue con claridad el núcleo y el kinetoplasto (corpúsculo baciliforme).

- Los **promastigotes** son las formas que se desarrollan en el flebotomo y en cultivos in vitro en el laboratorio. Tienen una forma fusiforme (7-15µm) en la que se puede observar, gracias a técnicas de tinción, el núcleo, el kinetoplasto y el flagelo, siendo este último también perceptible en observaciones en fresco (Gállego, 2003).
 - Los **promastigotes procíclicos** tienen una longitud de 6'5 a 11'5µm y un flagelo de longitud menor a la del cuerpo (Rogers, Chance y Bates, 2002).
 - Los **promastigotes metacíclicos** tienen una longitud de hasta 8µm y un flagelo más largo que el cuerpo (Rogers, Chance y Bates, 2002).
 - Los **paramastigotes** presentan un kinetoplasto adyacente al núcleo y presentan un flagelo externo (Rogers, Chance y Bates, 2002).

En la tabla 1 se presentan las distintas morfologías que puede presentar *Leishmania sp.*

Morphological category	Criteria	Illustration
Amastigote	Ovoid body form, no flagellum protruding from flagellar pocket	
Procyclic promastigote	Body length 6·5 – 11·5 µm, flagellum < body length (body width variable)	
Nectomonad promastigote	Body length ≥ 12 µm, (body width and flagellar length variable)	
Leptomonad promastigote	Body length 6·5 – 11·5 µm, flagellum ≥ body length (body width variable)	
Haptomonad promastigote	Disc-like expansion of flagellar tip (body form and flagellar length variable)	
Metacyclic promastigote	Body length ≤ 8 µm, body width ≤ 1·0 µm, flagellum > body length	
Paramastigote	Kinetoplast adjacent tonucleus, external flagellum present	

Tabla 1: Morfología de los estadios de *Leishmania sp.* (Rogers, Chance y Bates, 2002)

2.1.2. Ciclo biológico

Cuando un flebotomo infectado con *Leishmania sp.* ingiere sangre de un hospedador vertebrado, deposita **promastigotes metacíclicos** en el mamífero. La dosis de promastigotes metacíclicos necesaria para iniciar una infección en el mamífero varía entre 4 y 4x10⁴ (Maia et al., 2011).

Una vez que el parásito se encuentra dentro del hospedador definitivo, se produce su fagocitación por los macrófagos. Esta fagocitación puede ocurrir en tejidos lejanos o también en la zona de la picadura, debido a la llegada de células de defensa como respuesta a la picadura. Además, es posible que las formas clínicas de la enfermedad (cutánea, visceral) sean un reflejo de la capacidad del

parásito para invadir tejidos más lejanos a la picadura, ya sea por la propia motilidad del parásito o por el movimiento de los macrófagos parasitados (Sunter, Gull, 2017).

Parece que la interacción entre el macrófago y el parásito, por la cual *Leishmania sp.* consigue entrar al interior celular, es gracias a la estructura flagelar. Puede ser debido a una vía de señalización por el contacto del flagelo con la membrana celular del macrófago o como un daño de la membrana plasmática por el movimiento continuo del flagelo en la colisión del parásito (Forestier et al., 2011).

Cuando los promastigotes metacíclicos han parasitado el interior celular de los macrófagos se produce su desarrollo a **amastigotes** y su multiplicación por fisión binaria (Solano-Gallego et al., 2009). Cuando el número de amastigotes es muy elevado, quedan libres y pueden ser ingeridos por otro flebotomo hembra cuando esta ingiera sangre, perpetuándose así la transmisión de *Leishmania sp.*

Si el flebotomo ingiere amastigotes de un animal infectado, el parásito avanza hasta llegar al intestino medio, donde sufre una serie de transformaciones inducidas por las diferencias de temperatura y pH entre el hospedador vertebrado y el vector, aunque es posible que intervengan también condiciones químicas que aseguren que esta transformación solo ocurra en el vector y no en el mamífero (Sunter, Gull, 2017). Los amastigotes se transforman en **promastigotes procíclicos**, con una forma ovalada y un flagelo de menor tamaño que el del cuerpo del parásito (Rogers, Chance y Bates, 2002). Después de multiplicarse en el intestino del insecto y pasar por el estadio de **paramastigote**, se transforma en **promastigote metacíclico**, que pasará al aparato bucal del flebotomo hasta que este ingiera sangre del próximo hospedador definitivo (Gállego Berenguer, 2003).

En la figura 2 se muestra un resumen del ciclo de *Leishmania sp.*

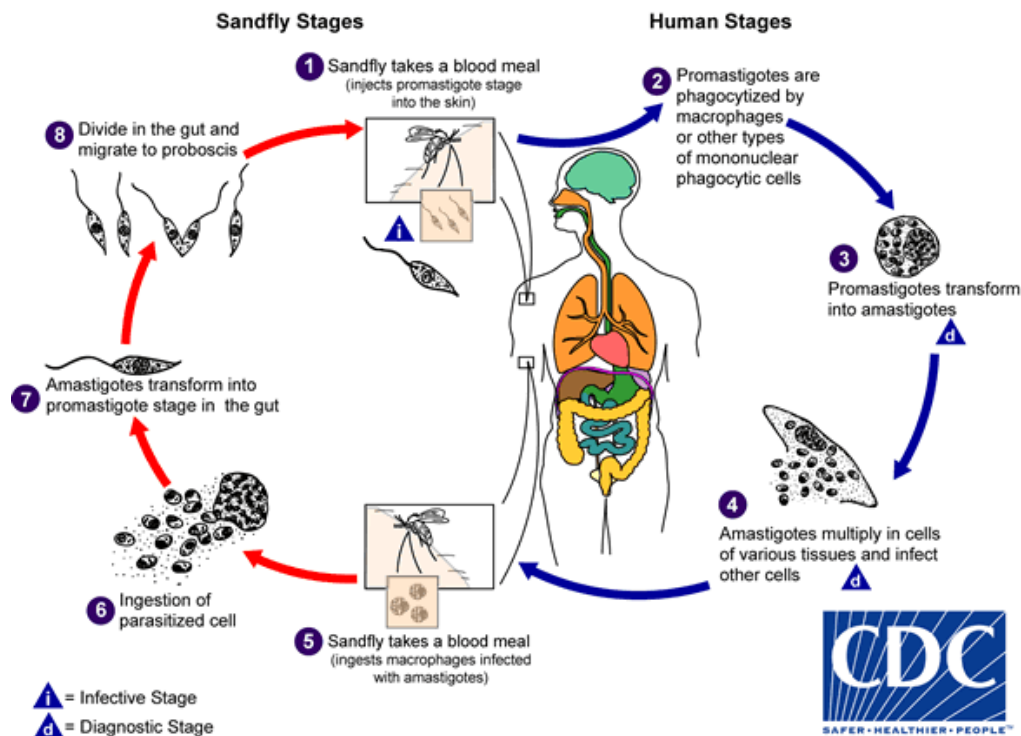


Figura 2: Ciclo biológico de *Leishmania* sp. (CDC- Centers for Disease Control and Prevention, 2017)

2.1.3. Especies del Gº *Leishmania* de interés sanitario

Actualmente las especies del Gº *Leishmania* se identifican y clasifican taxonómicamente, a nivel específico e intraespecífico, basándose en la electroforesis de isoenzimas del parásito. Las isoenzimas se consideran formas alélicas de un gen, y su variación puede interpretarse como una mutación sufrida durante la evolución del parásito. De este modo, los parásitos pertenecientes a la misma especie con un patrón enzimático idéntico se clasificarán dentro del mismo zimodema (denominado con la abreviatura "MON") (Hide et al., 2001).

Taxonómicamente, el género *Leishmania* incluye las especies que parasitan a mamíferos, incluido el hombre, y se divide en dos subgéneros: *Leishmania* y *Viannia* (Gállego, 2003). A continuación, se mencionan las especies de ambos subgéneros con mayor interés:

- Subgénero ***Leishmania***:
 - *L. (L.) infantum*: especie zoonótica causante de la leishmaniosis cutánea y visceral, con reservorio en el perro, el lobo y el zorro. Distribuida ampliamente por la cuenca del Mediterráneo, África Central y Occidental y el norte, centro y noroeste de Asia. Aunque el principal reservorio de *L. infantum* es la especie canina, también puede parasitar a otras especies animales entre las cuales se encuentra la especie felina (Solano-Gallego et al., 2009).

En Europa, un 90% de los casos de leishmaniosis están causados por *L. infantum* (Miró Corrales & Borrás, 2019) y dentro de esta especie, el zimodema MON-1 es el responsable de la mayoría de las infecciones en la especie canina (Gállego et al., 2001).

- *L. (L.) donovani*: afecta fundamentalmente al hombre y causa una grave leishmaniosis visceral conocida como Kala-azar. Distribución por gran parte del territorio africano y el sur, norte y noroeste de Asia.
- *L. (L.) chagasi*: causante de la leishmaniosis visceral en la zona de América Central y Sudamérica. Tiene como reservorio el perro y el zorro.
- *L. (L.) tropica*: causante de la leishmaniosis cutánea conocida como botón de oriente en la zona del norte de África, cuenca mediterránea oriental, algunas zonas de Próximo Oriente, Península Arábiga, India y Afganistán.
- *L. (L.) mexicana*: causante de una leishmaniosis cutánea en el pabellón auricular. Tiene como reservorio numerosos roedores selváticos y se distribuye por Centro y Sudamérica.
- Subgénero ***Viannia***: distribución exclusivamente neotropical.
 - *L. (L.) braziliensis*: agente etiológico de una grave leishmaniosis cutáneo-mucosa conocida como espundia. Como reservorios de esta especie actúan numerosos roedores, mamíferos selváticos y marsupiales.

2.1.4. *Phlebotomus* sp. como vector

Como se ha mencionado anteriormente, para la transmisión del parásito es necesaria la implicación de un vector.

Los flebotomos son parásitos del orden *Díptera* y del suborden *Nematocera*, Fª *Psychodidae*, de muy pequeño tamaño (1'5-3'5mm).

