



Facultad de Veterinaria
Universidad Zaragoza



Trabajo Fin de Grado en Veterinaria

Análisis serológico de *Leishmania infantum* en caballos en España

Serological analysis of *Leishmania infantum* in horses in Spain

Autor/es

Ana Moreno Rueda

Director/es

Antonio Fernández Casasnovas

Sergio Villanueva Saz

Facultad de Veterinaria

2024 - 2025

Índice

Resumen.....	2
Abstract	3
1. Introducción	4
1.1 Leishmaniosis.....	4
1.2 <i>Leishmania infantum</i>	5
1.3 Leishmaniosis equina.....	7
1.3.1 Manifestaciones clínicas.....	8
1.3.2 Diagnóstico	9
2. Justificación y objetivos.....	11
3. Metodología	12
3.1 Búsqueda de información.....	12
3.2 Zona de estudio y muestras a analizar.....	12
3.3 Análisis de muestras mediante ELISA	13
3.4 Análisis estadístico	14
4. Resultados y discusión.....	15
Conclusiones	20
Conclusions	21
Valoración personal.....	22
Bibliografía	23

Resumen

La leishmaniosis es una enfermedad parasitaria y zoonótica causada por *Leishmania infantum*, endémica en España y transmitida por flebótomos, que afecta principalmente a perros, pero también a otras especies domésticas como los équidos. Su estudio en caballos resulta de interés por su posible papel como hospedadores secundarios.

El presente trabajo tiene como objetivo determinar la seroprevalencia de *L. infantum* en équidos en España y analizar posibles factores de riesgo asociados. Para ello, se desarrolló un estudio experimental basado en la detección de anticuerpos mediante la técnica ELISA en muestras de suero, complementado con una revisión bibliográfica sobre la infección en équidos. Se analizaron un total de 508 muestras de caballos, ponis y burros procedentes de diferentes regiones de España y del sur de Francia, registrando datos de edad, sexo, raza y localización.

Los resultados mostraron una prevalencia del 2,56 %, con 13 animales seropositivos. La mayoría eran adultos y hembras, aunque estas diferencias no fueron estadísticamente significativas. Un 30 % de los positivos correspondieron a équidos de Francia, todos ellos de la raza French Trotter, lo que sugiere un posible efecto combinado de la localización geográfica y la predisposición racial. Aunque la prevalencia es baja, se confirma la circulación de *L. infantum* en équidos de la zona estudiada. Estos hallazgos coinciden con lo descrito por otros autores, que destacan prevalencias variables según región, raza y condiciones ambientales. La mayoría de los animales positivos no presentaban signos clínicos, lo que apoya la hipótesis de que los équidos podrían actuar como reservorios silenciosos. Por este motivo es necesario mantener la vigilancia epidemiológica, especialmente en zonas endémicas.

Abstract

Leishmaniosis is a parasitic and zoonotic disease caused by *Leishmania infantum*, endemic in Spain and transmitted by sandflies, which mainly affects dogs but can also infect other domestic species such as equids. Its study in horses is of interest due to their potential role as secondary hosts.

The aim of the present study is to determine the seroprevalence of *L. infantum* in equids in Spain and to analyse possible associated risk factors. For this purpose, an experimental study was carried out based on the detection of antibodies using the ELISA technique in serum samples, complemented by a literature review on infection in equids. A total of 508 samples from horses, ponies, and donkeys originating from different regions of Spain and southern France were analysed, with records of age, sex, breed, and location.

The results showed a prevalence of 2.56%, with 13 seropositive animals. Most were adults and females, although these differences were not statistically significant. Thirty percent of the positive cases corresponded to equids from France, all of them of the French Trotter breed, suggesting a possible combined effect of geographical location and breed predisposition. Although prevalence is low, the circulation of *L. infantum* in equids from the studied area was confirmed. These findings are consistent with previous reports describing variable prevalences depending on region, breed, and environmental conditions. Most of the seropositive animals did not present clinical signs, supporting the hypothesis that equids could act as silent reservoirs. For this reason, epidemiological surveillance should be maintained, especially in endemic areas.

1. Introducción

La leishmaniosis es una enfermedad parasitaria que afecta tanto a personas como a animales y que, debido a su distribución mundial y a su situación epidemiológica han sido múltiples los estudios realizados sobre esta.

En este proyecto se analiza de forma general la leishmaniosis y, de manera más específica, el parásito *Leishmania infantum* y la forma en que puede afectar a los équidos, además de otros aspectos importantes.

1.1 Leishmaniosis

La leishmaniosis es una enfermedad transmitida por vectores, causada por protozoos intracelulares obligados del género *Leishmania* (CDC, 2024). Es un protozoo flagelado perteneciente al orden *Kinetoplastida* y a la familia *Trypanosomatidae*. Son especies heteroxenas, lo que significa que pueden colonizar dos hospedadores. Viven en los fagocitos del sistema retículo-endotelial de los mamíferos y en el tracto intestinal de los flebótomos (Akhoundi et al., 2016). Más de 20 especies de este parásito, capaces de infectar al ser humano, se transmiten mediante la picadura de flebótomos hembra infectados (OMS, 2024). Entre ellas se incluyen el complejo *L. donovani*, con tres especies (*L. donovani*, *L. infantum* y *L. chagasi*); el complejo *L. mexicana*, con tres especies principales (*L. mexicana*, *L. amazonensis* y *L. venezuelensis*); así como *L. tropica*, *L. major*, *L. aethiopica* y varias especies del subgénero *Viannia* (*L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) panamensis* y *L. (V.) peruviana*) (CDC, 2024).

La transmisión vectorial de la leishmaniosis a los seres humanos puede ser de tipo antroponótica (de humano a humano) o zoonótica (desde un reservorio vertebrado no humano hacia las personas) (Cardoso et al., 2021). Esta enfermedad es prevalente en países tropicales y subtropicales de todo el mundo (Cardoso et al., 2021). Hoy en día, más de 1000 millones de personas viven en zonas endémicas, es decir, en aquellos lugares donde la enfermedad está constantemente presente, y corren el riesgo de infectarse (OMS, 2024). Según la Organización Mundial de la Salud, España es un país endémico de leishmaniosis.

