



Facultad de Veterinaria  
Universidad Zaragoza



# Trabajo Fin de Grado en Veterinaria

Leishmaniosis en ovejas: detección del nivel de seroprevalence  
en ovejas de zona no endémica para la infección

Leishmaniosis in sheep: detection of the seroprevalence  
level in sheep from non-endemic areas for infection

## **Autor/es**

Ane Unzueta Perez

## **Director/es**

Dra. Delia Lacasta Lozano  
Dr. Sergio Villanueva Saz

Facultad de Veterinaria

2024

---

## Tabla de contenido

|   |    |
|---|----|
| 1. RESUMEN/ABSTRACT.....  | 4  |
| ABSTRACT .....  | 5  |
| 2. INTRODUCCIÓN.....  | 6  |
| 2.1. Ciclo biológico.....   | 7  |
| 2.2. Leishmaniosis en otros animales .....  | 8  |
| 2.3. Leishmaniosis en ovejas.....   | 9  |
| 3. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS .....  | 13 |
| 4. METODOLOGÍA.....   | 14 |
| 4.1. Búsqueda de información.....   | 14 |
| 4.2. Zona de estudio y muestras a analizar.....   | 15 |
| 4.3. Análisis de muestras mediante ELISA para la detección de anticuerpos frente a <i>Leishmania infantum</i> ..... | 17 |
| 4.4. Análisis estadístico.....  | 17 |
| 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....   | 18 |
| 5.1. Resultados.....  | 18 |
| 5.2. Discusión.....   | 19 |
| 6. CONCLUSIONES/CONCLUSIONS .....   | 23 |
| CONCLUSIONS.....  | 23 |
| 7. VALORACIÓN PERSONAL .....  | 24 |
| 8. BIBLIOGRAFÍA .....   | 24 |

## Tabla de ilustraciones

|   |    |
|---|----|
| Figura 1. ELISA indirecto (Menarini diagnostics). .....   | 13 |
| Figura 2. Mapa geográfico de Alemania. En color verde oscuro se resalta el estado federado de Baden-Wurtemberg, donde se encuentran los rebaños seleccionados para la obtención de muestras. .... | 15 |
| Figura 3. Climas y distribución de <i>Phlebotomus mascittii</i> y <i>Phlebotomus perniciosus</i> en Alemania (Naucke et al., 2008).....   | 20 |
| Figura 4. Distribución actual conocida de <i>P. mascittii</i> en Europa (ECDC y EFSA, 2023).....  | 21 |
| Figura 5. Distribución actual conocida de <i>P. perniciosus</i> en Europa (ECDC y EFSA, 2023). ....   | 21 |

## 1. RESUMEN/ABSTRACT

La leishmaniosis es una enfermedad zoonótica transmitida por vectores y causada por diferentes parásitos de *Leishmania*. En Europa, la especie de *Leishmania* más prevalente y descrita es *Leishmania infantum* y se transmite a través de diferentes especies de flebótomos. El papel epidemiológico del perro como principal reservorio doméstico ha sido ampliamente estudiado. Sin embargo, el ciclo rural de transmisión de *Leishmania* podría afectar a otros animales como la fauna silvestre o los animales de producción.

El objetivo de este estudio fue analizar la presencia de anticuerpos anti-*Leishmania* en diferentes rebaños de ovejas y cabras de una zona geográfica de Alemania donde se ha descrito recientemente la presencia de especies de flebótomos competentes para transmitir la infección. Para ello se obtuvieron muestras de suero de pequeños rumiantes de un estudio previo de prevalencia de anticuerpos contra *Coxiella burnetii*. De este conjunto de muestras, se seleccionaron sueros de seis rebaños situados en el estado federal de Baden-Wuerttemberg para determinar anticuerpos contra *L. infantum*. En total, se analizaron 237 sueros (222 hembras y 15 machos) de ovinos y 10 muestras de suero (10 hembras) de caprinos que se analizaron mediante una técnica de ELISA de tipo casero. El punto de corte en las ovejas se fijó en 0,38 unidades de densidad óptica, mientras que en las cabras el punto de corte se fijó en 0,26 unidades de densidad óptica. En todos los casos, los resultados superiores a estos valores se consideraron positivos. En el estudio serológico se detectaron un total de 4 animales positivos, todos ellos ovinos, ninguna de las cabras dio positivo a los anticuerpos contra *L. infantum*. La seroprevalencia de la infección por *L. infantum* en ovinos fue de 1,69%. Nuestro estudio revela la exposición de ovejas a *L. infantum* en una zona no endémica como es Alemania.

## ABSTRACT

Leishmaniosis is a zoonotic vector-borne disease caused by different *Leishmania* parasites. In Europe, *Leishmania infantum* is the most prevalent *Leishmania* species described, and this protozoan is transmitted by different species of sand flies. The epidemiological role of the dog as the main domestic reservoir has been extensively studied. However, the rural cycle of *Leishmania* transmission could affect other animals, such as wildlife or farm animals.

The aim of this study was to analyze the presence of anti-*Leishmania* antibodies in different flocks of sheep and goats in a geographical area of Germany where the presence of competent *Phlebotomus* species to transmit the infection has recently been described. To this end, serum samples were obtained from small ruminants from a previous study of prevalence of antibodies against *Coxiella burnetii*. From this sample pool, sera from six flocks located in the federal state of Baden-Wuerttemberg were selected to determine *L. infantum* antibodies. In total, 237 sera (222 females and 15 males) from sheep and 10 serum samples (10 females) from goats were analysed using a home-type ELISA technique. The cut-off point in sheep was set to 0.38 optical density units, while in goats the cut-off was set to 0.26 optical density units. In all cases, results above these values were considered positive. In the serological study, a total of 4 positive animals were detected, all of them were sheep, none of the goats tested positive for antibodies against *L. infantum*. The seroprevalence of *L. infantum* infection in sheep was 1.69%. Our study reveals the exposure of sheep to *L. infantum* in a non-endemic area such as Germany.

## 2. INTRODUCCIÓN

La leishmaniosis engloba una serie de enfermedades causadas por los parásitos del género *Leishmania* que se transmiten por la picadura de flebótomos hembras infectadas del género *Phlebotomus* en el Viejo Mundo y del género *Lutzomyia* en el Nuevo Mundo (WOAH, 2021). Se entiende por “Nuevo Mundo” a América y por “Viejo Mundo” a Europa, África y Asia. La especie de parásito más importante en el Viejo Mundo es *Leishmania infantum* siendo este sinónimo de *Leishmania chagasi* en el Nuevo Mundo (Solano-Gallego et al., 2009).

La infección por *Leishmania* puede ser antroponótica (de humano a humano) o zoonótica (de animales salvajes o domésticos a humanos). En humanos se han descrito tres manifestaciones clínicas de la enfermedad que son la leishmaniosis cutánea (LC), leishmaniosis visceral (LV) y leishmaniosis mucocutánea (MCL) y su aparición depende de la especie de *Leishmania* y la respuesta inmunitaria del hospedador (Cardoso et al., 2021). El principal reservorio doméstico de *L. infantum* para el hombre es el perro (Quinnell et al., 2009). La leishmaniosis canina causada por *L. infantum* puede dar lugar a diferentes manifestaciones clínicas que varían desde una infección subclínica donde no se aprecian signos clínicos, hasta la forma grave y mortal de la enfermedad (Ruiz et al., 2023). En el gato, la leishmaniosis felina causada por *L. infantum* se ha reportado en áreas endémicas y con menos frecuencia en áreas no endémicas durante las últimas dos décadas, por lo que parece ser una enfermedad felina emergente (WOAH, 2021).

Además de los principales reservorios, puede haber otros reservorios involucrados que pueden mantener temporalmente el parásito, pudiendo tener un papel importante en la transmisión de la infección y que todavía no se conocen (Rezaei et al., 2022). Por ello, la identificación de reservorios es de vital importancia en programas de control de la infección (Cardoso et al., 2021).