Las especies de flebotomos de interés sanitario se agrupan en tres géneros: *Phlebotomus*, *Lutzomyia* y *Sergentomyia*. Numerosas especies de estos géneros tienen un importante papel como vectores de agentes como *Leishmania* sp, *Bartonella bacilliformis* y *Phlebovirus*, siendo así de especial interés para el control de enfermedades como la leishmaniosis (Ready, 2013) .

Con relación a la transmisión de la leishmaniosis cutánea y visceral en España, *Leishmania infantum* se transmite por dos especies; *Phlebotomus perniciosus* y *Phlebotomus ariasi*, ambos del subgénero *Larroussius* (Gállego, 2003).

Son parásitos con una amplia distribución en países pertenecientes a zonas cálidas y templadas y hasta altitudes de 2500m. Durante el día se refugian en grietas, cuevas de roedores, huecos de los

árboles, cuadras, establos, localizándose habitualmente en las partes altas o en el techo. Sólo abandonan estos refugios al anochecer y en las primeras horas de la noche para. Para desplazarse hasta los hospedadores realizan vuelos cortos en dirección ascendente, a modo de salto.

Sólo las hembras son hematófagas, aunque también se alimentan parcialmente de jugos vegetales (única fuente de alimento para los machos). La sangre ingerida de los hospedadores aporta proteínas necesarias para la maduración de los huevos, de modo que como las hembras son el único sexo hematófago, sólo ellas son capaces de transmitir patógenos a los hospedadores (Killick-Kendrick, 1990). Debido a la corta longitud de su aparato bucal, sólo ingieren sangre de las zonas del animal que están desprovistas de protección (pelo, plumas, etc), realizando una picadura silenciosa y de corta duración. Por lo general, no son selectivas a la hora de elegir hospedador, aunque algunas especies tienen preferencia por aves (*Lutzomyia longipalpis*, *Phlebotomus papatasi*) o por reptiles (*Sergentomyia minuta*), de modo que abundan en los refugios de estas especies (Gállego, 2003).

2.1.5. Cultivo in vitro de *L. infantum*

El cultivo de *L. infantum* tiene diversas utilidades. Puede ser utilizado como técnica diagnóstica (Castelli et al., 2014), así como para el aislamiento y posterior clasificación taxonómica, para la obtención de antígeno o para la evaluación laboratorial de fármacos con propiedades leishmanicidas para el tratamiento de la enfermedad (Netto et al., 1986).

El cultivo de este parásito se puede realizar con cualquiera de los estadios de desarrollo (Serenio et al., 2007), aunque depende del objetivo por el cual realizamos el cultivo puede ser más adecuado cultivar un estadio u otro. Por ejemplo, si se desea evaluar productos leishmanicidas, lo más adecuado es llevar a cabo el cultivo de amastigotes intracelulares, ya que son las que se encuentran en el hospedador definitivo y sobre los que se deberá aplicar el tratamiento, y si el objetivo es la obtención de antígeno para su posterior uso en técnicas diagnósticas, lo más adecuado es cultivar promastigotes (Robledo et al., 1999).

El aislamiento *in vitro* presenta ventajas frente a los cultivos *in vivo*: se pueden conseguir cultivos positivos en 5-30 días mientras que las lesiones en animales suelen tardar meses en aparecer. Además, los materiales son menos costosos. Aunque presenta ciertas ventajas, también es cierto que tiene el inconveniente de que las técnicas realizadas deben de llevarse a cabo en condiciones de esterilidad, por lo que no son factibles en condiciones de campo (Montealegre, 2010).

El mantenimiento de los cultivos de *L. infantum* no tiene unas reglas estrictas, ya que puede tener comportamientos diferentes según la especie, por lo que hay que procurar que en el cultivo, se proporcionen las condiciones y elementos nutricionales más parecidos a las que se darían en su medio natural. Por ello no existe un medio universal que permita el crecimiento de las diferentes

cepas, aunque frecuentemente se utilizan los siguientes medios: Novy, Nicolle y McNeal, NNN modificado, Schneider, RPMI, etc (Montealegre, 2010).

En relación a los medios de cultivo, estos pueden dividirse en tres grupos: líquidos, bifásicos y semisólidos. Los medios líquidos necesitan suero fetal bovino (SFB) o solución de eritrocitos lisados, mientras que los medios bifásicos y semisólidos necesitan sangre para el correcto desarrollo de los parásitos (Sadigursky y Brodskyn, 1986). El cultivo líquido es el recomendado para el cultivo en masa del parásito, aunque para el aislamiento inicial de *Leishmania* es más indicado usar medios bifásicos (Schuster y Sullivan, 2002, Grekov et al., 2011).

Los medios líquidos (Schneider, RPMI) están diseñados además para el cultivo de gran variedad de células de mamíferos (como por ejemplo carcinomas, astrocitos y células leucémicas humanas) (Thermo Fisher, 2021). Estos medios necesitan ser enriquecidos por lo que habitualmente se suplementan con SFB desactivado (10-30%) y con glutamina. Si se suplementan con SFB es recomendable realizar un ensayo previo para comprobar que el parásito se desarrolla y multiplica correctamente ya que en algunos casos presenta cierta citotoxicidad. También puede facilitar la proliferación bacteriana por sus compuestos nutricionales, de modo que si se utiliza, se deben tomar medidas preventivas como el uso de antimicrobianos y antifúngicos (Montealegre, 2010).

La temperatura de incubación es otro de los parámetros a tener en cuenta. Los efectos que tiene sobre la nutrición, morfología y metabolismo del parásito indican que pueden ser dependientes del calor. La incubación de *L. infantum* se lleva a cabo con temperaturas entre 16 y 32°C, aunque se sugiere que la temperatura idónea sería entre 20 y 25°C ya que las lesiones aparecen en las zonas más frías del hospedador (Montealegre, 2010, Missioni, Masala, 1993).

El periodo de viabilidad y el máximo crecimiento del cultivo varían según la especie o cepa de *Leishmania* y con el tipo de medio utilizado. Si el medio utilizado es semisólido o bifásico se realizan resiembras cada siete días, mientras que si el medio es líquido, las resiembras se realizan con una periodicidad menor (3-5 días) y debe de mantenerse el cultivo un tiempo mínimo de un mes (Montealegre, 2010).

2.2. Leishmaniosis felina

Aunque la especie canina es el principal reservorio de *L. infantum*, también puede parasitar otras especies animales, entre las cuales se encuentra la felina (Verde et al., 2015, Solano-Gallego et al., 2009). Si bien es cierto que los gatos son susceptibles a la infección, los casos clínicos son menos comunes que en la especie canina (Pennisi & Persichetti, 2018).

La principal especie del género *Leishmania* implicada en el territorio europeo es *L. infantum*, agente causal de más de un 90% de casos. En Oriente Medio se han identificado casos de *Leishmania tropica* y en Latinoamérica se pueden encontrar felinos parasitados con cinco especies diferentes de

Leishmania (*L. amazonensis*, *L. mexicana*, *L. infantum*, *L. venezuelensis* y *L. braziliensis*) (Miró Corrales & Borrás, 2019).

En las parasitaciones por *L. infantum*, la mayoría de los casos están causados por el zimodema MON-1, que carece de diferencias genéticas con las cepas aisladas en la especie canina (Pennisi y Solano, 2013).

2.2.1. Epidemiología

Si bien es cierto que la prevalencia de la leishmaniosis felina (LFel) es menor que la prevalencia de la canina para una misma zona geográfica, está en aumento en zonas endémicas (Verde et al., 2015). Los estudios realizados en Europa entre 1982 y 2017 estiman una prevalencia del 10%. Se destaca que Italia tiene una prevalencia mayor que el resto de países, siendo del 24% con diagnóstico serológico y del 21% mediante PCR (Asfaram et al., 2019).

En la tabla 2 se presentan datos de prevalencia de *L. infantum* en la especie felina.

Characteristics	Factors	Seropositive				PCR positive			
		n	Prevalence (%) (95%CI)	I-square (%)	p	n	Prevalence (%) (95%CI)	I-square (%)	P<0.001
Country	Iran	6	17.0 (8.0- 28.0)	83.8	0.06	3	6.0 (0.0-21.0)	-	P<0.001
	Egypt	3	6.0 (2.0-10.0)	98.3			NR	-	
	Greece	3	11.0 (2.0-26.0)	95.2			NE	-	
	Italy	10	24.0 (13.0-37.0)	97.1		7	21.0 (10.0-61.0)	99.5	
	Spain	12	12.0 (4.0-23.0)	97.7		8	6.0 (1.0-14.0)	96.7	
	Portugal	7	2.0 (1.0-4.0)	70.1		4	11.0 (2.0-26.0)	96.7	
	Brazil	17	8.0 (3.0-13.0)	93.7		7	5.0 (1.0-11.0)	85.3	
Diagnostic test	ELISA	12	9.0 (5.0-13.0)	87.8	P<0.001	-	-	-	-
	IHAT	3	6.0 (2.0-10.0)	97.5		-	-	-	
	IFAT	30	11.0 (6.0-17.0)	97.7		-	-	-	
	IFAT, ELISA	6	11.0 (7.0-16.0)	97.5		-	-	-	
	WB	3	14.0 (9.0-20.0)	96.6		-	-	-	
	DAT	9	10.0 (3.0-19.0)	94.9		-	-	-	
	PCR	12	7.0 (3.0-14.0)	93.5		-	-	-	
Breed of cat	Stray	22	10.0 (6.0-14.0)	95.2	0.46	7	2.0 (0.0-5.0)	90.5	P<0.001
	Domestic	17	7.0 (2.0-16.0)	97.6		9	8.0 (1.0-19.0)	96.8	
	Mixed	13	15.0 (8.0-24.0)	95.6		16	23.0 (4.0-50.0)	99.4	
	<i>L. infantum</i>	36	12.0 (8.0-17.0)	95.4		23	8.0 (4.0-14.0)	95.9	
<i>Leishmania</i> species	<i>Leishmania</i> spp.	25	8.0 (4.0-14.0)	96.7	0.09	9	15.0 (5.0-48.0)	99.4	P<0.001
	<i>L. infantum</i> , <i>L. tropica</i>	2	10.0 (8.0-12.0)	97.1		2	1.0 (0.0-1.0)	-	

NR=not reported, NE= not enough studies

Tabla 2: Datos de prevalencia de *L. infantum* en gatos (Asfaram et al., 2019)

Aunque los estudios sobre el papel del gato en la leishmaniosis todavía son escasos y hay aspectos de la enfermedad desconocidos, se sugiere que el gato puede actuar como reservorio urbano de la enfermedad, pudiendo perpetuar la transmisión de *L. infantum* y actuando como hospedador primario y/o secundario en la transmisión a la especie canina y al hombre en zonas endémicas. Se ha comprobado que *Phlebotomus* sp. es capaz de adquirir el parásito tras la ingestión de sangre de

gatos infectados (Maroli et al., 2007) aunque aún existen muchas dudas sobre las vías de transmisión alternativas. Formas de transmisión como el contacto directo, por mordeduras o arañazos, la transmisión vertical, o por medio de transfusiones sanguíneas aún no han sido confirmadas (Verde et al., 2015).