Al ser considerada una enfermedad emergente de categoría 1 y no controlada, se clasifica como una patología gravemente desatendida (Cardoso et al., 2021). Se reconocen tres formas clínicas principales: la leishmaniosis visceral (VL), cutánea (CL) y mucocutánea (MCL). Siendo la cutánea la más común y la visceral la más grave. Se estima que cada año se producen 30 000 nuevos casos de LV y más de un millón de nuevos casos de LC (OMS, 2024).

1.2 *Leishmania infantum*

De las 31 especies de *Leishmania* que infectan a humanos y animales en todo el mundo, *Leishmania infantum* es la única especie autóctona en Europa (Maia et al., 2023) y constituye el principal agente causal de la leishmaniosis humana y canina en la cuenca mediterránea, siendo el patógeno transmitido por flebótomos más importante de la zona (Durán-Martínez et al., 2013).

La transmisión de *Leishmania* se produce a través de la picadura de flebótomos hembra infectados, que inoculan promastigotes en la piel del hospedador durante la ingesta de sangre (CDC, 2024). Durante este proceso, los flebótomos depositan saliva con actividad farmacológica y liberan glicoconjugados producidos por el parásito, ambos capaces de modular la respuesta inmune del hospedador y de aumentar la gravedad de la infección (Maia et al., 2011). Los promastigotes son fagocitados por macrófagos y otras células mononucleares, donde se transforman en amastigotes intracelulares. Estos se multiplican por fisión binaria y se diseminan infectando nuevas células fagocíticas, originando la infección tisular que puede derivar en formas cutáneas o viscerales, dependiendo de factores del parásito y del hospedador. Finalmente, el vector se infecta al ingerir células parasitadas, y una vez en su intestino, los amastigotes se diferencian de nuevo en promastigotes, los cuales se multiplican y migran hacia la probóscide, quedando listos para iniciar un nuevo ciclo de transmisión (CDC, 2024).

En España hay dos especies de flebótomos, *Phlebotomus perniciosus* y *Phlebotomus ariasi*, que han demostrado ser vectores competentes para transmitir *L. infantum*. El más abundante, *P. perniciosus*, se encuentra ampliamente distribuido por la mayoría de las zonas áridas de la península y archipiélago Balear, mientras que *P. ariasi* está ligado a ambientes más frescos y húmedos de la península (Suárez et al., 2012).

La transmisión del parásito no depende únicamente del vector, sino también de la existencia de hospedadores que actúen como reservorios. Los perros constituyen el principal reservorio doméstico de *L. infantum* y la especie hospedadora más susceptible (Maia et al., 2023). Sin embargo, existen diferencias significativas en la distribución de la seroprevalencia según las zonas bioclimáticas. En el norte de España, la seroprevalencia es menor en comparación con el resto de la Península Ibérica. No obstante, la provincia gallega de Ourense presenta unas condiciones climáticas altamente favorables para la presencia y expansión de *L. infantum* (Gálvez et al., 2020). En la Figura 1 se muestra la distribución de la seroprevalencia de la infección canina por *L. infantum* en España.

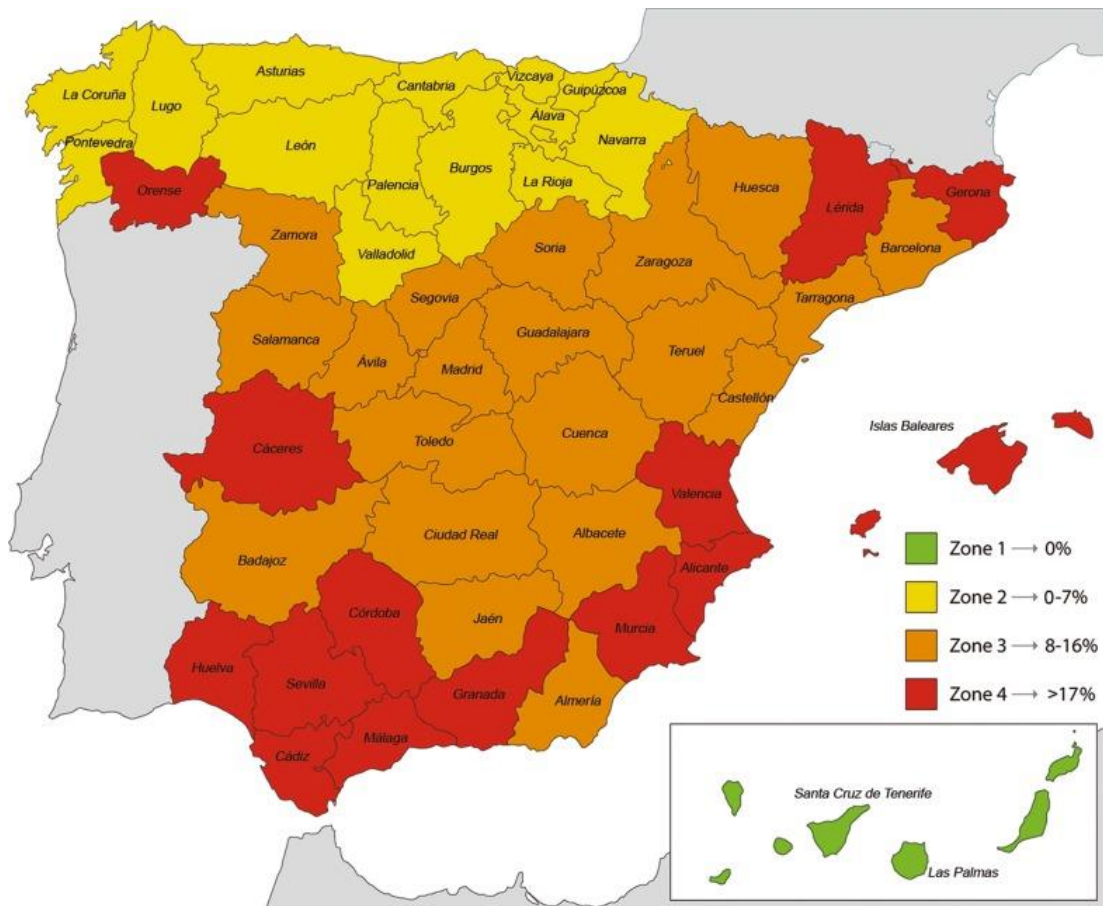


Figura 1: Mapa de seroprevalencia de leishmaniosis canina por *L. infantum* en España (Gálvez et al., 2020). Leyenda: Zona 1 (no endémica, bajo riesgo), Zona 2 (hipoendémica, bajo riesgo), Zona 3 (endémica, riesgo intermedio-alto), Zona 4 (hiperendémica, alto riesgo)