## 2.1. Ciclo biológico

*Leishmania* es un parásito bifásico que completa su ciclo biológico en dos hospedadores, por un lado, el flebótomo vector que alberga la forma de promastigote flagelado extracelular y por otra parte el hospedador mamífero donde se desarrolla la forma de amastigote intracelular (Solano-Gallego et al., 2009).

Los flebótomos hembras pican al hospedador vertebrado inyectando en él los promastigotes durante la ingestión de sangre. Una vez se encuentran en la herida, los promastigotes son fagocitados por macrófagos y otras células fagocíticas mononucleares, donde posteriormente se transformarán en amastigotes. El parásito es capaz de evadir la respuesta inmune del hospedador para multiplicarse por división simple e infectar otras células fagocíticas mononucleares. La progresión de la infección dependerá de la eficacia de la respuesta inmune del hospedador (Solano-Gallego et al., 2009). Cuando otro flebótomo ingiera de nuevo la sangre del hospedador vertebrado se llevará consigo las células infectadas de amastigotes, que migrarán al intestino del vector para transformarse en promastigotes. Finalmente, migran a la probóscide del flebótomo (CDC, 2017).

## 2.2. Leishmaniosis en otros animales

Los perros son considerados los principales reservorios de la infección para *L. infantum*, con una seroprevalencia de entre 5 y 30% en la cuenca mediterránea (Solano-Gallego et al., 2009). Sin embargo, la ineficacia de las medidas de control apunta a la existencia de reservorios vertebrados diferentes al perro (Millán et al., 2014). Además, estudios realizados demuestran que en Europa estos reservorios vertebrados pueden tratarse de animales domésticos y salvajes (Cardoso et al., 2021).

En la familia *Bovidae* se ha detectado un único caso de leishmaniosis en una vaca Brown Swiss de 7 años procedente de Suiza. La vaca presentaba varias lesiones cutáneas ulcerativas en el hocico, zona carpiana, base de las orejas, ubre y pared torácica. Los resultados fueron positivos para anticuerpos anti-*Leishmania* tanto en la prueba de inmunofluorescencia indirecta (IFI) como en la técnica de ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA) (Lobsiger et al., 2010). Recientemente, se ha reportado por primera vez un caso de leishmaniosis en una cabra enana africana en España, considerada zona altamente endémica para la leishmaniosis canina. El animal mostraba una dermatitis exfoliativa generalizada acompañada de linfadenomegalia y con resultado positivo por serología cuantitativa presentando niveles moderados de anticuerpos anti-*Leishmania* (Ruiz et al., 2023).

Asimismo, recientemente se ha descrito en Valencia la infección en un hurón doméstico (*Mustela putorius furo*). El animal tenía 4 años y presentaba una lesión papular eritematosa, edematosa y no pruriginosa en el pabellón auricular derecho. Las pruebas histopatológicas revelaron una dermatitis piogranulomatosa crónica y formas intracitoplasmáticas compatibles con amastigotes de *Leishmania* en macrófagos y células gigantes multinucleadas. La infección por *L. infantum* fue confirmada mediante cultivo, reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real (qPCR) e inmunohistoquímica (IHC). Además, las pruebas IFI, ELISA y Western Blot (WB) permitieron detectar la presencia de anticuerpos anti-*Leishmania* (Giner et al., 2020).

Otro de los casos destacables de leishmaniosis en especies no habituales se dio en Alemania, en el estado de Bavaria, donde un potro de 3'5 años presentaba un pequeño nódulo dérmico cerca del párpado inferior. A los dos años de resecarlo, el bulto reapareció y creció rápidamente. El diagnóstico de la leishmaniosis cutánea se basó en histopatología, IHC y microscopía electrónica. Se identificó como agente causal *L. infantum* mediante PCR y la técnica de polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP), pero no se detectaron anticuerpos anti-*Leishmania* en el suero (Koehler et al., 2002).

### 2.3. Leishmaniosis en ovejas

Se dispone de poca información acerca del papel epidemiológico de la oveja en la infección de *Leishmania* spp. debido a la naturaleza asintomática que adopta en esta especie, no habiéndose detectado ningún caso clínico en Europa. Sin embargo, se han realizado varios estudios en diferentes países a nivel internacional para evaluar esta hipótesis.

El estudio realizado en zonas endémicas para leishmaniosis cutánea y visceral en el sur de Irán consta de 181 muestras sanguíneas de ganado, compuesto por 114 cabras, 16 vacas, 49 ovejas y 2 burros. Estas muestras fueron examinadas para detectar ADN y anticuerpos usando métodos moleculares y la prueba de aglutinación directa (DAT). Los resultados muestran que un 28,2% de animales examinados fueron positivos (Rezaei et al., 2022).

En China, donde *L. infantum* causa el subtipo desértico de leishmaniosis visceral que afecta a niños menores de 2 años y tiene una mortalidad del 95%, se ha estudiado la infección de *Leishmania* en muestras sanguíneas de 114 ovejas utilizando dos técnicas distintas. Con la prueba de tira inmunocromatográfica rK39 se detectaron un 26,32% (30/114) de muestras positivas, mientras que con la PCR anidada fueron 54,39% (62/114). No se encontró asociación significativa entre la detección positiva de *Leishmania* y la edad de las ovejas (Han et al., 2018).

En lo que respecta a Europa, se ha investigado la infección de *Leishmania* en ovejas en dos países de la cuenca mediterránea. El primer estudio se llevó a cabo en Grecia, donde se recogieron 361 muestras de suero de ovejas y 179 de cabras de distintas granjas y se examinaron con la técnica ELISA obteniendo una ausencia de anticuerpos anti-*Leishmania*. Este resultado se atribuyó al hecho de que las ovejas y las cabras no son hospedadores naturales del parásito (Kantzoura et al., 2013).

Sin embargo, un estudio más reciente realizado en España muestra que las ovejas de países mediterráneos europeos están expuestas a *L. infantum*. Para llegar a esa conclusión analizaron 302 muestras de suero de ovejas de diferentes regiones, zonas de cría, razas y edades utilizando la técnica ELISA y 28 animales resultaron positivos a anticuerpos anti-*Leishmania* (9,27%). Además, se observó una relación relevante entre la edad de las ovejas y la seropositividad y el género de las ovejas y la seropositividad, siendo las ovejas adultas y hembras las que mostraron mayor índice de seropositividad (Villanueva-Saz et al., 2024).

### 2.3.1. Diagnóstico de *Leishmania* en ovejas

La leishmaniosis se diagnostica desde un punto de vista integrado teniendo en consideración la información del animal, su historial veterinario, los hallazgos de la exploración clínica y los resultados de las pruebas diagnósticas (WOAH, 2021). Las mismas técnicas de confirmación de la infección por *L. infantum* utilizadas en perros, gatos y hurones pueden ser válidos para el ovino, siempre y cuando se adapte previamente a la especie (Villanueva-Saz et al., 2021).

Los métodos disponibles para el diagnóstico se agrupan en dos categorías en función de su objetivo: métodos para la detección del agente y métodos para la detección de la respuesta inmunitaria.

Dentro del primer grupo se encuentra el examen citológico que permite detectar la presencia de amastigotes en macrófagos o líquido extracelular y para ello se utilizan muestras de lesiones cutáneas, médula ósea, ganglios linfáticos, bazo o sangre (Mylonakis et al., 2005; Saridomichelakis et al., 2005). En ocasiones con la citología no se obtiene el diagnóstico esperado debido a los bajos niveles de parásitos detectables. La histopatología es otra de las técnicas que facilita la visualización de parásitos y que consiste en utilizar secciones de biopsia de piel u otros órganos infectados teñidas con hematoxilina-eosina. Además, se pueden visualizar alteraciones compatibles con la infección como pueden ser la inflamación piogranulomatosa, granulomatosa o linfoplasmocitaria y/o la hiperplasia reactiva de los linfonodos (Solano-Gallego et al., 2004; Giunchetti et al., 2008).