En España los valores de seropositividad son muy variables; desde el 1'7% al 60% (Verde et al., 2015). Esta variabilidad se debe a que en la prevalencia influyen diversos factores como: zona geográfica, técnica de diagnóstico, punto de corte, efectividad y sensibilidad de la técnica diagnóstica, hábitat del animal (interior o exterior), estación del año en la que las muestras han sido extraídas, etc. Es de gran importancia conocer si el animal es callejero o vive en el interior, ya que, aunque viva en una zona endémica, su riesgo de exposición variaría mucho, disminuyendo drásticamente en el caso de ser animales sin acceso al exterior (Verde et al., 2015).

En la tabla 3 se presentan datos de prevalencia en España según región, hábitat del gato, presencia de signos clínicos y técnica de diagnóstico.

Year	Region	Type of animal (domestic, mixed, stray)	Number of cats analyzed	Presence of clinical signs and clinicopathological findings	IFAT	ELISA	WB	DAT	PCR (sample)	Direct detection of <i>L. infantum</i>
2002	Barcelona and Girona	Domestic	117	N.A	N.A	1.7%	N.A	N.A	N.A	N.A
2002	Aragón	Domestic	50	Immunological alteration	N.A	N.A	N.A	42.00%	N.A	N.A
2007	Barcelona, Tarragona and Island of Mallorca	Mixed	445	N.A	N.A	5.30–6.30%	N.A	N.A	N.A	N.A
2007	Southern Spain	Domestic	183	N.A	28.30–60.00%	N.A	N.A	N.A	25.70% (blood)	1.63%
2008	Barcelona	Domestic	100	Yes; clinical signs or laboratory findings for positive cats inconsistent with leishmaniosis	N.A	N.A	N.A	N.A	3% (blood)	N.A
2008	Madrid	Domestic	233	Yes; relative lymphocytosis and an increase in alanine aminotransferase value	1.29–4.29%	N.A	N.A	N.A	0.43% (blood)	N.A
2011	Island of Mallorca	Stray	86	N.A	N.A	N.A	15.70%	N.A	26.00% (blood)	N.A
2011	Island of Mallorca and Ibiza	Mixed	105	Yes; cutaneous lesions	N.A	13.20%	N.A	N.A	8.70% (blood)	N.A
2011	Madrid	Domestic	20	N.A. Some cats co-infected with <i>Tritrichomonas foetus</i>	15.00%	N.A	N.A	N.A	N.A	N.A
2012	Madrid	Mixed	680	N.A	3.70%	N.A	N.A	N.A	0.60% (blood)	N.A
2014	Madrid, Toledo and Guadalupe	Stray	346	Yes, 3.2%	3.20%	N.A	N.A	N.A	0.00% (blood)	N.A
2021	Zaragoza	Stray	180	No	2.23%	2.79%	14.52%	N.A	5.58% (blood)	N.A

N.A., Not available

Tabla 3: Resultados de estudios epidemiológicos de L. infantum en España (Alcover et al., 2021)

Los únicos datos existentes sobre la prevalencia de *L. infantum* en la ciudad de Zaragoza son los obtenidos por Alcover et al., en 2021, en los que partiendo de una muestra de 179 gatos callejeros se obtuvieron distintas prevalencias según la técnica utilizada (2'23% con IFAT, 2'79% con ELISA, 14'52% con WB y de un 5'58% mediante PCR).

2.2.2. Patogenia y signos clínicos

No hay estudios sobre la patogenia de *L. infantum* en el gato ni sobre la respuesta inmune a su infección en estos animales (Verde et al., 2015). Se sabe que a las dos semanas de la inoculación experimental del parásito, vía intravenosa o subcutánea, el título de anticuerpos aumenta, pero a diferencia de la especie canina, no se ven alteraciones biopatológicas claras (Pennisi et al., 2013).

Por lo general las infecciones de *L. infantum* en gatos suelen cursar con una clínica inaparente. Los signos clínicos suelen presentarse en animales con un sistema inmune comprometido. Se sugiere que esto puede deberse a la coinfección con virus como el de la inmunodeficiencia felina (FIV) o el de la leucemia felina (FeLV) y con co-parasitosis con *Toxoplasma gondii* (Verde et al., 2015, Martín-Sánchez, 2007).

Aunque los casos en los que existe una clínica asociada a la infección son poco frecuentes, éstos pueden aparecer con mayor frecuencia en gatos adultos y en un amplio rango de edad (2-15 años) (Pennisi, 2015).

Es posible que las formas clínicas de la enfermedad (cutánea, visceral) sean un reflejo de la capacidad del parásito para invadir tejidos más lejanos a la picadura, ya sea por la propia motilidad del parásito o por el movimiento de los macrófagos parasitados (Sunter, Gull, 2017).

Es posible observar signos inespecíficos como anorexia, astenia y pérdida de peso (Miró Corrales y Borrás, 2019), aunque es más frecuente encontrar signos asociados a la forma clínica cutánea. Dentro de esta, las manifestaciones clínicas más comunes son la cutánea y la ocular (Verde et al., 2015).

La **forma cutánea** es la manifestación clínica más común y puede darse en forma de dermatitis nodulares, erosivo-ulcerativas y alopecias.

La dermatitis nodular es una de las manifestaciones cutáneas más frecuentes, que se caracteriza con nódulos subcutáneos indoloros de localización mayoritaria en la cabeza (orejas, párpados, trufa, belfos) y en las extremidades anteriores y posteriores, aunque pueden aparecer en cualquier localización corporal (Navarro et al., 2010).

La forma erosivo-ulcerativa está caracterizada por úlceras y/o costras en cuello, cara y cabeza (trufa, mandíbula inferior, orejas y párpados). También puede aparecer en las almohadillas plantares o distribuida de forma bilateral y simétrica en carpos, codos, tarsos y tuberosidad isquiática.

A parte de estas lesiones, que se corresponden con los cuadros más frecuentes, podemos encontrar otras lesiones cutáneas como dermatitis escamosa, dermatitis miliar, dermatitis papular y formas alopecias. El prurito puede producirse, pero tiene intensidad variable y es poco frecuente, apareciendo en menos de un tercio de los casos que tienen sintomatología cutánea.

También han sido descritas lesiones **mucocutáneas** en la lengua, belfos, párpados y fosas nasales, además de nódulos hemorrágicos en el borde de las orejas y de la trufa. Es frecuente encontrarnos con animales que son sanos clínicamente y que únicamente presentan una única lesión a nivel facial. Las **lesiones oculares** son también frecuentes, siendo la más común la uveítis unilateral, que puede evolucionar a panoftalmitis. También han sido descritas otras formas oculares como blefaritis granulomatosa, conjuntivitis y queratitis.

También es posible encontrar signos asociados a una infección generalizada, lo que da lugar a un cuadro sistémico visceral, aunque es muy poco común en el caso de los gatos (Verde et al., 2015).

En la **forma sistémica** se pueden dar lesiones en linfonodos, bazo, hígado y riñones, siendo la más frecuente la linfadenopatía regional o generalizada.

Aparte de los signos citados, también han sido documentados otros signos como gingivo-estomatitis, mucosas pálidas, fiebre, rinitis crónica, diarreas, poliuria y polidipsia, estas dos últimas como consecuencia de una afección renal crónica (Miró Corrales y Borrás, 2019).

2.2.3. Diagnóstico

La leishmaniosis felina es una enfermedad que debe ser incluida en el diagnóstico diferencial de aquellos gatos procedentes de zonas endémicas, con signos clínicos compatibles y que tengan acceso al exterior (Verde et al., 2015).

La **analítica sanguínea** (hemograma, leucograma y bioquímica) aunque no sirve como técnica confirmatoria de la presencia de *L. infantum* puede ser útil para comprobar si los signos clínicos pueden deberse a la leishmaniosis. En ella podemos encontrar alteraciones como:

- Hemograma y leucograma: anemia normocítica y normocrómica, de gravedad variable, monocitosis, neutrofilia, linfopenia, pancitopenia (Verde et al., 2015).
- Bioquímica: hiperglobulinemia e hipoalbuminemia, hiperfosfatemia, valores renales elevados. En el proteinograma, las albúminas pueden estar dentro de valores normales o reducidas, como compensación a la hiperglobulinemia.

Alguno de los valores alterados que podemos encontrar, como la pancitopenia, pueden deberse a otras enfermedades concurrentes (FIV, FeLV) o a un estado inmunocomprometido del animal (Miró Corrales y Borrás, 2019; Verde et al., 2015).

Las **técnicas serológicas** permiten demostrar la presencia de anticuerpos anti-*Leishmania*. En Europa, las técnicas serológicas validadas son la Inmunofluorescencia Indirecta (IFI), la Aglutinación Directa (DAT), el método Western Blot (WB) y el Ensayo por Inmunoadsorción Ligado a Enzimas (ELISA), siendo esta última la que posee una mayor sensibilidad (Pennisi et al., 2013). Si bien es

cierto que una serología positiva es orientativa, pueden darse falsos negativos en gatos infectados por *L. infantum* pero que poseen una respuesta humoral menos marcada (Solano-Gallego et al., 2009). En estos casos, para cerciorar el diagnóstico, es necesario combinar la técnica serológica con otro método diagnóstico confirmatorio.