Además de los perros, existe un número creciente de estudios que indican la infección por *Leishmania spp.* en otros animales domésticos y silvestres (Cardoso et al., 2021). Mientras que los humanos se consideran un hospedador accidental (Maia et al., 2023). Los gatos se infectan por la misma especie de *Leishmania* que los perros, y los principales hallazgos en la exploración física también son las lesiones cutáneas o mucocutáneas. Sin embargo, la prevalencia de la infección es menor y los casos clínicos se reportan con menor frecuencia (Pennisi y Persichetti, 2018). Otra de las especies no habituales de leishmaniosis clínica son los équidos. La infección se ha detectado en España, Portugal, Alemania, Italia y Grecia, presentándose únicamente en su forma cutánea, con seroprevalencias que varían entre el 0,3 % y el 14 % (Tsakmakidis et al., 2024). En el siguiente apartado se profundiza en la leishmaniosis equina, abordando su epidemiología, manifestaciones clínicas y su posible papel como hospedador.

Respecto a los rumiantes, en Europa, se notificaron casos en ovejas y cabras en España, con una seroprevalencia del 13,9 % y el 10,2 %, respectivamente (Tsakmakidis et al., 2024). En la familia

Bovidae, en 2009 se detectó una vaca suiza que presentaba múltiples lesiones cutáneas ulcerativas y resultó ser seropositiva a *Leishmania spp.* (Cardoso et al., 2021).

En cuanto a la fauna silvestre, el zorro rojo es el carnívoro silvestre más estudiado en Europa. En España se ha detectado infección por *Leishmania spp.* con seroprevalencias de hasta 60%, destacando su potencial papel como hospedador silvestre (Tsakmakidis et al., 2024). Además de los ya mencionados anteriormente, en el artículo de Cardoso et al. (2021) se describen otros grupos animales identificadas como hospedadores de *Leishmania spp.* en Europa, entre ellos lagomorfos, mustélidos y otros pequeños mamíferos como roedores o erizos. Aunque la información es limitada, podrían desempeñar un papel en la epidemiología de la leishmaniosis.

1.3 Leishmaniosis equina

Los équidos han estado estrechamente relacionados con los humanos desde su domesticación hace 5.000–6.000 años, lo que ha favorecido su papel en la transmisión de patógenos zoonóticos (Barbero-Moyano et al., 2025). La infección por parásitos *Leishmania* en équidos fue descrita por primera vez en 1927, aunque desde entonces ha recibido menos atención que en otros hospedadores de *Leishmania*, debido al bajo número de casos de leishmaniosis cutánea identificados en todo el mundo, el cuadro clínico leve y la evolución benigna de las lesiones cutáneas (Mhadhbi y Sassi, 2020). No obstante, las manadas de équidos ofrecen un hábitat adecuado para los flebótomos, favoreciendo su abundancia local y, en consecuencia, la circulación de *Leishmania spp.* en áreas endémicas (Barbero-Moyano et al., 2025). Además, contribuyen indirectamente al ciclo del vector, ya que no solo constituyen una fuente de alimento para los flebótomos adultos, sino que sus heces son una fuente de alimento para el desarrollo de las larvas (Martínez-Saez et al., 2023).

La mayoría de los datos sobre la leishmaniosis equina se han registrado en América del Sur y América Central, donde el principal agente etiológico ha sido *L. braziliensis* o *L. infantum* (Martínez-Saez et al., 2023). En Europa, diversos estudios han confirmado la presencia de leishmaniosis equina tanto en países endémicos, como Italia, España y Portugal, como en países no endémicos, entre ellos Alemania y Suiza. Según Pala et al. (2024), los estudios realizados hasta la fecha han descrito una prevalencia seropositiva en équidos aparentemente sanos que oscilan entre el 0,3 % en Grecia y el 36,7 % en Italia.

Además de la distribución geográfica y las prevalencias observadas, es relevante conocer los factores ambientales que influyen en la transmisión de *L. infantum* en équidos. Un estudio realizado en Italia en 2023 identificó diversos factores, entre los que se encuentran la raza equina, el tipo morfológico, la vida al aire libre, el uso y la estación del año (Martínez-Saez et al.,

2023). Además de otros factores climáticos como la temperatura y la humedad son determinantes, debido a que los flebótomos presentan mayor densidad y actividad en regiones cálidas y húmedas, mientras que las bajas temperaturas limitan su supervivencia y reproducción (Gálvez et al., 2020). La altitud y la vegetación local también influyen en la distribución de los vectores, favoreciendo su presencia en zonas con cobertura vegetal y suelos adecuados para el desarrollo de larvas (Pala et al., 2024). Estos hallazgos destacan la necesidad de crear programas de vigilancia específicos en équidos.

1.3.1 Manifestaciones clínicas

Los síntomas de la leishmaniosis equina son menos graves que en otros hospedadores y no constituye una enfermedad potencialmente mortal. Independientemente de la localización geográfica y de la especie infectante, los casos descritos presentaron síntomas externos comunes. Los équidos desarrollaron pápulas o nódulos únicos o múltiples, en las zonas donde se alimentan habitualmente los flebótomos, es decir, ojos, hocico, cuello, pabellones auriculares, escroto y extremidades. Hasta la fecha no se han descrito lesiones viscerales (Mhadhbi y Sassi, 2020).

Los primeros casos de leishmaniosis cutánea equina (LC) en España fueron descritos por Solano-Gallego et al., (2003) quienes identificaron tres casos en caballos (un macho y dos hembras; de raza andaluza o mestiza; con edades comprendidas entre los 3 y los 10 años); los animales no presentaban ningún signo externo aparte de lesiones cutáneas consistentes en varias pápulas o nódulos ulcerados localizados en la cabeza, las regiones axilares e inguinales. El diámetro de las lesiones oscilaba entre 5 y 20 mm (Mhadhbi & Sassi, 2020). Se realizaron biopsias de las lesiones en los tres caballos y la histopatología reveló dermatitis granulomatosa nodular a difusa, con células gigantes multinucleadas dispersas y un infiltrado intenso de linfocitos, principalmente en la periferia. La mayoría de los macrófagos contenían amastigotes en su citoplasma, confirmando la infección por *Leishmania* (Solano-Gallego et al., 2003).