El aislamiento en cultivo es la prueba más específica para la detección del parásito, pero requiere largos tiempos de ejecución y se lleva a cabo únicamente en laboratorios especializados. Existen diferentes métodos de aislamiento y cultivo y su elección depende de la capacidad técnica y experiencia del personal del laboratorio, ya que no existe todavía un medio de cultivo universal en el que crezcan con facilidad todas las especies de *Leishmania* (OMS, 2010).

El enfoque diagnóstico más útil para determinar la infección por *Leishmania* es la identificación del ADN del parásito en tejidos aplicando técnicas moleculares y la detección de anticuerpos anti-*Leishmania* específicos en suero mediante técnicas serológicas (Solano-Gallego et al., 2009).

Los métodos moleculares basados en la PCR son muy útiles para diagnosticar e identificar *Leishmania* en diferentes muestras, siendo médula ósea, linfonodo, piel y conjuntiva las muestras más sensibles en el perro (Maia et al., 2009; Manna et al., 2008). Además, esta técnica puede utilizarse en muestras obtenidas de cualquier especie de mamífero, puesto que lo que se detecta es la presencia de ADN del parásito. Actualmente existen tres técnicas de PCR diferentes: PCR convencional, PCR anidada y PCR en tiempo real (cuantitativa) (Gomes et al., 2008). La PCR en tiempo real permite cuantificar la carga parasitaria en tejidos de individuos infectados, lo cual es importante tanto para el diagnóstico como para el seguimiento durante el tratamiento en perros enfermos (Pennisi et al., 2005; Manna et al., 2008).

La serología se define clásicamente como el estudio de las proteínas, predominantemente los anticuerpos, que se encuentran en la sangre y en secreciones como la saliva (Wine et al., 2015). Las técnicas de diagnóstico serológico detectan anticuerpos anti-*Leishmania* circulantes (especialmente IgG1 e IgG2) (Ferrer y Roura, 2010) y, por lo tanto, sirven para medir la respuesta humoral del individuo infectado frente al parásito. En los perros enfermos de leishmaniosis, la respuesta humoral es normalmente muy elevada y se producen gran cantidad de IgGs (Ferrer y Roura, 2010). El estudio serológico para la detección de anticuerpos anti-*Leishmania* específicos se puede efectuar con diferentes técnicas en las que se incluyen IFI, ELISA, DAT, WB y el ensayo inmunocromatográfico rápido.

El ELISA es una de las técnicas más específicas y sencillas para detectar y cuantificar biomoléculas, ya sean anticuerpos o antígenos. Los complejos antígeno-anticuerpo de interés se detectan mediante una reacción de color producida por la acción de una enzima previamente unida a un antígeno o anticuerpo sobre un sustrato. La intensidad de la coloración obtenida, medida por espectrofotometría, es proporcional a la cantidad de enzima presente y por tanto a la concentración de anticuerpos o antígenos buscada (Anofel et al., 2017).

Esta técnica tiene distintas modalidades, pero para este estudio se ha empleado el ELISA indirecto (*Figura 1*), que utiliza un antígeno adherido a una superficie al que posteriormente se une el anticuerpo específico presente en la muestra a valorar, formando así un complejo antígeno-anticuerpo en la superficie. Después, se añade un anticuerpo secundario ligado a una enzima para que se una al complejo antígeno-anticuerpo. A continuación, se agrega un sustrato para producir un cambio de color que está directamente relacionado con la cantidad de anticuerpo específico presente en la muestra original (Lin, 2015).

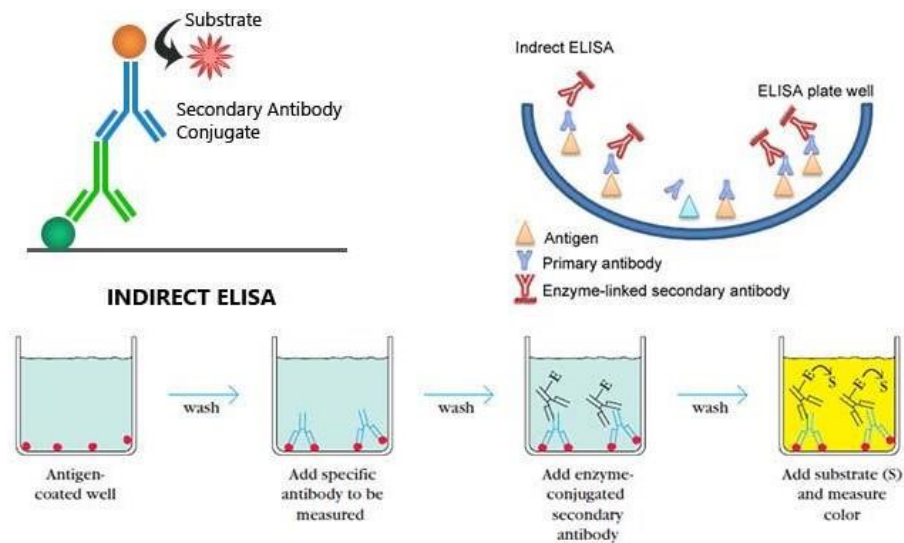


Figura 1. ELISA indirecto (Menarini diagnostics).

En resumen, el diagnóstico de la leishmaniosis en ovejas es similar al perro, con la diferencia de que hay que adaptar y validar estas técnicas a la especie. A día de hoy no se ha demostrado que las ovejas presenten signos clínicos compatibles con la enfermedad, por lo tanto, el diagnóstico de la infección se podrá obtener con un resultado positivo de las pruebas diagnósticas previamente descritas. La detección de ruminantes seropositivos en zonas no endémicas podría considerar a estos como potenciales animales centinelas, sobre todo en zonas no endémicas para la infección.

### 3. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

En Europa, *L. infantum* es la especie de *Leishmania* más prevalente descrita y este protozoo es transmitido por diferentes especies de flebótomos. El papel epidemiológico del perro como principal reservorio doméstico ha sido ampliamente estudiado. Además, otros carnívoros como los gatos podrían tener un impacto directo como reservorios urbanos en ciudades, debido a las poblaciones de gatos callejeros en zonas endémicas de infección por *L. infantum*. Sin embargo, el ciclo rural de transmisión de *Leishmania* podría afectar a otros animales, como la fauna salvaje o los animales de granja.

Recientes evidencias confirman que el ganado, incluidos los pequeños rumiantes, podría estar expuesto a la infección por *Leishmania* en diferentes regiones de España como país endémico. El impacto del cambio climático en la distribución de los vectores y en la incidencia de las enfermedades transmitidas por vectores es evidente, y es necesario tenerlo en cuenta en base al enfoque de «Una sola salud». Existen diferentes informes que indican que el cambio climático ha provocado alteraciones en la distribución temporal y geográfica de diversas especies a nivel global, abarcando vectores y los patógenos que transmiten. En este sentido, se ha descrito la presencia de flebotomos en diferentes zonas del sur de Alemania donde no se habían registrado previamente.

El objetivo de este estudio fue determinar el nivel de seroprevalencia de animales positivos a *Leishmania* en diferentes rebaños de ovejas y cabras de una zona geográfica de Alemania no endémica de leishmaniosis, donde se ha descrito recientemente la presencia de especies de *Phlebotomus* competentes para transmitir la infección.

## **4. METODOLOGÍA**

### **4.1. Búsqueda de información**

Para la elaboración de este Trabajo Fin de Grado se ha realizado una búsqueda de información científica y una revisión de artículos científicos sobre leishmaniosis de los últimos 20 años (2004-2024), con el objetivo de adquirir información actualizada sobre el tema. La información se ha consultado en la base de datos “Pubmed” principalmente. La búsqueda bibliográfica se ha realizado tanto en castellano como en inglés, utilizando las siguientes palabras clave: “antibodies”, “Germany”, “*L. infantum*”, “*Leishmania infantum*”, “*Leishmania*”, “serology”, “sheep”, “vector-borne diseases”, “epidemiology”. Como operadores booleanos se empleó el término “AND”.