La Inmunofluorescencia Indirecta es considerada la técnica diagnóstica indirecta de referencia en la especie canina por su alta sensibilidad y especificidad (Maia y Campino, 2008). Esta técnica cuenta con las desventajas de que la lectura es subjetiva, para la cual necesita un microscopio de fluorescencia, y que es muy laboriosa, lo que la hace poco idónea para estudios epidemiológicos en los que hay un gran número de muestras a analizar (Cabral et al., 1998).

El método Western Blot se basa en la detección de anticuerpos frente a determinadas fracciones antigénicas del parásito, de modo que se puede evaluar la fase de infección en la que se encuentra el animal y su respuesta al tratamiento. Aunque es útil para discriminar fases tempranas de la enfermedad, no se suele usar ya que requiere de personal especializado (Peris, 2020).

El Ensayo por Inmunoadsorción Ligado a Enzimas (ELISA) está fundamentado en cuantificar mediante espectrofotometría la reacción antígeno-anticuerpo. Permite trabajar con un gran número de muestras, ya que su protocolo es sencillo, y su lectura con espectrofotometría es objetiva.

La Técnica de Aglutinación Directa está basada en la reacción antígeno-anticuerpo. Esta reacción puede identificarse y medirse mediante titulaciones de diluciones seriadas de sueros sanguíneos en presencia de un antígeno en cantidades constantes (Aguilar-García, 2004). Para obtener esta reacción específica frente a *L. infantum* se utiliza una solución de promastigotes tripsinizados, fijados con formaldehído y teñidos con azul de Coomassie, para después leer los resultados sobre una placa de ELISA con fondo en uve (Harith et al, 1989). Estos resultados se leen como negativos en base a la presencia de un punto azul bien delimitado en el fondo del pocillo. Si en vez de un punto bien definido se ve una mancha difuminada, la muestra se lee como positiva.

La técnica DAT cuenta con la ventaja de que es poco laboriosa una vez elaborado el antígeno, comparada con otras técnicas serológicas como la IFI, de modo que se puede usar para titular un gran volumen de muestras, aunque cuenta con la desventaja de que para la lectura de los resultados es necesario esperar 18-24 horas.

Una modificación de la DAT tradicional es la denominada técnica de Aglutinación Directa Simplificada, en la que varía la preparación del antígeno. Esta técnica fue desarrollada en el departamento de parasitología de la Facultad de Veterinaria de Zaragoza para el diagnóstico de la leishmaniosis canina, aunque nunca ha sido utilizada en la especie felina. Su desarrollo tiene como objetivo simplificar el diagnóstico serológico de la leishmaniosis, mediante una preparación del antígeno más simple, sin deteriorar los valores de sensibilidad y especificidad, que se mantienen

iguales a los obtenidos con la DAT tradicional (Gómez-Ochoa et al., 2003). Su puesta a punto consiste en depositar diluciones seriadas de las muestras de suero de los animales a estudiar y añadir el antígeno previamente obtenido para que se forme la interacción antígeno-anticuerpo. Para facilitar esta interacción también se añade β -mercaptoetanol, que actúa reduciendo enlaces disulfuro, de modo que facilita una desnaturalización proteica completa y un desplegado de sus estructuras (Herraez, 2021). La lectura de los resultados obtenidos con esta técnica se realiza de forma subjetiva observando la aparición o ausencia de un poso azul en la placa ELISA como consecuencia de la reacción entre antígeno y anticuerpo.

El **estudio histopatológico** de las lesiones es considerado el método más fiable (Asfaram et al., 2019), pudiendo demostrarse la presencia de amastigotes en los tejidos y órganos del animal. Aunque las muestras más usadas proceden de la médula ósea, linfonodos y bazo, si se encuentran afectados otros tejidos, como por ejemplo la piel o los ojos, la muestra puede provenir del tejido cutáneo, del humor acuoso o de los linfonodos conjuntivales (Verde et al., 2015).

Al observar estas muestras se puede ver la presencia de macrófagos parasitados por amastigotes, pero se trata de una técnica muy laboriosa y debido a la ausencia de diferencias morfológicas entre los amastigotes de las distintas especies de *Leishmania*, no es posible diferenciar de que especie se trata (Miró Corrales y Borrás, 2019; Verde et al., 2015).

Para la identificación de la especie de *Leishmania* implicada, así como para la confirmación de casos en los que la respuesta humoral sea comprometida o en los que la carga parasitaria sea mínima, es necesario utilizar **técnicas moleculares** (Asfaram et al., 2019). Se puede llevar a cabo una PCR cualitativa o cuantitativa sobre muestras procedentes de médula ósea, linfonodos o sangre, siendo la muestra de linfonodos la que posee una mayor sensibilidad (Miró Corrales y Borrás, 2019). Aunque todavía no está validado, se está estudiando la posibilidad de realizar esta técnica usando como hisopos conjuntivales como muestra. Esta muestra podría contar con la ventaja de ser poco invasiva, de modo que el estrés del animal se vería reducido considerablemente (Bennasi et al., 2017).

A modo de resumen, si el gato proviene de zonas endémicas y presenta lesiones compatibles con la leishmaniosis felina, de las cuales se han descartado el resto de las causas, se debe comprobar si estamos ante un caso de LFel mediante técnicas serológicas y citología. También será recomendable realizar una PCR si se desea conocer la especie de *Leishmania* implicada o se tiene la sospecha de que la carga parasitaria o la respuesta humoral es mínima.

2.2.4. Tratamiento y prevención

El tratamiento de gatos con signos clínicos de leishmaniosis felina está basado actualmente en la administración de fármacos dirigidos a tratar a perros con leishmaniosis canina (Asfaram et al., 2019). Todavía no existen estudios que evalúen la eficacia y la seguridad de los protocolos utilizados, por lo que los gatos tratados deben ser monitoreados meticulosamente para controlar la aparición de efectos adversos durante el tratamiento (especialmente en aquellos gatos con afección renal) (Pennisi et al., 2016).

El tratamiento más utilizado es la administración oral de alopurinol como única terapia o asociado con inyecciones subcutáneas de antimonio de meglumina (Glucantime), aunque también se ha usado en varios casos la administración de domperidona (Pennisi, Persichetti, 2018).

Los gatos con clínica asociada a *L. infantum* suelen tener una esperanza de vida generalmente buena, aunque según Pennisi et al., en su estudio de 14 casos de gatos tratados frente a LFel, la esperanza de vida no se ve afectada significativamente por el tratamiento de la enfermedad (Pennisi y Persichetti, 2018).

Visto que la especie felina puede actuar como reservorio de *L. infantum* y puede transmitir el parásito a los flebotomos, es necesario tomar medidas preventivas (Maroli et al., 2007). Los piretroides utilizados en la especie canina para evitar la picadura de los flebotomos son mayoritariamente tóxicos para los gatos, aunque hay una formulación de piretroides permitida para su uso en gatos que es capaz de reducir la incidencia de *L. infantum* (Pennisi, Persichetti, 2018).

Para frenar la transmisión sin vectores, sobre todo por transfusiones sanguíneas, la medida preventiva más recomendable es el testaje de donantes de sangre mediante técnicas serológicas y PCR (Pennisi et al., 2016).

3. OBJETIVOS Y JUSTIFICACIÓN

Puesto que es escasa la existencia de estudios sobre la seroprevalencia de *L. infantum* en gatos, uno de los objetivos de este estudio es conocer esa seroprevalencia en los gatos callejeros de la ciudad de Zaragoza mediante la técnica de Aglutinación Directa Simplificada (Easy-DAT) y comparar los resultados con los obtenidos mediante Inmunofluorescencia Indirecta (IFI) por el Departamento de Parasitología. Sobre estos datos se realizará un análisis estadístico para llegar a unas conclusiones sobre la prevalencia de esta enfermedad.

Además, como la técnica de Aglutinación Directa Simplificada no ha sido utilizada con anterioridad en la especie felina, el estudio también tiene como objetivo su validación, utilizando la Inmunofluorescencia Indirecta como técnica de referencia.

4. METODOLOGÍA

4.1. Búsqueda de información

Inicialmente se realizó una revisión bibliográfica sobre la enfermedad en distintas bases de datos, con el fin de conocer sobre ella y tener actualizados los datos sobre *Leishmania infantum*.

Para ello se han consultado artículos científicos de bases de datos de webs de divulgación científica como PubMed, SciELO y Google Scholar. Estos artículos se han encontrado a partir de la búsqueda de términos clave como "*Leishmania infantum*", "leishmaniosis felina", "Técnica de Aglutinación Directa", "cultivo in vitro *Leishmania*", "prevalencia *Leishmania*", etc.

Además, se han consultado libros pertenecientes a la Biblioteca de la Facultad de Veterinaria de Zaragoza y Tesis Doctorales realizadas sobre esta temática.

4.2. Zona de estudio y muestras a analizar

El estudio se ha realizado con muestras de suero procedentes de gatos callejeros pertenecientes a las colonias felinas de la ciudad de Zaragoza, Aragón. Estas muestras pertenecen a un TFG realizado con anterioridad (Código de identificación: PI62/18). Al tratarse de sueros sobrantes no se ha solicitado la evaluación del procedimiento por parte de la Comisión Ética Asesora para la Experimentación Animal.

Los animales callejeros en los que se basa el estudio pertenecen a un programa municipal de control de colonias de gatos en ámbitos urbanos (Proyecto CES). El proyecto tiene el objetivo de mejorar las condiciones higiénico-sanitarias de estas zonas, mediante la desparasitación de los animales, mejorar su calidad de vida, evitar su proliferación descontrolada mediante su castración y evitar problemas de convivencia derivados de comportamientos como maullidos, peleas o marcajes.