Las características clínicas e histopatológicas de los casos de leishmaniosis cutánea equina en España son las mismas que las descritas por otros autores en caballos de Sudamérica y Centroamérica y, en cierta medida, son similares a las descritas en la leishmaniosis cutánea humana en la cuenca mediterránea (Solano-Gallego et al., 2003).

Ortega-García et al. (2021) realizaron un estudio sobre cinco casos de LC equina diagnosticados entre 2009 y 2016 en Costa Rica. Los animales, de entre 2 y 4 años y de distintas razas, presentaban lesiones ulceradas o nodulares persistentes, localizadas principalmente en pabellones auriculares y cuello (Figura 2), aunque también en axilas e ingles. Tanto el examen

histopatológico, como la inmunohistoquímica confirmaron la presencia de *Leishmania spp.*, aunque las pruebas moleculares (qPCR) no lograron identificar la especie. Estos hallazgos refuerzan la importancia de considerar la leishmaniosis como causa de lesiones cutáneas crónicas en caballos en áreas endémicas (Ortega-García et al., 2021).



Figura 2: Lesiones cutáneas de cuatro de los casos estudiados en Costa Rica (Ortega-García et al., 2021)

A pesar de que los signos cutáneos son la forma típica de esta enfermedad en los équidos, en Europa se ha registrado una manifestación menos común: la lesión ocular. Según Riera et al., (2023), hasta ahora no se habían descrito lesiones oculares secundarias a la infección por *Leishmania* en un caballo. En su estudio se reportó el caso de un semental Pura Raza Española de 1 año y 8 meses residente en Mallorca (zona endémica), que presentó una opacidad rosada en la córnea derecha. Ante la falta de respuesta a los esteroides administrados inicialmente, se realizó una citología corneal la cual evidenció amastigotes de *Leishmania*, confirmando queratitis secundaria a la infección. Se optó por un tratamiento tópico con antimonio de meglumina durante seis semanas. A los diez días mostró mejoría, con reducción progresiva y formación de un área fibrótica residual. Pasados dos años, el animal estaba estable y sin signos oculares adicionales. Es muy probable que la lesión que presentaba este caballo sea consecuencia de una reacción inflamatoria local y su eficaz respuesta inmunitaria sea responsable de la contención local de la infección (Riera et al., 2023).

Aunque la leishmaniosis equina sigue siendo una enfermedad poco frecuente, por todo lo desarrollado anteriormente debería incluirse en el diagnóstico diferencial de las dermatosis papulonodulares de los equinos (Solano-Gallego, y otros, 2003).

1.3.2 Diagnóstico

Existen varios métodos de diagnóstico para la leishmaniosis. En los casos comentados anteriormente el diagnóstico se basó principalmente en la identificación directa del parásito en las lesiones, mediante citología e histopatología, permiten observar los amastigotes de *Leishmania*. En otros estudios se han utilizado varios métodos diagnósticos para confirmar la presencia del parásito. Un análisis retrospectivo en una población equina expuesta mostró que

la citología y la histología pueden ser insuficientes por la baja carga parasitaria, por lo que sería necesario recurrir a la inmunohistoquímica para detectar antígenos del parásito (Gazzonis et al., 2022).

Otro método que ha demostrado una alta sensibilidad es la qPCR en tiempo real, la cual puede detectar menos de 0,02 amastigotes por microgramo de tejido (Müller et al., 2015). También se puede identificar ADN de *L. infantum* en caballos aparentemente sanos utilizando la PCR en muestras sanguíneas, lo que indicaría una infección subclínica (Leonel et al., 2021). Además de las técnicas moleculares, algunos estudios han utilizado métodos serológicos con el fin de detectar anticuerpos frente a Leishmania, tanto en animales asintomáticos como con lesiones.

2. Justificación y objetivos

La leishmaniosis es una enfermedad zoonótica, causada por *Leishmania infantum*, que posee gran relevancia debido a su impacto tanto en salud pública como en medicina veterinaria. A nivel mundial, esta zoonosis es endémica en 99 países y causa alrededor de 1 millón de casos humanos y 30.000 muertes al año (OMS, 2024). España es uno de los países incluidos en la lista, ya que las temperaturas y la elevada humedad ambiental en ciertas zonas favorecen la supervivencia de los flebótomos, vectores responsables de transmitir la enfermedad.

En Europa, es *L. infantum* la única especie endémica que circula y el perro (*Canis lupus familiaris*) el principal reservorio natural en el ciclo doméstico (Barbero-Moyano et al., 2025). Sin embargo, diversos artículos han publicado que la leishmaniosis no se limita al perro, sino que también afecta a otras especies de mamíferos y aves. Los caballos, debido a su estrecho contacto con los seres humanos y a su capacidad para controlar la infección, podrían actuar como reservorios silenciosos. No obstante, los datos relacionados con la prevalencia de la infección por *Leishmania spp.* en esta especie son escasos, especialmente en Europa (Martínez-Sáez et al., 2023)

El presente trabajo busca aportar información adicional sobre la seroprevalencia de *L. infantum* en équidos en España, con el objetivo de ampliar la base científica disponible. Además, los resultados obtenidos pueden contribuir a establecer medidas orientadas a reducir la incidencia de la enfermedad en zonas endémicas.

En definitiva, se busca alcanzar los siguientes objetivos:

1. Evaluar la seroprevalencia de *Leishmania infantum* en équidos en España.
2. Conocer la proporción de équidos seropositivos mediante la técnica diagnóstica ELISA.
3. Identificar los posibles factores de riesgo asociados a la infección por *L. infantum*.
4. Discutir el posible papel de los equinos como hospedadores secundarios en la transmisión de *L. infantum*
5. Aportar información adicional que permita ampliar la limitada información epidemiológica sobre *L. infantum* en caballos.

3. Metodología

Este proyecto se basa en un estudio de tipo experimental, que se combina con una revisión bibliográfica. Consiste en realizar un análisis serológico de muestras sanguíneas de diferentes équidos y, posteriormente recopilar y contrastar artículos científicos con el objetivo de aportar más información sobre la seroprevalencia de *L. infantum* en España.

3.1 Búsqueda de información

Para llevar a cabo la revisión bibliográfica se consultaron diferentes artículos científicos procedentes de bases de datos de calidad, como son PubMed, ScienceDirect y Google Scholar. Se seleccionaron los de mayor interés a través de la búsqueda de palabras clave como “*Leishmania infantum*”, “equine leishmaniasis”, “équidos” y “seroprevalencia en caballos”.