## 4.2. Zona de estudio y muestras a analizar

Las muestras de suero de ovejas y cabras se obtuvieron en Alemania a partir de un estudio previo de prevalencia de anticuerpos frente a *Coxiella burnetii* (Wolf et al., 2020). El tamaño de muestra necesario de cada rebaño se calculó a partir de los supuestos de una prevalencia esperada del 3%, un intervalo de confianza del 95%, una potencia del 80% y una precisión del 5%, lo que condujo a un máximo de 44 animales muestreados por rebaño. Si había cabras en la misma explotación, el tamaño de su muestra se calculó aparte con los mismos supuestos, independientemente del número de ovejas muestreadas. De este conjunto de muestras, se seleccionaron sueros de seis rebaños (Q64, Q65, Q66, Q68, Q69, Q70), situados en el estado federado de Baden-Wurtemberg, para determinar los anticuerpos frente a *L. infantum*.



Figura 2. Mapa geográfico de Alemania. En color verde oscuro se resalta el estado federado de Baden-Wurtemberg, donde se encuentran los rebaños seleccionados para la obtención de muestras.

Estas explotaciones están situadas en el oeste de Baden-Wurtemberg, cerca de la frontera con Francia, y esta región se conoce como el valle del Alto Rin. En esta zona, se detectó *Phlebotomus mascittii* desde 2015 hasta 2018 (Oerther et al., 2020). Cinco granjas fueron muestreadas a principios de marzo de 2018, pero la granja Q69 fue muestreada en mayo de 2018. Además, cinco granjas tenían ovejas, y la granja Q70 contaba con ovejas y cabras. En función de su edad, los animales se clasificaron como animales jóvenes (< 2 años), adultos (de  $\geq 2$  años a < 5 años) o viejos ( $\geq 5$  años).

Baden-Wurtemberg es el tercer estado de Alemania, tanto en extensión (35.742 km<sup>2</sup>) como en población (10,7 millones de habitantes) y su capital es Stuttgart. Limita al norte con el estado de Hesse, al noreste y al este con el estado de Baviera, al sur con Suiza, al oeste con Francia (región de Alsacia) y, al noroeste con el río Rin y el estado de Renania-Palatinado. En este estado se sitúa la mayor superficie forestal continua de Alemania: la Selva Negra (Schwarzwald), que se extiende desde el oeste hasta las orillas del río Rin.

El clima en Baden-Wurtemberg es templado, con temperaturas decrecientes con la altura, siendo el Valle del Rin la región más cálida de Alemania, con temperaturas que en verano rondan los 20°C (máxima promedio de 26°C) y en invierno los 2°C (máxima promedio de 5°), con precipitaciones moderadas, alrededor de 800 mm por año. Datos del servicio meteorológico alemán indican que actualmente Alemania tiene un clima mediterráneo, con una temperatura anual media de 10°C, que se alcanza o se supera en varias regiones, lo que supone un clima apropiado para las condiciones de vida de los flebotomos (Naucke et al., 2008).

### 4.3. Análisis de muestras mediante ELISA para la detección de anticuerpos frente a *Leishmania infantum*

El ELISA se realizó en todos los sueros como se ha descrito previamente (Villanueva-Saz et al., 2024). Se añadió a cada pocillo una alícuota de 100 µl de suero de oveja diluido 1:100 en PBST y leche desnatada en polvo al 1% (PBST-M). Las placas se incubaron durante 1 hora a 37 °C en una cámara húmeda. Después de lavar las placas durante 3 min 3 veces con PBST seguido de 1 lavado con PBS durante 1 min, se añadieron 100 µl de conjugado por pocillo. Posteriormente, las placas se incubaron durante 1 hora a 37 °C en la cámara húmeda y se lavaron de nuevo con PBST y PBS como se describió anteriormente. Finalmente, se añadió 100 µl de sustrato a cada pocillo y se mantuvo durante 20 ±5 min a temperatura ambiente en oscuridad. La reacción se paró añadiendo 100 µl de solución de parada a cada pocillo. Los valores de absorbancia se leyeron a 492 nm en un lector de ELISA.

Como control positivo, cada placa incluyó tres muestras de suero (perro enfermo seropositivo, gato enfermo seropositivo y cabra enferma seropositiva diagnosticada con leishmaniosis clínica) (Ruíz et al., 2023). Por el contrario, como control negativo, se incluyó el suero de una oveja sana no infectada. Se utilizaron los mismos sueros positivos y negativos para todas las placas. Todas las muestras se analizaron por duplicado. El punto de corte en ovejas se fijó en 0,38 unidades de densidad óptica (unidades DO) (media + 3 desviaciones estándar (DE) de los valores de 90 ovejas de zonas no endémicas como el norte de España). En el caso de las cabras, el punto de corte se fijó en 0,26 unidades de densidad óptica (media + 3 DE) de los valores de 50 cabras sanas de zonas no endémicas como el norte de España). En todos los casos, los resultados por encima de estos valores se consideraron positivos.

### 4.4. Análisis estadístico

Los datos recogidos para toda la población se analizaron mediante estadística descriptiva. Se realizó un análisis univariante de los datos categóricos para determinar posibles asociaciones entre la seropositividad a *L. infantum* y las siguientes variables: edad, sexo y explotación. La significación de esta diferencia se evaluó mediante la prueba exacta de Fisher o Chi-cuadrado. Se consideró significativa una  $p \leq 0,05$ . Se utilizó el programa informático SPSS v.22 (SPSS Inc., Chicago, EE. UU.).

## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.1. Resultados

En total, se analizaron 237 sueros (222 hembras y 15 machos) de ovinos y 10 muestras de suero (10 hembras) de caprinos en el suroeste de Alemania. Tres rebaños presentaron animales seropositivos a *L. infantum*; dos rebaños (Q65, Q70) contenían una oveja seropositiva, mientras que el rebaño Q64 tenía dos ovejas seropositivas. Tres ovejas seropositivas se clasificaron como adultas y una como senior. Ninguna de las cabras resultó positiva a los anticuerpos contra *L. infantum* (Tabla 1). No se detectó ninguna asociación significativa ( $p > 0,05$ ) entre la seropositividad a *leishmania* y las variables evaluadas. Por último, la seroprevalencia de la infección por *L. infantum* en ovinos fue de 1,69 % (intervalo de confianza [IC] del 95%: 0,66 - 4,26%)

Tabla 1. Número de rebaños (junto con su localización), ovejas, cabras y animales seropositivos a *Leishmania infantum*.

| Granja | Especie/Número de animales muestreados | Número de animales seropositivos /Prevalencia (%) dentro del rebaño | Ubicación (distrito)     |
|--------|--|---|--------------------------|
| Q64    | Oveja/42                               | 2/4.8%  | Raststatt                |
| Q65    | Oveja/35                               | 1/2.9%  | Ortenaukreis             |
| Q66    | Oveja/41                               | 0   | Freiburg                 |
| Q68    | Oveja/44                               | 0   | Breisgau-Hochschwarzwald |
| Q69    | Oveja/33                               | 0   | Breisgau-Hochschwarzwald |
| Q70    | Oveja/40                               | 1/2.5%  | Baden-Baden              |
|        | Cabra/10                               | 0   |                          |

## 5.2. Discusión

Se desconoce el papel epidemiológico de los pequeños rumiantes en las zonas endémicas de infección por *L. infantum*. Sin embargo, un estudio epidemiológico realizado en una zona endémica de leishmaniosis canina en España detectó una seroprevalencia del 9,27% basada en la técnica ELISA (Villanueva-Saz et al., 2024) y en ovejas de la provincia de Tarragona (España) se obtuvo una seroprevalencia de 11,90% mediante la técnica Dot-ELISA (Portús et al., 2002). Además, en una zona con elevada prevalencia de leishmaniosis en perros del mismo país, se ha descrito recientemente la presencia de una cabra enferma infectada (Ruíz et al., 2023). En otro estudio realizado en Grecia, incluyendo diferentes rebaños de ovejas y cabras, no se detectaron animales seropositivos por ELISA (Kantzoura et al., 2013).