Los animales participantes en el estudio llegan a la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Zaragoza con el último objetivo de ser castrados quirúrgicamente. Aprovechando la preanestesia necesaria para llevar a cabo el procedimiento quirúrgico, se extrae una muestra de 2 ml de sangre por punción de la vena yugular o vena cefálica craneal y se deposita en un tubo sin anticoagulante.

Con objetivo de obtener el suero necesario para realizar la técnica de diagnóstico serológico, las muestras de sangre son centrifugadas a 2500 rpm durante 10 minutos.

Las muestras de suero son guardadas en tubos Eppendorf numeradas según al animal que pertenecen siguiendo un orden numérico consecutivo desde 1 hasta 88 y se almacenan en condiciones de congelación (-20°C) hasta ser utilizadas.

4.3. Análisis de las muestras mediante DAT Simplificada

La técnica utilizada en este estudio es una modificación de la DAT tradicional, en la que varía la preparación del antígeno.

El protocolo utilizado para el análisis de las muestras de gatos callejeros se basa en el desarrollado por Gómez-Ochoa et al. en 2003. Los pasos de este protocolo son los explicados a continuación:

4.3.1. Cultivo de *L. infantum* y obtención del antígeno

El objetivo para el cual se llevó a cabo el **cultivo *in vitro* de *L. infantum*** fue la obtención de un antígeno para su posterior uso en la técnica DAT simplificada.

Los cultivos de promastigotes pertenecen al Laboratorio de Parasitología del departamento de Patología Animal. Para mantenerlos, cada 7 días se lleva a cabo la renovación del medio de cultivo con el fin de evitar su degeneración y la aparición de posibles contaminaciones.

Los promastigotes de *L. infantum* se cultivan a 26'4°C en matraces de cultivo Flask con capacidad para medio litro de contenido. El medio de crecimiento utilizado está constituido por los siguientes compuestos:

- Medio de cultivo Roswell Park Memorial Institute (RPMI 1640): en su composición incluye L-glutamina, ácido 4-(2-hidroxietil) piperazin-1-iletanosulfónico (HEPES) y rojo de fenol. Este medio no contiene lípidos, proteínas ni factores de crecimiento, por lo que debe ser suplementado (Thermo Fisher, 2021).
- Suero Fetal Bovino (SFB): en proporciones del 10% para la suplementación del medio de cultivo.
- Antibiótico: penicilina (100 IU/ml) y estreptomycin (100µg/ml) para evitar la contaminación del cultivo.

Para la obtención del antígeno para DAT se necesita que los promastigotes estén en fase de crecimiento exponencial y en su forma elongada (promastigote metacíclico). Estos aparecen generalmente pasados 3-5 días desde el inicio del cultivo, aunque puede variar entre cepas, y su concentración en el cultivo se considera suficiente cuando mediante su conteo con la cámara de Neubauer se determina que hay 10^9 promastigotes/ml.

Una vez que el número de promastigotes es el suficiente, se procede a la **obtención del antígeno**. Según la experiencia del laboratorio de parasitología, para obtener entre 30-50 ml de antígeno, se necesita partir de 500 ml de medio de cultivo de promastigotes en fase exponencial de crecimiento. Todos los pasos para su obtención son los siguientes, y se llevan a cabo a temperatura ambiente.

1. Estandarización del cultivo de promastigotes a concentraciones de 10^9 promastigotes/ml. La estandarización se lleva a cabo añadiendo al cultivo 0'2g de tripsina (a una dilución de 1:250) y manteniendo el cultivo a 37°C durante 45 minutos.
2. Pasado este tiempo, el cultivo se sumerge en agua fría con el objetivo de parar la tripsinización.
3. Adición de 130µl de formaldehído 37-38% p/p estabilizado con metanol y se remueve suavemente durante una hora para homogeneizar correctamente la preparación.
4. Repartir la solución en tubos Falcon de 50ml y centrifugar el cultivo a 2000Xg durante 10 minutos dos veces, para conseguir la concentración de los promastigotes, seguido de una última centrifugación con solución citrato salina para eliminar el exceso de formaldehído.
5. Disolución del pellet de promastigotes en 25ml de solución citrato salina y tinción con azul de Coomassie R-250 (diluido al 0'5%). Esta tinción tiene como objetivo conseguir diferenciar las muestras positivas a *L. infantum* de las negativas.
6. Homogeneización lenta durante 90 minutos.
7. Centrifugar tres veces a 2000X durante 10 minutos para eliminar el colorante sobrante, lavando entre cada una de ellas con solución citrato salina.
8. Disolución del pellet en solución citrato salina hasta conseguir una concentración de 5×10^7 promastigotes/ml y se añade formaldehído al 0'4%. Si no se consigue la concentración suficiente, se pueden hacer centrifugaciones seriadas para conseguir concentrar más la muestra.
9. Almacenamiento de la solución de antígeno protegida de la luz y en condiciones de refrigeración (4°C). El antígeno puede ser utilizado durante 6 meses sin que se vean alterados sus resultados.

Una vez que ha sido preparado el antígeno, se procede al análisis de las muestras.

En la figura 2 se muestra un esquema del protocolo de obtención del antígeno.

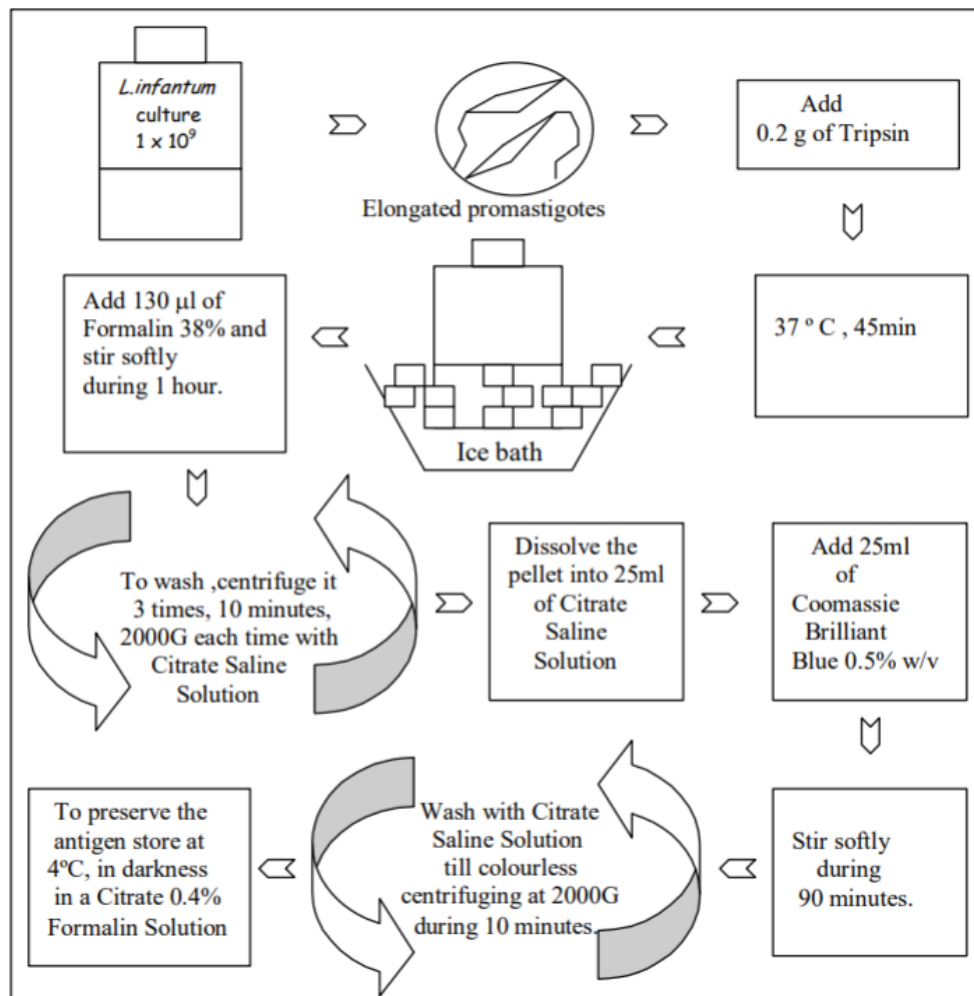


Figura 2: Protocolo de creación del antígeno en la técnica Easy-DAT (Gómez-Ochoa et al., 2003)

4.3.2. Diagnóstico serológico mediante aglutinación directa simplificada

El protocolo se realiza trabajando en todo momento en la campana de extracción.

Los materiales necesarios son los siguientes:

- Soporte para los Eppendorf que contienen los sueros a analizar.
- Muestras de suero de los animales del estudio.
- Tubos Eppendorf vacíos.
- β -mercaptoetanol y cubetas para depositarlo y facilitar su recolección con las pipetas.
- Placas de ELISA con fondo en V
- Pipetas de 10, 100 y 1000 μ l.
- Pipeta multicanal para realizar las múltiples diluciones y su homogeneización en la placa ELISA.
- Puntas de plástico para las pipetas.

El procedimiento es el siguiente:

1. Rotulación de las placas ELISA. Las tres primeras filas van a corresponder con los 3 controles (positivo, negativo e interno), mientras que las demás se corresponden con las muestras de suero a analizar.

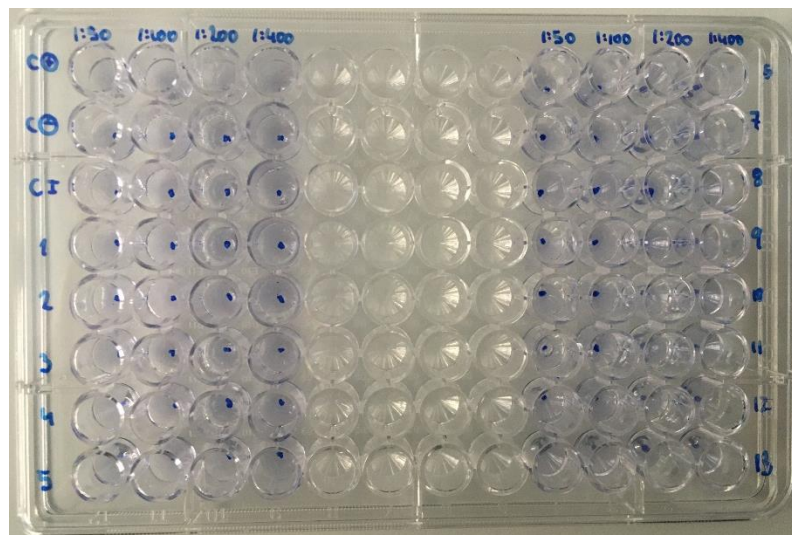


Figura 3: Rotulación de la placa ELISA. Las filas corresponden a las muestras y los controles mientras que las columnas corresponden a las diluciones seriadas.