3.2 Zona de estudio y muestras a analizar

En cuanto a la parte experimental del proyecto, se realizó con muestras de suero residuales, es decir, muestras obtenidas de otros procedimientos diagnósticos previos, por lo que no fueron obtenidas específicamente para este estudio y no requirieron autorización adicional para su uso en investigación. Se analizaron un total de 508 muestras de suero de équidos (principalmente caballos, pero también de burros y ponis) procedentes de toda España. Predominaron las comunidades autónomas de Andalucía, Aragón y Cataluña, pero con bastante presencia de otras como Asturias, Cantabria, Castilla la Mancha, Extremadura, Galicia, Madrid y Valencia. Además, se incluyó un pequeño número de muestras procedentes del sur de Francia, ya que tienen un clima muy similar al de España.

Los animales pertenecían principalmente a centros ecuestres y explotaciones privadas, reuniendo individuos de todo tipo de raza, sexo y edad. En el estudio se han contemplado muestras desde el año 2013 hasta el actual, todas obtenidas por veterinarios que las han recogido, conservado y enviado en las condiciones de refrigeración y una vez en el laboratorio, se congelaron a -20°C hasta su análisis.

Para tener todos los datos de forma organizada y con el fin de realizar el estudio estadístico, se registraron en una hoja de cálculo de Excel. Se ordenó toda la información en distintas variables, tales como, denominación interna (persona que envía la muestra), identificación del tubo de suero, sexo, edad, raza, fecha de extracción y localización.

3.3 Análisis de muestras mediante ELISA

En el laboratorio, se identificaron individualmente todos los tubos Eppendorf de suero que al mismo tiempo se fueron colocando en una gradilla de plástico, siguiendo un orden y transcribiendo los datos de cada muestra a un papel con la distribución exacta dentro de la placa, con el objetivo de mantener la trazabilidad. Cada placa tiene 12 columnas y 8 filas, haciendo un total de 96 pocillos, de los cuales 2 se utilizan como control positivo y negativo. Como control positivo se incluyó una muestra de un paciente que había sido obtenida previamente, el cual presentaba signos cutáneos y que había sido diagnosticado por histopatología. Con relación al control negativo, se incluyó un caballo clasificado como aparentemente sano y que procedía de Polonia, país que se considera como no endémico para la infección por *L. infantum*.

La técnica diagnóstica realizada en este estudio es un ELISA, un ensayo de inmunoadsorción ligado a enzima. Concretamente un ELISA de tipo indirecto, el cual mide los anticuerpos formados, en este caso, frente a *L. infantum*. De manera resumida, el procedimiento consiste en:

- Preparar una dilución 1/100 de las muestras con tampón fosfato salino (PBS)
- Depositar la dilución en los pocillos de la placa de ELISA que previamente fueron cubiertas con antígeno de *L. infantum*.
- Incubar la placa en una cámara húmeda a 37°C durante una hora. De esta forma, en caso de estar presente, se produce la unión de los anticuerpos al antígeno fijado.
- Una vez finalizada la incubación, se realizan tres lavados con PBS, para retirar restos de suero que no se han unido.
- Añadir 100 µl de conjugado (anticuerpo marcado con una enzima) en dilución 1/10000, el cual se une a los anticuerpos de la muestra si se ha producido la unión antígeno-anticuerpo.
- Incubar la placa nuevamente a 37°C durante una hora, y repetir los lavados al terminar.
- Adicionar 100 µl de revelador a cada pocillo. El revelador es un sustrato que reaccionará con el conjugado y generará un color dependiendo de la concentración de anticuerpos de la muestra.
- Detener la reacción añadiendo 100 µl de solución de parada en cada pocillo.
- Leer los valores de absorbancia a 492 nm en un lector de ELISA.

Para interpretar los valores obtenidos del ELISA, era necesario establecer un valor de referencia. Para ello, se analizaron un total de cincuenta muestras de suero de équidos procedentes de Polonia (zona no endémica), y a partir de esos datos se calculó el punto de corte.. El punto de

corte establecido fue 0,55 y por lo tanto todo resultado igual o superior a este será una muestra seropositiva a *L. infantum*.

Finalmente, se actualizaron los datos en el documento Excel, añadiendo el valor de cada muestra obtenido en el ELISA y su correspondencia con el resultado positivo o negativo. Dicho documento facilitó la posterior realización de un análisis estadístico para conocer si existía una relación entre seropositividad y los diferentes factores valorados.

3.4 Análisis estadístico

El análisis estadístico para este estudio se realizó con el software SPSS v. 29 (IBM, Chicago, EE.UU.). Los datos se identificaron como variables cualitativas o cuantitativas. Para comprobar si la densidad óptica (DO) de las pruebas ELISA seguían una distribución normal, se realizó un test de Kolmorov-Smirnov. Además, se realizó una t de Student para detectar si había diferencias estadísticamente significativas entre la DO de machos o de hembras. Con las variables cualitativas se hizo un análisis de Chi cuadrado: en las tablas de 2x2 (macho y hembra; adultos y potros) se calculó el Fisher's Exact P-Value y en las tablas con más elementos el Chi Square P-Value. Un valor de $P < 0,05$ se consideró estadísticamente significativo.

4. Resultados y discusión

Para la realización de este estudio se analizaron un total de 508 équidos, de los cuales 481 eran caballos, 23 ponis y 4 burros. Sin embargo, no fue posible recoger toda la información de los 508 équidos. No se dispuso de algunos datos como edad, sexo o raza de ciertos animales, por lo que según la variable estudiada la muestra se reduce significativamente. En relación con el sexo, se registraron 168 machos (33,1%) y 153 hembras (30,1%), mientras que de 187 animales (36,8%) se desconocía el dato. Respecto a la edad, la población estudiada incluía animales de todas las edades, desde los 6 meses hasta los 30 años. Clasificándolos en adultos (>5 años) y potros (<5 años) se disponía de un total de 180 (54%) y 152 (46%) respectivamente. La toma de muestras se realizó principalmente entre 2024 y 2025, aunque también se incluyeron sueros procedentes de otros estudios realizados desde 2013 hasta la actualidad. La mayoría eran de animales ubicados en distintas provincias de España, destacando por número de muestras Zaragoza (124/335), Madrid (43/335), Gerona (35/335), Málaga (29/335), Asturias (23/335) y Teruel (13/335); seguidas de Tarragona, Cantabria, Castellón, Valencia, Sevilla, Córdoba, Almería, Cádiz y Granada, con menos de 13 muestras enviadas. Además, 25 del total procedían de caballos del sur de Francia (Toulouse). Otro factor estudiado fue la raza, contando con un total de 218 animales de varias razas, con mayoría de Pura Raza Española (PRE), Pura Raza Árabe, Caballo de Deporte Español (CDE), Anglo-árabes y cruzados.