En el presente estudio epidemiológico, el número de animales seropositivos fue inferior en comparación con el estudio serológico español, debido a que Alemania no es una zona endémica tradicional de leishmaniosis. Esto también se cumple en el estudio más reciente realizado en Alemania donde se ha observado una seroprevalencia de 1,45% en ovejas (Bauer et al., 2024).

Apenas se han reportado casos autóctonos de leishmaniosis en humanos, perros, gatos y caballos en Alemania, aunque se han detectado varios centenares de perros positivos importados desde países endémicos de leishmaniosis (Naucke et al., 2008). Sin embargo, se ha descrito la presencia de perros enfermos infectados que nunca habían estado en una región endémica de infección por *L. infantum* en Alemania (Naucke y Lorentz, 2012). En los perros, en ausencia de vectores competentes para la transmisión de *L. infantum*, están implicadas otras vías de transmisión, como la venérea, la vertical y las heridas por mordedura (Naucke y Lorentz, 2012; Naucke et al., 2016).

Actualmente, *P. mascitti* es uno de los flebótomos más extendidos en Alemania, sobre todo en el estado de Baden-Wurtemberg, pero todavía no se ha confirmado su capacidad vectorial para transmitir *L. infantum*. En este sentido, se ha detectado ADN de *L. infantum* en *P. mascitti* en zonas no endémicas como Serbia, Austria e Italia (Vaselek et al., 2017; Zanet et al., 2014; Obwaller et al., 2016). Se sabe que múltiples especies de *Leishmania* se han adaptado a flebótomos específicos para su transmisión, pero en el caso de *L. infantum* la transmisión se puede dar a través de diversos vectores (Obwaller et al., 2016). Por lo tanto, la presencia de ovejas seropositivas junto a la identificación de *P. mascitti* en el estado de Baden-Wurtemberg en el mismo año sugiere la exposición de ovejas a *L. infantum* (Bauer et al., 2024).

Como consecuencia del cambio climático, se prevé que a finales de este siglo en Europa central la incidencia de días muy calurosos al año alcance la incidencia actual en el sur de Europa. Estos cambios pueden favorecer un cambio de distribución y un mayor establecimiento regional de ciertas especies de flebotomos, incluida *P. mascittii* (Medlock et al., 2014).

Durante un tiempo se pensaba que los Alpes formaban una barrera natural para la distribución geográfica de los flebotomos entre el sur y el norte de Europa debido a las condiciones climáticas variables. Sin embargo, en un estudio realizado en Alemania (Figura 3) se capturaron 237 especímenes de *P. mascittii* en 16 localizaciones diferentes del estado de Baden-Wurtemberg y del estado de Renania-Palatinado (Naucke et al., 2008).

En la actualidad, la distribución geográfica de *P. mascittii* y *P. perniciosus* se ha expandido en Alemania, no solo están presentes en el estado de Baden-Wurtemberg y Renania-Palatinado sino que se encuentran distribuidos por varias zonas del país tal y como se muestra en la Figura 4 y Figura 5 (ECDC).

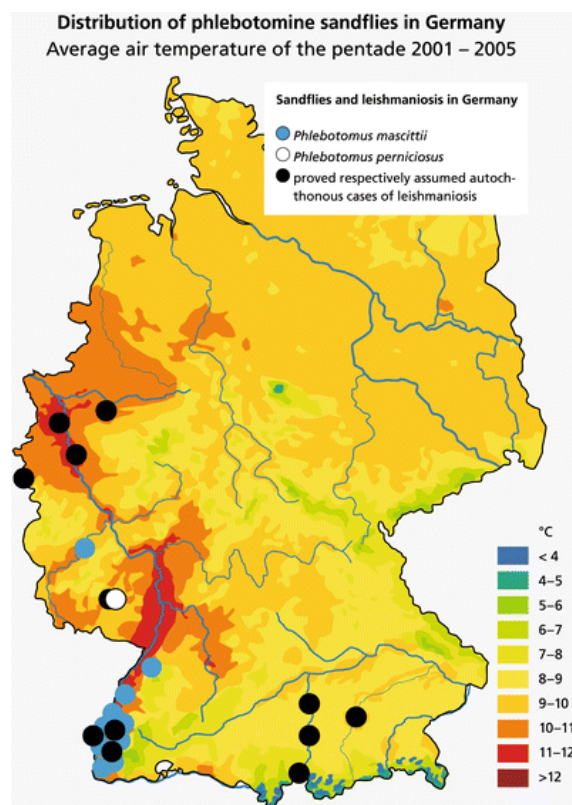


Figura 3. Climas y distribución de *Phlebotomus mascittii* y *Phlebotomus perniciosus* en Alemania (Naucke et al., 2008).

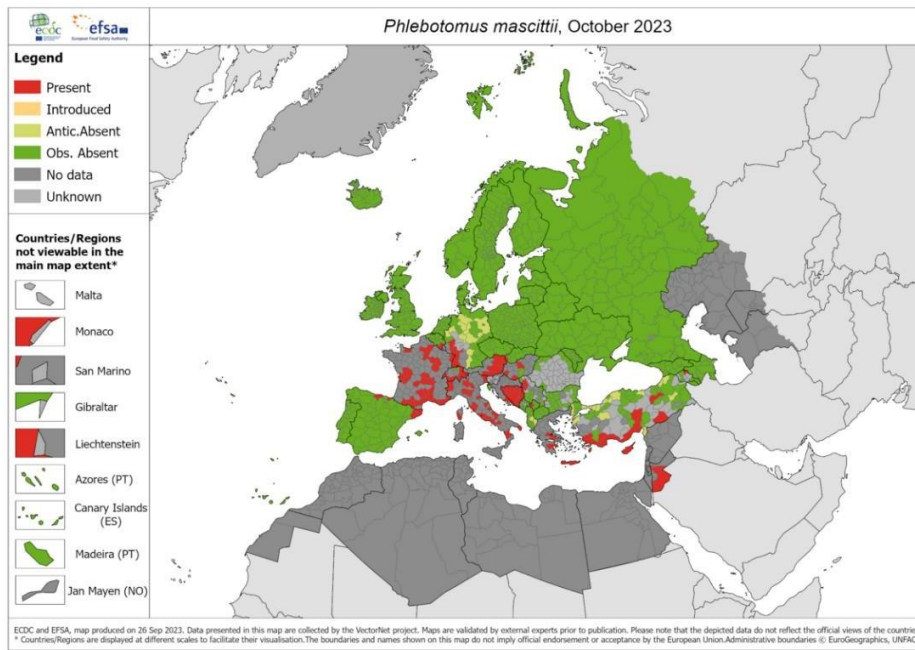


Figura 4. Distribución actual conocida de *P. mascittii* en Europa (ECDC y EFSA, 2023).

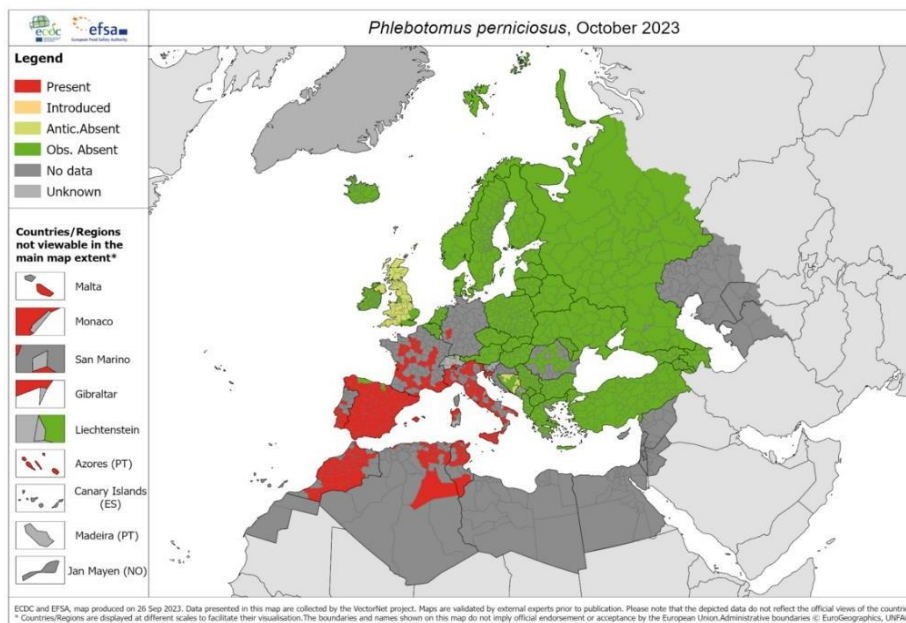


Figura 5. Distribución actual conocida de *P. perniciosus* en Europa (ECDC y EFSA, 2023).