2. Se colocan en el soporte los tubos Eppendorf de nuestras muestras enumeradas, de los controles positivo y negativo, y también se incluyen nuevos Eppendorf, tantos como muestras hay, y se enumeran de la misma forma que los sueros y los controles.
3. Se rellena una cubeta de β -mercaptoetanol previamente agitado para su homogeneización.
4. Con las pipetas, se coloca en cada tubo Eppendorf vacío 490 μ l de β -mercaptoetanol y 10 μ l del suero problema. El manejo de la pipeta es muy importante en estas fases. Se debe asegurar de cambiar la punta en cada suero para no transferir material de una muestra a otra. También es esencial introducir la punta de la pipeta hasta el fondo del tubo para asegurarnos de que la mínima muestra de suero recogida se pueda disolver con el β -mercaptoetanol.
5. Homogeneizar cada uno de los Eppendorf con el agitador vortex.
6. Deposición de los compuestos en la placa ELISA marcada con antelación.
 - a. En la primera columna vamos a depositar 100 μ l de la dilución 1:50, que corresponde con la constituida en el Eppendorf.
 - b. En el resto de las columnas colocaremos 50 μ l de β -mercaptoetanol.
 - c. Con la ayuda de la pipeta multicanal se van a realizar el resto de diluciones de todos los sueros para agilizar el trabajo. Se recogen 50 μ l de la primera columna y se

depositan en la segunda y se hace lo mismo consecutivamente hasta llegar a la última columna, en la que se recogerán también 50µl que serán desechados. De este modo se consigue un volumen final en todos los pocillos de la placa de 50µl.

- d. Adición de 50µl de antígeno en todos los pocillos de la placa.
7. Las placas ELISA utilizadas se agitan suavemente para homogeneizar las diluciones y se depositan en un lugar apartado de la luz durante 24 horas para su posterior lectura (Harith A.E. et al., 1987).
8. Pasadas las 24 horas se realiza la lectura de las placas ELISA. Se va a buscar en el fondo de los pocillos la aparición de un característico botón azul, que determinará que esa dilución es negativa frente a *L. infantum*. Este botón azul aparece cuando no hay interacción antígeno-anticuerpo y el antígeno teñido con azul de etileno se deposita en el fondo del pocillo. Si existen anticuerpos frente a *Leishmania* en un animal, dependiendo de su concentración en el suero, estos interaccionarán con el antígeno preparado formando una suspensión, de modo que no será visible el botón azul.

Se utilizaron diluciones seriadas dobles de los sueros desde concentraciones de 1:50 hasta 1:400.

La titulación de anticuerpos se correspondería con la dilución menos concentrada que no presentase botón azul. En el caso de obtener algún suero positivo en la titulación 1:400 se repitió el procedimiento hasta la dilución 1:1600.

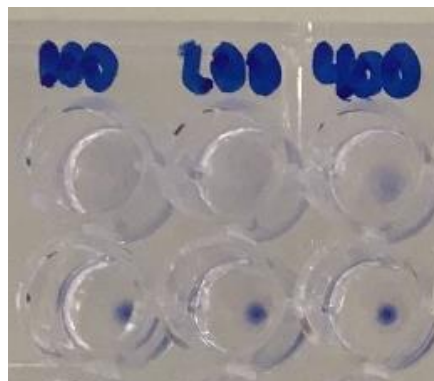


Figura 4: Lectura de los pocillos. La primera fila presenta una masa difusa azul, de modo que se considera positiva, mientras que la segunda fila presenta botón azul en el fondo del pocillo, de modo que es negativa.

4.3.3. Técnica de referencia IFI

Como la técnica DAT simplificada no está validada se decidió analizar también las muestras mediante la técnica IFI para después comparar los resultados. Esta técnica fue llevada a cabo por las tutoras del estudio, que basaron el protocolo de la IFI en el descrito en el Manual de la OIE (OIE, 2012).

El antígeno utilizado es obtenido en el Laboratorio de Parasitología y contiene una concentración de 1×10^5 de promastigotes por ml. A continuación se antígenan los portaobjetos de 12 pocillos y se siguen los siguientes pasos:

1. Se realizan diluciones seriadas de las muestras de suero en solución fosfato salina, empezando por la dilución 1:20.
2. Colocar 10 μ l de cada dilución en uno de los 12 pocillos del portaobjetos.
3. Incubar a 37°C en cámara húmeda durante 30 minutos.
4. Lavar el portaobjetos con solución fosfato salina y secar al aire.
5. Incubar de nuevo (30 minutos a 37°C) con conjugado fluorescente.
6. Lavar de nuevo y secar al aire.
7. Observar las muestras con microscopio fluorescente.

Para la lectura de las muestras, se considera como punto de corte la disolución 1:40 (Sobrinho et al., 2012). Si en esta o en una superior se observa fluorescencia, se determina que la muestra es positiva. Si hay ausencia de fluorescencia o sólo la disolución 1:20 muestra fluorescencia, la muestra se considera negativa.

4.3.4. Análisis estadístico

Para analizar los resultados conseguidos tras el análisis de las muestras, estos fueron recogidos en una hoja de cálculo de Microsoft Office Excel.

Para el cálculo de las variables de la sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo se usó el programa VassarStats, y para el índice Kappa se utilizó el programa Westgard QC.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Población de estudio

Las 88 muestras de suero analizadas pertenecen a felinos de las colonias callejeras de la ciudad de Zaragoza. No se disponen de datos sobre la edad de estos animales, sexo o si presentaban lesiones compatibles con la leishmaniosis.

5.2. Cultivo de *L. infantum* y obtención del antígeno

Como se ha comentado con anterioridad, para poder obtener un antígeno funcional y fiable, es necesario estandarizar el cultivo a 10^9 promastigotes/ml. Nuestra obtención del antígeno se basaba en este principio, aunque al final del procedimiento de la lectura de las placas se dio con un error en el antígeno.

Todos los pocillos de la placa, tanto los correspondientes a los sueros de los animales a analizar como los de los controles positivo, negativo e interno carecían del característico botón azul que determinaba que la muestra era negativa a *L. infantum*. Se llegó a la conclusión de que había sido como consecuencia de una concentración de promastigotes en la solución del antígeno por debajo de lo recomendable, de modo que la interacción anticuerpo-antígeno no había sido la esperable.

Una vez que se detectó el error, se procedió de nuevo a concentrar el antígeno mediante centrifugaciones seriadas a 2000Xg durante 10 minutos y posteriormente se volvieron a realizar los pasos citados anteriormente para el diagnóstico de los sueros.

5.3. Lectura de DAT simplificada y resultados

En el primer análisis de las muestras se dio con el problema comentado en el apartado anterior. Tras volver a concentrar el antígeno se realizó de nuevo el análisis de las 88 muestras. En esa ocasión los controles salieron correctamente de modo que se comprobó que el antígeno funcionaba correctamente.

La lectura de las placas se realizó a las 24 horas. De los 88 animales estudiados, ningún suero presentó aglutinación en la dilución 1:50, mientras que se encontraron 5 sueros con una titulación 1:100, 2 con titulación 1:200 y un único animal con 1:400. Este último se repitió hasta la dilución 1:600 y no presentó positividad mayor de 1:400. En la tabla 4 se presentan estos datos.

Titulación de anticuerpos	N (número de animales)
0	79
1:50	0
1:100	5
1:200	3
1:400	1

Tabla 4: Número de animales en relación con la titulación de anticuerpos

Como la DAT simplificada no está validada, se decidió comparar los resultados obtenidos con los obtenidos por las tutoras de este estudio mediante la técnica de Inmunofluorescencia Indirecta. Esta

comparación se hizo con el objetivo de determinar si la DAT simplificada es una técnica fiable en esta especie y para elegir el dintel más correcto, ya que, aunque existen artículos que lo avalan, no son muy numerosos los estudios sobre esta enfermedad.

En la tabla 10, presente en el anexo, se presenta la comparación de las titulaciones de anticuerpos obtenidas mediante DAT e IFI.

Para esta comparación entre DAT e IFI, se eligió la dilución 1:40 como punto de corte para la IFI (Martín-Sánchez et al., 2006; Sobrinho et al., 2012; Cardia et al., 2013). Al comparar el dintel 1:100 (recomendado por varios estudios (Cardoso et al., 2010; Lopes et al., 2017)) con el usado para la IFI (1:40), se obtuvo una sensibilidad y especificidad del 100%. Los valores predictivos positivo y negativos también fueron del 100%, al igual que el coeficiente Kappa.

En la tabla 5 se presenta la comparación entre los animales positivos y negativos de las dos técnicas. Se puede ver que usando el punto de corte de la DAT en 1:100 no se dan falsos positivos ni falsos negativos.

		IFI 1:40	
		POSITIVO	NEGATIVO
DAT (corte en 1:100)	POSITIVO	9	0
	NEGATIVO	0	79

Tabla 5: comparación de las dos técnicas con el dintel 1/100 en DAT.

Si cambiamos el punto de corte de la DAT a 1:200 y lo comparamos con la IFI obtenemos peores resultados que en el caso anterior. También ocurre lo mismo si lo hacemos con 1:400.

En ambos casos la especificidad y el valor predictivo positivo se mantienen en 100%, pero se reducen la sensibilidad (88% en 1:200 y 11% en 1:400), el valor predictivo negativo (98% en 1:200 y 90% en 1:400) y el coeficiente Kappa (98'9 en 1:200 y 47'9% en 1:400).