Tras caracterizar la población del estudio se analizaron los resultados serológicos obtenidos. Del total de muestras se detectaron 13 positivos, mientras que 495 fueron seronegativos, lo que indica una prevalencia del 2,56 %. En la tabla 1 se muestran dichos datos de forma resumida.

Tabla 1: Número de animales positivos y negativos y prevalencia serológica global

	N (número de animales)	% (Prevalencia)
Positivos	13	2,559
Negativos	495	97,441
Total	508	100

Con el cálculo de la prevalencia se puede deducir que existen anticuerpos anti-*Leishmania* en este muestreo, por lo tanto, se ha detectado la infección por *Leishmania infantum* en ciertos animales que forman el estudio. Con el fin de conocer de forma más detallada las características de los individuos seropositivos, se recogieron el máximo de datos posibles sobre su sexo, edad,

raza, fecha de extracción de la muestra y procedencia. En la tabla 2 se observan los datos obtenidos sobre dichos animales.

Tabla 2: Datos de los animales seropositivos a *Leishmania infantum*

Sexo	Edad (años)	Raza	Fecha	Localización	Valor (ELISA)
HEMBRA	8		24/07/2024	ZARAGOZA	0,5904
HEMBRA	>5		19/08/2016	MADRID-GUADALAJARA	0,8116
HEMBRA	4	FRENCH TROTTER	13/03/2025	FRANCIA	0,7817
HEMBRA	4	FRENCH TROTTER	13/03/2025	FRANCIA	0,6313
HEMBRA	5	FRENCH TROTTER	13/03/2025	FRANCIA	0,5806
HEMBRA	6	FRENCH TROTTER	13/03/2025	FRANCIA	0,871
HEMBRA			06/11/2014		0,5566
HEMBRA	10	PURA RAZA ÁRABE	31/10/2023	ASTURIAS	0,5589
MACHO	5	PURA RAZA ÁRABE	28/12/2023	ASTURIAS	0,8184
MACHO	14	ANGLOÁRABE	01/05/2024	TERUEL	0,6084
MACHO	>5	CRUZADO	25/12/2023	ZARAGOZA	0,5788
			19/08/2016		0,6188
	10	CRUZADO	24/04/2025	MÁLAGA	0,777

Todos estos animales presentaron un valor en la prueba ELISA igual o superior a 0,55, establecido como punto de corte para considerar la seropositividad. La mayoría correspondieron a hembras y principalmente a animales adultos, destacando que el 30 % fueron equinos procedentes de Francia. En cuanto a la distribución racial, es heterogénea en la región española, sin embargo, todos los seropositivos franceses pertenecían a la raza French Trotter. Estos hallazgos pueden sugerir que la infección puede estar influenciada por la zona donde habite el animal y además, por esta raza.

Una vez descritos todos los resultados, se analizó la prevalencia global y los posibles factores relacionados con la seropositividad, tales como la edad, el sexo, la localización geográfica y la raza. A continuación, se valoran los hallazgos obtenidos en cada una de estas variables comparándolos con otros estudios epidemiológicos ya publicados. No obstante, las comparaciones entre estos estudios deben realizarse con cautela debido a las diferencias en los diseños de los estudios, el tamaño de las muestras, los métodos serológicos o los diferentes contextos epidemiológicos evaluados (Barbero-Moyano et al., 2025).

En este estudio se obtuvo una prevalencia del 2,56%, un valor muy inferior al descrito en otras investigaciones. Por ejemplo, Martínez-Sáez et al. (2023), en un estudio realizado en caballos sanos de la región mediterránea de España, obtuvieron una prevalencia del 27,5% utilizando técnicas de ELISA y PCR en tiempo real. La diferencia de valores podría deberse a que este último

estudio se realizó con 167 muestras de caballos de Valencia, cuya zona es endémica de leishmaniosis y su clima y vegetación promueven la dispersión de los vectores de *Leishmania* (Martínez-Sáez et al., 2023). Además, influyen las técnicas utilizadas, mientras que ELISA es una técnica de diagnóstico indirecta que mide anticuerpos, la PCR en tiempo real es una técnica directa para detectar el ADN del parásito (Martínez-Saez et al., 2023). Por otro lado, Biral et al., 2021, encontraron en Brasil prevalencias aún más elevadas, del 43,31 % mediante ELISA y del 47,93 % con IFA, lo que afirma que en zonas tropicales el grado de exposición al parásito puede ser mucho mayor. Sin embargo, en la región centro-norte de Italia, Gazzonis et al., 2022, realizaron otro estudio en el que tuvieron prevalencias entre 6,4% y 13,9%. Son datos que siguen siendo superiores a los obtenidos en este muestreo pero inferiores a los recogidos en Brasil o Valencia. Con estas comparaciones se quiere mostrar que las diferencias observadas pueden deberse a factores como la técnica de diagnóstico empleada, la zona geográfica y su climatología, o simplemente al tamaño muestral.

A pesar de que la gran mayoría de los équidos incluidos en este estudio no presentaban signos clínicos compatibles con la leishmaniosis, se detectó un caso con lesiones típicas. Se trataba de una yegua cruzada de 10 años, perteneciente a un particular en la provincia de Málaga, que mostraba lesiones cutáneas localizadas en la región facial, alrededor del ojo derecho. Ya se han descrito otros casos similares en el que el principal signo clínico son las lesiones cutáneas, como por ejemplo el estudio realizado por Solano-Gallego et al. (2018). Por este motivo, se sugiere incluir la leishmaniosis en el diagnóstico diferencial de los nódulos que invaden la superficie ocular en caballos que viven en zonas endémicas (Riera et al., 2023).