Nuestro estudio revela la presencia de ovejas seropositivas y la exposición a la infección por *L. infantum* en Alemania, zona tradicionalmente no endémica del parásito. Hasta donde sabemos, este estudio es de los primeros que demuestra la presencia de ovejas seropositivas en el suroeste de Alemania. Para verificar que el ganado actúa como reservorio es imprescindible evaluar el ciclo rural de *L. infantum* mediante más estudios epidemiológicos (Villanueva-Saz et al., 2024).

Además, es importante llevar a cabo una vigilancia activa y pasiva de los vectores y los patógenos transmitidos por vectores para obtener información detallada relacionada con la posible propagación a nuevas zonas geográficas o la introducción de nuevos patógenos en zonas que estaban clasificadas como no endémicas (Bauer et al., 2024).

La investigación realizada en este trabajo de fin de grado demuestra la exposición a *L. infantum* en una zona no endémica para la infección como es Alemania. Los resultados resaltan que la posible existencia de un ciclo rural en el mantenimiento de la infección, poniendo de manifiesto que las enfermedades de transmisión vectorial como la leishmaniosis, pueden ser detectadas en zonas no habituales, muy probablemente debido al efecto del cambio climático que tiene un impacto directo en la ecología de los vectores y en el propio parásito.

Finalmente, las limitaciones de este estudio serían el carácter retrospectivo del mismo, la falta de datos clinicopatológicos de las ovejas seropositivas y no haber chequeado serológicamente a los perros próximos al entorno de los rebaños. Por el contrario, la fortaleza del estudio sería el tamaño de muestra incluido en el estudio.

## 6. CONCLUSIONES/CONCLUSIONS

Con los resultados obtenidos en el presente estudio se puede llegar a las siguientes conclusiones:

- Se ha detectado la presencia de anticuerpos frente a *L. infantum* en ovejas de tres de los seis rebaños muestreados del estado federado de Baden-Wurtemberg, Alemania.
- La seroprevalencia encontrada en ovejas fue de 1,69% mientras que ninguna de las cabras resultó positiva.
- A pesar de que no tener detallada la información acerca del estado de salud de los animales muestreados, con los resultados obtenidos se demuestra que están expuestos a la infección por *L. infantum*.

## CONCLUSIONS

With the results obtained in this study, the following conclusions can be reached:

- The presence of antibodies against *L. infantum* has been detected in sheep from three of the six flocks sampled from the federal state of Baden-Wurtemberg, Germany.
- The seroprevalence found in sheep was 1,69% while none of the goats were positive.
- Although there is no detailed information about the health status of the sampled animals, the results obtained show that they are exposed to *L. infantum* infection.

## 7. VALORACIÓN PERSONAL

La elaboración de este trabajo me ha servido para ampliar mis conocimientos y entender mejor una enfermedad tan relevante de salud pública y animal en todo el mundo como es la Leishmaniosis. He profundizado en la epidemiología y diagnóstico de la enfermedad, adquiriendo nuevos conocimientos que me servirán en un futuro para afrontar los casos que lleguen a la clínica o para seguir formándome en el campo de la investigación. Además, he podido desarrollar mis habilidades de búsqueda y selección de la información, así como potenciar mi capacidad de síntesis y redacción. Todo ello ha contribuido a mi crecimiento académico, profesional y personal.

Por último, expresar mi agradecimiento a mis tutores, Sergio Villanueva Saz y Delia Lacasta Lozano, por su ayuda y acompañamiento durante la realización de este trabajo.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

Alcover, M. M., Basurco, A., Fernandez, A., Riera, C., Fisa, R., Gonzalez, A., Verde, M., Garrido, A. M.,

Ruíz, H., Yzuel, A., 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. *Parasit. Vectors.*

14, 178. <https://doi.org/10.1186/s13071-021-04682-w>

Alcover, M. M., Ribas, A., Guillén, M. C., Berenguer, D., Tomás-Pérez, M., Riera, C., Fisa, R. (2020).

Wild mammals as potential silent reservoirs of *Leishmania infantum* in a Mediterranean area.

*Prev. Vet. Med.* 175, 104874. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2019.104874>

Anofel, Botterel, F., Dardé, M.-L., Debourgogne, A., Delhaes, L., Houzé, S., Morio, F., Kauffmann-Lacroix, C., & Roques, C. (2017). Chapitre 9—Techniques ELISA et apparentées. En Anofel, F., Botterel, M.-L., Dardé, A., Debourgogne, L., Delhaes, S., Houzé, F., Morio, C., Kauffmann-Lacroix, & C. Roques (Eds.), *Parasitologie et Mycologie Médicales—Guide des Analyses et des Pratiques Diagnostiques* (pp. 175-181). Elsevier Masson. <https://doi.org/10.1016/B978-2-294-75363-3.00009-4>

Basurco, A., Natale, A., Capello, K., Fernández, A., Verde, M. T., González, A., Yzuel, A., Giner, J., & Villanueva-Saz, S. (2020). Evaluation of the performance of three serological tests for diagnosis of *Leishmania infantum* infection in dogs using latent class analysis. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 29, e018020. <https://doi.org/10.1590/S1984-29612020105>

Bauer, B.U., Lebrero, M.E., Ganter, M., Navarro, T., Fernández, A., Ruíz de Arcaute, M., Ortín, A., Villanueva-Saz, S., Marteles, D., Ruiz, H., Climent, M., Quílez, P., Lacasta, D. First Evidence of *Leishmania infantum* Antibodies in Sheep (*Ovis aries*) from South Germany (2024). *Animals*, 14, 1860. <https://doi.org/10.3390/ani14131860>

Cardoso, L., Schallig, H., Persichetti, M. F., & Pennisi, M. G. (2021). New Epidemiological Aspects of Animal Leishmaniosis in Europe: The Role of Vertebrate Hosts Other Than Dogs. *Pathogens*, 10(3), Article 3. <https://doi.org/10.3390/pathogens10030307>

CDC – Centers for Disease Control and Prevention, (2017). *Leishmaniasis*. <https://www.cdc.gov/dpdx/leishmaniasis/index.html>

Comité de Expertos de la OMS sobre el Control de las Leishmaniasis & Organización Mundial de la Salud (2012). *Control de las leishmaniasis: Informe de una reunión del Comité de Expertos de la OMS sobre el Control de las Leishmaniasis, Ginebra, 22 a 26 de marzo de 2010*. Organización Mundial de la Salud. <https://iris.who.int/handle/10665/82766>

European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). (s. f.).

<https://www.ecdc.europa.eu/en/leishmaniasis>

Ferrer, L., & Roura, X. (2010). La serología y la leishmaniosis canina. *Portal Veterinaria*.

<https://www.portalveterinaria.com/animales-de-compania/articulos/21220/la-serologia-y-la-leishmaniosis-canina.html>

Giner, J., Villanueva-Saz, S., Alcover, M. M., Riera, C., Fisa, R., Basurco, A., Yzuel, A., Trotta, M., Fani, C., Verde, M. T., & Fernández, A. (2020). Treatment and follow-up of a domestic ferret (*Mustela putorius furo*) with clinical leishmaniosis caused by *Leishmania infantum*. *Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports*, 21, 100423.