En las tablas 6 y 7 se presentan estos datos.

		IFI 1:40	
		POSITIVO	NEGATIVO
DAT 1:200	POSITIVO	8	0
	NEGATIVO	1	79
DAT 1:400	POSITIVO	1	0
	NEGATIVO	8	79

Tabla 6: comparación de los puntos de corte de la DAT con el de la IFI.

	1:100	1:200	1:400
Sensibilidad	100% (62-100)	88% (50-99)	11% (5-49)
Especificidad	100% (94-100)	100% (94-100)	100% (94-100)
Valor predictivo positivo	100% (62-100)	100% (59-100)	100% (5-100)
Valor predictivo negativo	100% (94-100)	98% (92-99)	90% (82-95)
Coeficiente Kappa	100% (95.8-100)	98.9% (93.8-99.8)	47.9% (40.5-55)

Tabla 7: comparación las variables de los diferentes dinteles de la DAT.

Tras la realización y comparación de ambas técnicas, considerando la titulación DAT 1:100 como punto de corte, se puede concluir que la prevalencia de *L. infantum* en este estudio es del 10'2% (5-18'9).

En la tabla 8 se presenta el número de animales positivos y negativos, así como la prevalencia.

	N (número de animales)	% (prevalencia)
Positivos	9	10,2
Negativos	79	89,8
Total	88	100

*Tabla 8: prevalencia DAT de *L. infantum* en el estudio realizado*

Con la determinación de esta prevalencia se puede concluir que existen anticuerpos anti-*Leishmania* en los animales estudiados, lo que significa que se ha detectado la infección por *L. infantum* en la población de gatos callejeros de Zaragoza.

De acuerdo con el estudio realizado por Asfaram et al., en 2019, donde se recogen datos de diferentes estudios sobre la prevalencia de *Leishmania sp.* en Europa, existen diferencias entre la seroprevalencia de la leishmaniosis en gatos domésticos y callejeros, siendo del 7% en el caso de los domésticos. La diferencia entre ambos casos puede deberse a la mayor exposición de los gatos callejeros frente al parásito.

Si se compara la prevalencia obtenida en el estudio (10'2%) con las obtenidas por otros autores, se puede observar que es casi idéntica a la que determinan los estudios realizados en Europa hasta el año 2017 (10%). En los estudios realizados en España se puede observar que la prevalencia depende mucho de la técnica diagnóstica y del dintel utilizado, situándose desde el 1'7% hasta el 60% (Verde et al., 2015). En la tabla 9 se citan diversos estudios realizados en España, en los que se puede ver que los datos de prevalencia son muy diversos. Hay prevalencias muy bajas, como la obtenida por Ayllon et al., en 2008, del 4'3% mediante ELISA y también pueden encontrarse prevalencias elevadas, como la obtenida por Millan et al., en 2011, del 26% mediante PCR.

Con esta comparación se llega a la conclusión de que la prevalencia del 10'2% obtenida en el estudio es similar a la de otros estudios, pero no se puede determinar con exactitud si es alta o baja debido a la gran variabilidad de prevalencias que existen en los diferentes estudios.

En la tabla 9 se muestran las prevalencias obtenidas en diferentes estudios realizados en España según la técnica diagnóstica utilizada.

Asfaram et al., 2019		
	Seroprevalencia	12%
	PCR	6%
Alcover et al., 2021		
	ELISA	2'79%
	PCR	5'58%
Martín-Sánchez et al., 2007		
	IFI	28'7%
	PCR	25'7%
Ayllon et al., 2008		
	IFI	4'3%
	PCR	0'4%
Millan et al., 2011		
	WB	6%
	PCR	26%
Sherry et al., 2011		
	ELISA	13'2%
	PCR	8'7%
Ayllon et al., 2012		
	IFI	3'7%
	PCR	0'6%
Sobrino et al., 2012		
	PCR	21'85%
Miro et al., 2014		
	IFI	3'2%

Tabla 9: Cita de varios autores en los que se observa la prevalencia de L. infantum según la técnica diagnóstica utilizada.

Tras la comparativa entre la DAT Simplificada y la técnica de referencia IFI se llega a la conclusión de que la DAT es una técnica válida para su uso en la especie felina. Con el estudio de las variables de sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y negativo y coeficiente Kappa, en los diferentes puntos de corte, se determina que el dintel más adecuado para su uso en la especie felina es el 1:100.

6. CONCLUSIONES

- I. La infección por *L. infantum* ha sido detectada en gatos callejeros de la ciudad de Zaragoza.
- II. La prevalencia del 10'2% obtenida en el estudio es casi idéntica a la que determinan los estudios realizados en Europa hasta el 2017, de modo que se concluye que Zaragoza tiene una transmisión de *L. infantum* similar a la que hay en el resto de ciudades europeas.
- III. Dentro de las diferentes técnicas diagnósticas que se pueden utilizar para el diagnóstico de la leishmaniosis felina, se determina que la DAT Simplificada es una técnica válida para su uso en esta especie, utilizando la dilución 1:100 como punto de corte.

CONCLUSIONS

- I. Infection caused by *L. infantum* has been detected in stray cats in the city of Zaragoza.
- II. The prevalence of 10'2% obtained in the study is almost identical to the ones determined by studies carried out in Europe up to 2017 (Asfaram et al., 2019), so it's concluded that Zaragoza has a similar transmission of *L. infantum* to the one in the rest of the European cities.
- III. Within the different diagnostic techniques that can be used for the diagnosis of feline leishmaniasis, it is determined that the Easy-DAT is a valid technique for it's use in the feline species, using the 1:100 dissolution as cut-off point.

7. VALORACIÓN PERSONAL

La rama de investigación ha sido uno de mis mayores intereses durante la carrera, de modo que poder juntarla en este trabajo con una especialidad como la parasitología ha sido una experiencia gratificante.

Como futuro profesional en el mundo de la clínica de pequeños animales, soy consciente de la importancia de la leishmaniosis, pero no era consciente de que también podría darse en la especie felina. Gracias a este trabajo he conseguido los conocimientos necesarios y actualizados para saber cómo afrontar en un futuro la aparición de esta enfermedad en alguno de los animales que tenga que atender. También me ha abierto los ojos a la gran importancia que cobra la investigación sobre la aparición de nuevas enfermedades, técnicas diagnósticas, tratamientos, etc.

Para acabar quiero agradecer, en primer lugar a M^a Jesús Gracia por permitirme trabajar en un proyecto del Departamento de Parasitología y ayudarme durante la elaboración de todo el trabajo; y en segundo lugar a Paz Peris por enseñarme pacientemente como trabajar en el laboratorio y ayudarme a expresar la parte experimental del trabajo.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Aguilar-García, V. (2004). VI. Reacciones de aglutinación. *Gac. Médica México* 140, 50-52.
- Akhoundi, M., Kuhls, K., Cannet, A., Votýpka, J., Marty, P., Delaunay, P., & Sereno, D. (2016). A historical overview of the classification, evolution and dispersion of *Leishmania* parasites and sandflies. *Neglected Tropical Diseases*, 10, 1-40.
- Alcover, M., Basurco, A., Fernandez, A., Riera, C., Fisa, R., Verde, M., . . . Villanueva-Saz, S. (2021). A cross-sectional study of *Leishmania infantum* infection in stray cats in the city of Zaragoza (Spain) using serology and PCR. *Parasite Vectors*, 178, 1-14.
- Alvar, J., Canavate, C., Molina, R., Moreno, J., & Nieto, J. (2004). Canine leishmaniasis. *Advances in Parasitology* 57, 1-88.
- Asfaram, S., Fakhar, M., & Teshnizi, S. (2019). Is the cat an important reservoir host for visceral leishmaniasis? A systematic review with meta-analysis. *The Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*, 25, 1-10.
- Benassi, J., Benvenga, G., Ferreira, H., Pereira, V., Keid, B., Soares, R., & Ferreira de Sousa Oliveira, T. (2017). Detection of *Leishmania infantum* DNA in conjunctival swabs of cats by quantitative real-time PCR. *Veterinary Parasitology*, 177, 93-97.
- Cabral, M., O'Grady, J., Gomes, S., Sousa, J., Thompson, H., & Alexander, J. (1998). The immunology of canine leishmaniosis: strong evidence for a developing disease spectrum from asymptomatic dogs. *Veterinary Parasitology*, 76, 173-180.
- Cardia, D., Granuzzio, L., Silveira, L., Langoni, H., & Saraiva, K. (2013). Prevalence of *Toxoplasma gondii* and *Leishmania spp.* infection in cats from Brazil. *Veterinary Parasitology*, 197, 634-637.
- Cardoso, L., Lopes, A., Sherry, K., Schallig, H., & Solano-Gallego, L. (2010). Low seroprevalence of *Leishmania infantum* infection in cats from northern Portugal based on DAT and ELISA. *Veterinary Parasitology*, 174, 37-42.
- Castelli, G., Galante, A., Lo Verde, V., Migliazzo, A., Reale, S., Lupo, T., . . . Bruno, F. (2014). Evaluation of two modified culture media for *Leishmania infantum* cultivation versus different culture media. *Journal of Parasitology* 100, 228-230.
- CDC- Centers for Disease Control and Prevention. (2017). Obtenido de <https://www.cdc.gov/dpdx/leishmaniasis/>
- Forestier, C., Machu, C., Loussert, C., Pescher, P., & Spath, G. (2011). Imaging host cell-*Leishmania* interaction dynamics implicates parasite motility, lysosome recruitment, and host cell wounding in the infection process. *Cell Host & Microbe*, 9, 319-330.