En este proyecto, para los animales menores de 5 años (potros) la seroprevalencia fue del 3,95% y en los mayores de 5 años (adultos) fue de 2,22%. Este factor no es estadísticamente significativo ya que Fisher's Exact P-Value es de 0,5217. Respecto a la seroprevalencia entre machos y hembras, se obtuvieron resultados de 2,01% y 5,26% respectivamente, lo que tampoco es estadísticamente significativo (Fisher's Exact P-Value: 0,1989), aunque la cantidad de hembras positivas fue mayor. De acuerdo con Martínez-Sáez et al., (2023), la posible asociación del tipo de sexo con la infección por *Leishmania* es variable, mientras algunos autores encuentran una mayor prevalencia en machos, otros no encuentran diferencias relevantes. Respecto a la edad, en nuestro estudio no fue significativo, mientras que estos mismos autores mencionados anteriormente, en su estudio realizado en el este de España, observaron como la prevalencia es mayor en caballos adultos, principalmente en animales entre 13 y 21 años, posiblemente debido al grado de exposición al parásito a estas edades, mayor tiempo de exposición y mayor número de actividades al aire libre. Otros autores como Viol et al., 2012, encontraron sin embargo una

correlación entre la edad temprana y la alta prevalencia en otras especies como el perro (Martínez-Sáez et al., 2023).

En cuanto a la procedencia de los animales, en este estudio un 30 % de los positivos correspondieron a équidos procedentes del sur de Francia, lo que puede indicar una posible relación de la distribución geográfica y climática en la seroprevalencia de *L. infantum*. Algunas zonas de España o el sur de Francia tienen clima mediterráneo con veranos calurosos y secos e inviernos templados, el cual es favorable para el desarrollo de los flebótomos, principales vectores de la enfermedad. Este hallazgo podría explicar las diferencias observadas frente a otras regiones más húmedas. De acuerdo con un estudio realizado por Barbero-Moyano et al. (2025), en países como Reino Unido e Irlanda no detectaron la presencia de *L. infantum* en équidos, lo que sugiere una distribución heterogénea de la enfermedad en Europa, debido al clima oceánico de estos países, con inviernos frescos y abundantes precipitaciones (Barbero-Moyano et al., 2025). No obstante, la información disponible sobre los flebótomos en determinadas zonas de Europa sigue siendo limitada y, en consecuencia, resulta difícil realizar modelos epidemiológicos, predicciones de riesgo y medidas de control de la enfermedad (Durán-Martínez et al., 2013).

De las variables estudiadas, únicamente la raza mostró una asociación estadísticamente significativa. Entre los 9 animales positivos con raza conocida, 4 correspondían a French Trotter (44,4 %), mientras que el resto se distribuían entre distintas razas en menor proporción. Aunque este resultado también podría estar influenciado por la localización geográfica, ya que todos los animales de esta raza se encontraban en la misma zona. Otro factor que destacan algunos autores es la exposición a *L. infantum* en mulos y burros. Según Barbero-Moyano et al., (2025) encontraron una seroprevalencia en burros de 27,9%, identificando la especie como un factor de riesgo, ya que informes previos han demostrado que los flebótomos muestran un mayor interés por alimentarse de la sangre de los burros en comparación con otras especies domésticas (Barbero-Moyano et al., 2025). Esta seroprevalencia fue incluso más elevada en burros procedentes de Italia (36,7%) (Nardoni et al., 2019).

En este estudio se ha detectado una baja prevalencia, sin embargo, el estudio de Martínez-Saez et al. (2023), llegó a la conclusión de que los caballos con temperamento tranquilo y condiciones de vida al aire libre presentan una mayor prevalencia de infección, y el número de animales positivos aumenta en primavera, cuando la temperatura media es más alta. Estos resultados indican que los caballos podrían ser reservorios silenciosos del parásito y que el aumento de la temperatura debido al cambio climático probablemente incrementará las infecciones por *Leishmania* spp. en todas las especies, incluidos los humanos (Martínez-Saez et al., 2023).

Por último, Barbero-Moyano et al. (2025) concluyen que un porcentaje de los caballos que viven en zonas endémicas de *L. infantum* presentan respuestas inmunitarias humorales y celulares específicas, lo que sugiere que la exposición al parásito es habitual, incluso aunque los animales no desarrollen signos clínicos evidentes. Este hallazgo coincide con los resultados obtenidos en el presente estudio, donde la mayoría de los équidos positivos fueron asintomáticos, lo que sugiere que puedan actuar como reservorio silencioso.

Conclusiones

Con la realización de este estudio y los resultados obtenidos, se puede llegar a las siguientes conclusiones:

- 1) La técnica ELISA para detectar anticuerpos anti-Leishmania en caballos puede ser utilizada en estudios epidemiológicos de la infección por *L. infantum* en caballos.
- 2) La prevalencia serológica de *L. infantum* fue baja (2,56%) en comparación con otros estudios realizados en España o en la zona mediterránea.
- 3) La mayoría de los équidos seropositivos eran asintomáticos, exceptuando un caso que presentó lesiones cutáneas.
- 4) En animales con presencia de signos clínicos cutáneos compatibles, la leishmaniosis debería incluirse en la lista de diagnósticos diferenciales de lesiones de tipo nodular en la piel.

Conclusions

Based on the development of this study and the results obtained, the following conclusions can be drawn:

- 1) The ELISA technique for detecting anti-Leishmania antibodies in horses can be used in epidemiological studies of *L. infantum* infection in equids.
- 2) The serological prevalence of *L. infantum* was low (2,56%) compared to other studies conducted in Spain or in the Mediterranean area.
- 3) Most of the seropositive equids were asymptomatic, except for one case that presented cutaneous lesions.
- 4) In animals showing compatible cutaneous clinical signs, leishmaniosis should be included in the list of differential diagnoses for nodular-type skin lesions.

Valoración personal

La realización de este trabajo me ha permitido profundizar en el conocimiento de la epidemiología de *Leishmania infantum* en équidos y en los factores que pueden influir en su transmisión, valorando la importancia de esta infección como zoonosis. Además, he adquirido experiencia en la interpretación y análisis de resultados serológicos.

Respecto a la metodología, este Trabajo Fin de Grado me ha ayudado a saber buscar y seleccionar artículos científicos relacionados con el tema. Además de practicar el inglés técnico de veterinaria, ya que todos ellos están redactados en dicho idioma. Por otro lado, he podido conocer de primera mano el funcionamiento de un laboratorio y realizar yo misma la técnica de diagnóstico ELISA, siguiendo cada uno de sus pasos, lo que me ha permitido mejorar mis conocimientos prácticos.