<https://doi.org/10.1016/j.vprsr.2020.100423>

Giner, J., Villanueva-Saz, S., Fernández, A., Gómez, M. A., Podra, M., Lizarraga, P., Lacasta, D., Ruiz, H., Del Carmen Aranda, M., de Los Ángeles Jimenez, M., Hernández, R., Yzuel, A., Verde, M., (2022). Detection of Anti-*Leishmania infantum* Antibodies in Wild European and American Mink (*Mustela lutreola* and *Neovison vison*) from Northern Spain, 2014-20. *J. Wildl. Dis.* 58, 198–204. <https://doi.org/10.7589/JWD-D-21-00027>

Giunchetti, R. C., Martins-Filho, O. A., Carneiro, C. M., Mayrink, W., Marques, M. J., Tafuri, W. L., Corrêa-Oliveira, R., & Reis, A. B. (2008). Histopathology, parasite density and cell phenotypes of the popliteal lymph node in canine visceral leishmaniasis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 121(1-2), 23-33. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2007.07.009>

Gomes, Y. M., Paiva Cavalcanti, M., Lira, R. A., Abath, F. G. C., & Alves, L. C. (2008). Diagnosis of canine visceral leishmaniasis: Biotechnological advances. *The Veterinary Journal*, 175(1), 45-52. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2006.10.019>

- Han, S., Wu, W.-P., Chen, K., Osman, I., Kiyim, K., Zhao, J., Hou, Y.-Y., Wang, Y., Wang, L.-Y., & Zheng, C.-J. (2018). Epidemiological survey of sheep as potential hosts for *leishmania* in China. *BMC Veterinary Research*, 14(1), 378. <https://doi.org/10.1186/s12917-018-1701-z>  
<https://www.ecdc.europa.eu/en>
- Kantzoura, V., Diakou, A., Kouam, M. K., Feidas, H., Theodoropoulou, H., & Theodoropoulos, G. (2013). Seroprevalence and risk factors associated with zoonotic parasitic infections in small ruminants in the Greek temperate environment. *Parasitology International*, 62(6), 554-560. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2013.08.010>
- Karayiannis, S., Ntais, P., Messaritakis, I., Tsirigotakis, N., Dokianakis, E., & Antoniou, M. (2015). Detection of *Leishmania Infantum* in red foxes (*Vulpes vulpes*) in Central Greece. *Parasitology*, 142(13), 1574-1578. <https://doi.org/10.1017/S0031182015001158>
- Kenubih, A., Dagnachew, S., Almaw, G., Abebe, T., Takele, Y., Hailu, A., & Lemma, W. (2015). Preliminary survey of domestic animal visceral leishmaniasis and risk factors in north-west Ethiopia. *Tropical Medicine & International Health: TM & IH*, 20(2), 205-210. <https://doi.org/10.1111/tmi.12418>
- Koehler, K., Stechele, M., Hetzel, U., Domingo, M., Schönián, G., Zahner, H., & Burkhardt, E. (2002). Cutaneous leishmaniosis in a horse in southern Germany caused by *Leishmania infantum*. *Veterinary Parasitology*, 109(1), 9-17. [https://doi.org/10.1016/S0304-4017\(02\)00246-7](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(02)00246-7)
- Leishmaniosis*. (s. f.). WOA - World Organisation for Animal Health. <https://www.woah.org/en/disease/leishmaniosis/>
- Lin, A. V. (2015). Indirect ELISA. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 1318, 51-59. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2742-5\\_5](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2742-5_5)

- Lobsiger, L., Müller, N., Schweizer, T., Frey, C. F., Wiederkehr, D., Zumkehr, B., & Gottstein, B. (2010). An autochthonous case of cutaneous bovine leishmaniasis in Switzerland. *Veterinary Parasitology*, 169(3), 408-414. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.01.022>
- Maia, C., Conceição, C., Pereira, A., Rocha, R., Ortuño, M., Muñoz, C., Jumakanova, Z., Pérez-Cutillas, P., Özbel, Y., Töz, S., Baneth, G., Monge-Maillo, B., Gasimov, E., Stede, Y. V. der, Torres, G., Gossner, C. M., & Berriatua, E. (2023). The estimated distribution of autochthonous leishmaniasis by *Leishmania infantum* in Europe in 2005–2020. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 17(7), e0011497. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0011497>
- Maia, C., Ramada, J., Cristóvão, J. M., Gonçalves, L., & Campino, L. (2009). Diagnosis of canine leishmaniasis: Conventional and molecular techniques using different tissues. *The Veterinary Journal*, 179(1), 142-144. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2007.08.009>
- Manna, L., Reale, S., Vitale, F., Picillo, E., Pavone, L. M., & Gravino, A. E. (2008). Real-time PCR assay in *Leishmania*-infected dogs treated with meglumine antimoniate and allopurinol. *The Veterinary Journal*, 177(2), 279-282. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2007.04.013>
- Medlock, J. M., Hansford, K. M., Van Bortel, W., Zeller, H., & Alten, B. (2014). A summary of the evidence for the change in European distribution of phlebotomine sand flies (*Diptera: Psychodidae*) of public health importance. *Journal of Vector Ecology*, 39(1), 72-77. <https://doi.org/10.1111/j.1948-7134.2014.12072.x>
- Menarini Diagnostics España. Recuperado de <https://www.menarinidiag.es/es-es/>
- Millán, J., Ferroglio, E., & Solano-Gallego, L. (2014). Role of wildlife in the epidemiology of *Leishmania infantum* infection in Europe. *Parasitology Research*, 113(6), 2005-2014. <https://doi.org/10.1007/s00436-014-3929-2>

- Miró, G., Petersen, C., Cardoso, L., Bourdeau, P., Baneth, G., Solano-Gallego, L., Pennisi, M. G., Ferrer, L., Oliva, G. (2017). Novel Areas for Prevention and Control of Canine Leishmaniosis. *Trends. Parasitol.* 33, 718–730. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2017.05.005>
- Montaner-Angoiti, E., Llobat, L. (2023). Is leishmaniasis the new emerging zoonosis in the world?. *Vet. Res. Commun.* 47, 1777–1799. <https://doi.org/10.1007/s11259-023-10171-5>
- Mylonakis, M. E., Papaioannou, N., Saridomichelakis, M. N., Koutinas, A. F., Billinis, C., & Kontos, V. I. (2005). Cytologic patterns of lymphadenopathy in dogs infected with *Leishmania infantum*. *Veterinary Clinical Pathology*, 34(3), 243-247. <https://doi.org/10.1111/j.1939-165x.2005.tb00048.x>
- Naucke, T. J., & Lorentz, S. (2012). First report of venereal and vertical transmission of canine leishmaniosis from naturally infected dogs in Germany. *Parasites & Vectors*, 5(1), 67. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-5-67>
- Naucke, T. J., Amelung, S., Lorentz, S., (2016). First report of transmission of canine leishmaniosis through bite wounds from a naturally infected dog in Germany. *Parasit. Vectors.* 9, 256. <https://doi.org/10.1186/s13071-016-1551-0>
- Naucke, T. J., Menn, B., Massberg, D., & Lorentz, S. (2008). Sandflies and leishmaniasis in Germany. *Parasitology Research*, 103(1), 65-68. <https://doi.org/10.1007/s00436-008-1052-y>
- Obwaller, A. G., Karakus, M., Poepl, W., Töz, S., Özbel, Y., Aspöck, H., & Walochnik, J. (2016). Could *Phlebotomus mascittii* play a role as a natural vector for *Leishmania infantum*? New data. *Parasites & Vectors*, 9(1), 458. <https://doi.org/10.1186/s13071-016-1750-8>
- Oerther, S., Jöst, H., Heitmann, A., Lühken, R., Krüger, A., Steinhausen, I., Brinker, C., Lorentz, S., Marx, M., Schmidt-Chanasit, J., Naucke, T., & Becker, N. (2020). Phlebotomine sand flies in Southwest Germany: An update with records in new locations. *Parasites & Vectors*, 13(1), 173. <https://doi.org/10.1186/s13071-020-04058-6>