- Gállego Berenguer, J. (2003). *Manual de parasitología. Morfología y biología de los parásitos de interés sanitario*. UB. 151-157.
- Gállego Berenguer, J. (2003). *Manual de parasitología: morfología y biología de los parásitos de interés sanitario*. UB. 443-447.
- Gállego, M., Pratlong, F., Fisa, R., Riera, C., Rioux, J., Dedet, J., & Portús, M. (2001). The life-cycle of *Leishmania infantum* MON-77 in the Priorat (Catalonia, Spain) involves humans, dogs and sandflies; also literature review of distribution and hosts of *L. infantum* zymodemes in the Old World. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 95, 269-271.
- Gómez-Ochoa, P., Castillo, J., Lucientes, J., Gascón, M., Zarate, J., Arbea, J., . . . Rodríguez, C. (2003). Modified Direct Agglutination Test for Simplified Serologic Diagnosis of Leishmaniasis. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 10, 967-968.
- Grammiccia, M., & Gradoni, L. (2005). The current status of zoonotic leishmaniasis and approaches to disease control. *International Journal for Parasitology*, 35, 1169-1180.
- Grekov, I., Svobodová, M., Nohýnková, E., & Lipoldová, L. (2011). Preparation of highly infective *Leishmania* promastigotes by cultivation on SNB-9 biphasic medium. *Journal of Microbiological Methods* 87, 273-277.
- Harith, A., Kolk, A., Kager, P., Leeuwenburg, J., Faber, F., Muigai, R., . . . Laarman, J. (1987). Evaluation of a newly developed direct agglutination test (DAT) for serodiagnosis and sero-epidemiological studies of visceral leishmaniasis: comparison with IFAT and ELISA. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 81, 603-606.
- Harith, A., Slappendel, R., Reiter, I., Van Knapen, F., De Korte, P., Huigen, E., & Kolk, A. (1989). Application of a Direct Agglutination Test for Detection of Specific Anti-*Leishmania* Antibodies in the Canine Reservoir. *Journal of Clinical Microbiology*, 27, 2252-2257.
- Herraez, A. (20 de 11 de 2021). *Reactivos empleados en la electroforesis de DNA y de proteínas*. Obtenido de Biomodel: <http://biomodel.uah.es/tecnicas/elfo/reactivos/reactivos.htm#ME>
- Hide, M., Bañuls, A., & Tibayrenc, M. (2001). Genetic heterogeneity and phylogenetic status of *Leishmania (Leishmania) infantum* zymodeme MON-1: epidemiological implications. *Parasitology* 123, 425-432.
- Killick-Kendrick, R. (1990). Phlebotomine vectors of the leishmaniasis: a review. *Medical and Veterinary Entomology*, 4, 1-24.
- Maia, C., & Campino, L. (2008). Methods for diagnosis of canine leishmaniasis and immune response to infection. *Veterinary Parasitology*, 158, 274-287.

- Maia, C., Seblova, V., Sadlova, J., Votypka, J., & Volf, P. (2011). Experimental Transmission of *Leishmania infantum* in two major vectors: A comparison between a viscerotropic and a dermatotropic strain. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 5, pág. e1181.
- Maroli, M., Pennisi, M., Di Muccio, T., Khoury, C., Gradoni, L., & Gramiccia, M. (2007). Infection of sandflies by a cat naturally infected with *Leishmania infantum*. *Veterinary Parasitology*, 145, 357-360.
- Martín-Sánchez, J., Acedo, C., Muñoz-Pérez, M., Pesson, B., Marchal, O., & Morillas-Márquez, F. (2007). Infection by *Leishmania infantum* in cats: Epidemiological study in Spain. *Veterinary Parasitology*, 145, 267-273.
- Miró Corrales, G., & Borrás, P. (2019). *Leishmaniosis felina*. Ciudad Autónoma de Buenos Aires: Asociación Argentina de Medicina Felina.
- Missioni, E., & Masala, G. (1993). Calor y leishmaniasis. Una revisión de las implicaciones clínicas y biológicas. *Perú Epidemiología*, 27-32.
- Montealegre, I. (2010). Importancia de los medios de cultivo en el diagnóstico de leishmaniasis. *NOVA*, 8, 131-135.
- Navarro, J., Sánchez, J., Peñafiel-Verdú, C., Buendía, A., Altimira, J., & Vilafranca, M. (2010). Histopathological lesions in 15 cats with leishmaniosis. *Journal of Comparative Pathology* 143, 287-302.
- Netto, E., Cuba, C., Marsden, P., & Barretto, A. (1986). El método de cultivo "in vitro" como instrumento práctico en el diagnóstico y aislamiento primario de *Leishmania braziliensis braziliensis*. Observaciones de laboratorio. *Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 19, 79-84.
- Organización Mundial de la Salud. (22-26 de Marzo de 2010). *Control de la leishmaniasis: informe de una reunión del Comité de Expertos de la OMS sobre el Control de las Leishmaniasis*.
Obtenido de <https://apps.who.int/iris/handle/10665/82766>
- Organización Mundial de la Salud. (2012). *Research priorities for Chagas disease, human African trypanosomiasis and leishmaniasis*. Obtenido de World Health Organization:
<https://apps.who.int/iris/handle/10665/77472>
- Pennisi, M. (2015). Leishmaniosis of companion animals in Europe: An update. *Veterinary Parasitology* 208, 35-47.
- Pennisi, M., & Persichetti, M. (2018). Feline leishmaniosis: is the cat a small dog? *Veterinary Parasitology* 251, 131-137.
- Pennisi, M., & Persichetti, M. (2018). Feline leishmaniosis: Is the cat a small dog? *Veterinary Parasitology*, 251, 131-137.

- Pennisi, M., & Solano-Gallego, L. (2013). *Leishmaniosis. Una revisión actualizada*. Zaragoza: Servet.
- Pennisi, M., Persichetti, M., Migliazzo, A., De Majo, M., Iannelli, N., & Vitale, F. (13-16 de Julio de 2016). Feline leishmaniosis: clinical signs and course in 14 followed up cases. *Proceedings LXX Convegno SISVet*, págs. 166-167.
- Peris, M. P. (2017). *Estudio de la inmunopatogenia producida por Leishmania infantum en el aparato reproductor masculino y músculo temporal en modelo canino. Valoración de la proteína NGAL como nuevo biomarcador precoz de daño renal e inflamación*. Obtenido de Repositorio de la Universidad de Zaragoza- Zagan: <https://zagan.unizar.es/record/86982/files/TESIS-2020-004.pdf>
- Petrie, A., & Watson, P. (2013). *Statics for Veterinary and Animal Science*, 3rd ed. Wiley-Blackwell, Oxford.
- Ready, P. (2013). Biology of Phlebotomine Sand Flies as Vector of Disease Agents. *The Annual Review of Entomology*, 58, 227-250.
- Robledo, S., Valencia, A., & Saravia, N. (1999). Sensivity to Glucantime of *Leishmania viannia* isolated from patients prior to treatment. *The Journal of Parasitology* 85, 360-366.
- Rogers, M., Chance, M., & Bates, P. (Mayo de 2002). The role of promastigote secretory gel in the origin and transmission of the infective stage of *Leishmania mexicana* by the sandfly *Lutzomyia longipalpis*. *Cambridge University Press*, 124, págs. 495-507.
- Sadigursky, M., & Brodskyn, C. (1986). A new liquid medium without blood and serum for culture of hemoflagellates. *Am J Trop Med Hyg* 35, 942-944.
- Schuster, F., & Sullivan, J. (2002). Cultivation of clinically significant hemoflagellates. *Clinical Microbiology Reviews* 15, 374-389.
- Sereno, D., Cordeiro da Silva, A., Maathieu-Daude, F., & Ouaisi, A. (2007). Advances and perspectives in *Leishmania* cell based drug-screening procedures. *Parasitology International* 56, 3-7.
- Sobrinho, L., Rossi, C., Peloi, J., Tozzi, E., Domingues, A., Marçal, V., . . . Marcondes, M. (2012). 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. *Veterinary Parasitology*, 187, 302-306.
- Sobrinho, L., Rossi, C., Vides, J., Tozzi, E., Domingues, A., Félix, V., . . . Marcondes, M. (2012). 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. *Veterinary Parasitology*, 187, 302-306.

Solano-Gallego, L., Koutinas, A., Miró, G., Cardoso, L., Pennisi, M., Ferrer, L., . . . Baneth, G. (2009).

Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention. *Veterinary Parasitology*, 165, 1-18.

Sunter, J., & Gull, K. (2017). Shape, forme, function and *Leishmania* pathogenicity: from textbook descriptions to biological understanding. *Open Biology*, 7, 1-13.

Thermo Fisher. (9 de 11 de 2021). *Medio RPMI 1640, HEPES*. Obtenido de Thermo Fisher Scientific: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/22400089?SID=srch-srp-22400089>

Verde, M., Ortúñez, A., Villanueva, S., & Pardo, M. (2015). Leishmaniosis felina. *Argos*, 167, 52-54.

9. ANEXOS

ID	DAT	IFI
1	0	0
2	0	0
3	0	0
4	0	0
5	0	0
6	0	0
7	0	0
8	0	0
9	0	0
10	0	0
11	0	0
12	0	0
13	0	0
14	0	0
15	0	0
16	100	40
17	0	0
18	0	0
19	0	0
20	200	80
21	0	0
22	0	0
23	100	40
24	0	0
25a	100	40
25b	0	0
26a	0	0
26b	0	0
27	0	0
28	100	40
29	0	0
30	0	0
31	0	0

32	0	0
33	0	0
34	0	0
35	0	0
36	0	0
37	0	0
38	0	0
39	0	0
40	0	0
41	0	0
42	400	>320
43	0	0
44	0	0
45	0	0
46	0	0
47	0	0
48	0	0
49	0	0
51	0	0
52	200	80
53	0	0
54	0	0
55	0	0
56	200	320
57	0	0
58	0	0
59	0	0
60	0	0
61	0	0
62	0	0
63	0	0
64	0	0
65	0	0
66	0	0
67a	0	0
67b	100	40
68	0	0
69	0	0
70	0	0
71	0	0
72	0	0
73	0	0
74	0	0
75	0	0
76	0	0
77	0	0
78	0	0
79	0	0
80	0	0

81	0	0
82	0	0
83	0	0
84	0	0
85	0	0
86	0	0

Tabla 10: Lectura de las 88 muestras mediante DAT y mediante IFI.