- Pennisi, M. G., Reale, S., Giudice, S. L., Masucci, M., Caracappa, S., Vitale, M., & Vitale, F. (2005). Real-time PCR in dogs treated for leishmaniasis with allopurinol. *Veterinary Research Communications, 29 Suppl 2*, 301-303. <https://doi.org/10.1007/s11259-005-0067-4>
- Portús, M., Gállego, M., Riera, C., Aisa, M.J., Fisa, R., & Castillejo, S. (2002). Wild and domestic mammals in the life cycle of *Leishmania infantum* in Southwest Europe. A literature review and studies performed in Catalonia (Spain). *Revista Ibérica de Parasitología*, 62: 72-76.
- Quinnell, R. J., & Courtenay, O. (2009). Transmission, reservoir hosts and control of zoonotic visceral leishmaniasis. *Parasitology*, 136(14), 1915-1934. <https://doi.org/10.1017/S0031182009991156>
- Rezaei, Z., Pourabbas, B., Asaei, S., Sepehrpour, S., Ahmadnia Motlagh, S., Pourabbas, P., Abdolahi Khasibi, S., & Alborzi, A. (2022). Livestock infected with *Leishmania* spp. In southern Iran. *Parasites & Vectors*, 15(1), 215. <https://doi.org/10.1186/s13071-022-05313-8>
- Ruiz, H., Ferrán Serra, J., Fernández, A., Verde, M., Arenal, J., Solsona, A., Bolea, S., & Villanueva-Saz, S. (2023). O-083 Clinical leishmaniosis due to *Leishmania infantum* in a goat: Clinical findings and treatment response. *Animal - science proceedings*, 14(1), 117. <https://doi.org/10.1016/j.anscip.2023.01.159>
- Ruiz, P., Durán, Á., Duque, F. J., González, M. A., Cristóbal, J. I., Nicolás, P., Pérez-Merino, E. M., Macías-García, B., & Barrera, R. (2023). Urinary cystatin C and N-acetyl-beta-D-glucosaminidase (NAG) as early biomarkers for renal disease in dogs with leishmaniosis. *Veterinary Parasitology*, 318, 109930. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2023.109930>
- Saridomichelakis, M. N., Mylonakis, M. E., Leontides, L. S., Koutinas, A. F., Billinis, C., & Kontos, V. I. (2005). Evaluation of lymph node and bone marrow cytology in the diagnosis of canine leishmaniasis (*Leishmania infantum*) in symptomatic and asymptomatic dogs. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 73(1), 82-86.

- Singh, N., Mishra, J., Singh, R., & Singh, S. (2013). Animal reservoirs of visceral leishmaniasis in India. *The Journal of Parasitology*, 99(1), 64-67. <https://doi.org/10.1645/GE-3085.1>
- Sobrino, R., Ferroglio, E., Oleaga, A., Romano, A., Millan, J., Revilla, M., Arnal, M. C., Trisciuglio, A., & Gortázar, C. (2008). Characterization of widespread canine *leishmaniasis* among wild carnivores from Spain. *Veterinary Parasitology*, 155(3), 198-203. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2008.05.003>
- Solano-Gallego, L., Fernández-Bellon, H., Morell, P., Fondevila, D., Alberola, J., Ramis, A., & Ferrer, L. (2004). Histological and immunohistochemical study of clinically normal skin of *Leishmania infantum*-infected dogs. *Journal of Comparative Pathology*, 130(1), 7-12. [https://doi.org/10.1016/s0021-9975\(03\)00063-x](https://doi.org/10.1016/s0021-9975(03)00063-x)
- Solano-Gallego, L., Koutinas, A., Miró, G., Cardoso, L., Pennisi, M. G., Ferrer, L., Bourdeau, P., Oliva, G., & Baneth, G. (2009). Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniosis. *Veterinary Parasitology*, 165(1), 1-18. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.05.022>
- Solsona, A., Fernández, A., Bolea, S., Narváez, J. J., Fernández, R. F., Ruiz, M., Fuertes, M., & Villanueva-Saz, S. (2023). O-094 *Leishmania infantum* seropositive in sheep from an endemic region of canine leishmaniosis. *Animal - science proceedings*, 14(1), 125-126. <https://doi.org/10.1016/j.anscip.2023.01.170>
- Tsokana, C. N., Sokos, C., Giannakopoulos, A., Mamuris, Z., Birtsas, P., Papaspyropoulos, K., Valiakos, G., Spyrou, V., Lefkaditis, M., Chatzopoulos, D. C., Kantere, M., Manolakou, K., Touloudi, A., Burriel, A. R., Ferroglio, E., Hadjichristodoulou, C., & Billinis, C. (2016). First evidence of *leishmania* infection in European brown hare (*Lepus europaeus*) in Greece: GIS analysis and phylogenetic position within the *Leishmania* spp. *Parasitology Research*, 115(1), 313-321. <https://doi.org/10.1007/s00436-015-4749-8>

- Vaselek, S., Ayhan, N., Oguz, G., Erisoz Kasap, O., Savić, S., Di Muccio, T., Gradoni, L., Ozbel, Y., Alten, B., Petrić, D. (2017). Sand fly and *Leishmania* spp. survey in Vojvodina (Serbia): first detection of *Leishmania infantum* DNA in sand flies and the first record of *Phlebotomus* (*Transphlebotomus*) *mascittii* Grassi, 1908. *Parasit. Vectors*. 10, 444. <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2386-z>
- Villanueva-Saz, S., Giner, J., Marteles, D., Verde, M., Yzuel, A., Riera, C., Fisa, R., Alcover, M., & Fernández, A. (2021). Leishmaniosis caused by *Leishmania infantum* in ferrets: Update review. *Veterinary and Animal Science*, 15, 100229. <https://doi.org/10.1016/j.vas.2021.100229>
- Villanueva-Saz, S., Lebrero, M. E., Solsona, A., Ramos, J. J., de Arcaute, M. R., Ruíz, H., Pérez, M. D., Bello, J. M., Verde, M., Ortín, A., Marteles, D., Fernández, A., Gómez, A., Trotta, M., & Lacasta, D. (2024). Presence of anti-*Leishmania infantum* antibodies in sheep (*Ovis aries*) in Spain. *Veterinary Research Communications*, 48(1), 615-621. <https://doi.org/10.1007/s11259-023-10221-y>
- Villanueva-Saz, S., Martínez, M., Nijhof, A. M., Gerst, B., Gentil, M., Müller, E., Fernández, A., González, A., Yusuf, M. S. M., Greco, G., Verde, M., Sgroi, G., Lacasta, D., Marteles, D., Trotta, M., & Schäfer, I. (2023). Molecular survey on vector-borne pathogens in clinically healthy stray cats in Zaragoza (Spain). *Parasites & Vectors*, 16(1), 428. <https://doi.org/10.1186/s13071-023-06046-y>
- Wine, Y., Horton, A. P., Ippolito, G. C., & Georgiou, G. (2015). Serology in the 21st century: The molecular-level analysis of the serum antibody repertoire. *Current Opinion in Immunology*, 35, 89-97. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2015.06.009>

Wolf, A., Prüfer, T. L., Schoneberg, C., Campe, A., Runge, M., Ganter, M., Bauer, B. U. (2020).

Prevalence of *Coxiella burnetii* in German sheep flocks and evaluation of a novel approach to detect an infection via preputial swabs at herd-level. *Epidemiol. Infect.* 148, e75.

<https://doi.org/10.1017/S0950268820000679>

Zanet, S., Sposimo, P., Trisciuglio, A., Giannini, F., Strumia, F., & Ferroglio, E. (2014). Epidemiology

of *Leishmania infantum*, *Toxoplasma gondii*, and *Neospora caninum* in *Rattus rattus* in absence of domestic reservoir and definitive hosts. *Veterinary Parasitology*, 199(3-4), 247-249.

<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2013.10.023>