Por último, la elaboración de este proyecto me ha ayudado a trabajar la forma de redactar un documento científico y conocer su estructuración, lo que considero que será muy útil en mi futuro. En general, ha sido una experiencia enriquecedora que me ha permitido incorporar nuevos conocimientos teóricos y habilidades prácticas.

Para acabar, expresar mi agradecimiento a mis tutores Sergio Villanueva Saz y Antonio Fernández Casanovas, por su infinita paciencia y ayuda para realizar este trabajo. A toda mi familia, en especial a mis padres, por darme la oportunidad de irme a estudiar fuera de casa y apoyarme en todo momento a perseguir mi sueño. Y, por último, a mis amigas que han hecho este camino más fácil y memorable.

Bibliografía

- 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. *Plos Neglected Tropical Diseases*. Obtenido de <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004349>
- Barbero-Moyano, J., Cano-Terriza, D., González, M., Moreno, I., Jose-Cunilleras, E., & Buono, F. (2025). Serosurvey of Leishmania infantum in equids in different European countries. *Preventive Veterinary Medicine*, 238. Obtenido de <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2025.106463>
- Biral, N. V., Azevedo Santos, H., Alves Senne, N., Gonzaga Paulino, P., Araujo Camilo, T., de Souza Tassinari, W., . . . da Costa Angelo, I. (2021). A cross-sectional study of Leishmania spp. in draft horses from the Distrito Federal, Brazil: Seroprevalence, spatial distribution, and associated factors. *Preventive Veterinary Medicine* 195. Obtenido de <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2021.105467>
- Carbonara, M., Mendoza-Roldán, J., Bezerra-Santos, M., de Abreu Teles, P., Lia, R., Locantore, F., . . . Otranto, D. (2024). Leishmania spp. in equids and their potential vectors in endemic areas of canine leishmaniasis. *PLOS Neglected Tropical Diseases* 18 (7). Obtenido de <https://doi.org/10.1371/journal>.
- Cardoso, L., Schallig, H., Persichetti, M., & Pennisi, M. (2021). New Epidemiological Aspects of Animal Leishmaniosis in Europe: The Role of Vertebrate Hosts Other Than Dogs. *Pathogens* 10, 307, 44. Obtenido de <https://doi.org/10.3390/pathogens10030307>
- CDC. (5 de junio de 2024). *Leishmaniasis*. Recuperado el 16 de agosto de 2025, de Centers for Disease Control and Prevention-DPDx: <https://www.cdc.gov/dpdx/leishmaniasis/index.html>
- Durán-Martínez, M., Ferroglio, E., Acevedo, P., Trisciuglio, A., Zanet, S., Gortázar, C., & Ruiz-Fons, F. (2013). Leishmania infantum (Trypanosomatida: Trypanosomatidae) phlebotomine sand fly vectors in continental Mediterranean Spain. *PubMed*. Obtenido de <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24128871/>
- Fernández-Bellon, H., Solano-Gallego, L., Bardagí, M., Alberola, J., Ramis, A., & Ferrer, L. (2006). Immune response to Leishmania infantum in healthy horses in Spain. *Veterinary Parasitology* 135, 181–185. Obtenido de <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2005.09.007>

- Gálvez, R., Montoya, A., Cruz, I., Fernández, C., Martín, O., Checa, R., . . . Miró, G. (2020). Latest trends in *Leishmania infantum* infection in dogs in Spain, Part I: mapped seroprevalence and sand fly distributions. *Parasites Vectors* 13, 204. Obtenido de <https://doi.org/10.1186/s13071-020-04081-7>
- Gazzonis, A. L., Morganti, G., Porcellato, I., Roccabianca, P., Avallone, G., Gavaudan, S., . . . Veronesi, F. (2022). Detection of *Leishmania* spp. in Chronic Dermatitis: Retrospective Study in Exposed Horse Populations. *Pathogens* 11, 634. Obtenido de <https://doi.org/10.3390/pathogens11060634>
- Leonel, J. A., Tannihao, B., Arantes, J., Vioti, G., Benassi, J., Brandi, R., . . . Ferreira, T. (2021). Detection of *Leishmania infantum* DNA in blood samples of horses (*Equus caballus*) and donkeys (*Equus asinus*) by PCR. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, 63. Obtenido de <https://doi.org/10.1590/S1678-9946202163012>
- Maia, C., Conceição, C., Pereira, A., Rocha, R., Ortuño, M., Muñoz, C., . . . Berriatua, E. (2023). The estimated distribution of autochthonous leishmaniasis by *Leishmania infantum* in Europe in 2005–2020. *PLOS Neglected Tropical Diseases* 17(7): e0011497, 25. Obtenido de <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0011497>
- Maia, C., Seblova, V., Sadlova, J., Votycka, J., & Volf, P. (2011). Experimental Transmission of *Leishmania infantum* by Two Major Vectors: A Comparison between a Viscerotropic and a Dermotropic Strain. *Plos Neglected Tropical Diseases*. Obtenido de <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001181>
- Martínez-Saez, L., Dulac, Q., Montaner-Angoiti, E., Marín-García, P., & Llobat, L. (2023). Prevalence and Factors Related to *Leishmania infantum* Infection in Healthy Horses (*Equus caballus*) from Eastern Spain. *Animals* 2023, 13, 2889. Obtenido de <https://doi.org/10.3390/>
- Mhadhbi, M., & Sassi, A. (2020). Infection of the equine population by *Leishmania* parasites. *Equine Veterinary Journal* 52, 28-33. doi:DOI: 10.1111/evj.13178
- Müller, N., Hentrich, B., Frey, C., & Welle, M. (2015). Quantitative PCR for the diagnosis of cutaneous leishmaniasis from formalin-fixed and paraffin-embedded skin sections. *Molecular and cellular probes*, 29(6), 507-510. Obtenido de <https://doi.org/10.1016/j.mcp.2015.09.008>

- Nardoni, S. A. (2019). Serological and Molecular Findings of Leishmania Infection in Healthy Donkeys (*Equus asinus*) from a Canine Leishmaniosis Endemic Focus in Tuscany, Italy: A Preliminary Report. *Pathogens*, 8(3), 99. Obtenido de <https://doi.org/10.3390/pathogens8030099>
- OMS. (2024). *Leishmaniasis*. Recuperado el 18 de agosto de 2025, de Organización Mundial de la Salud: <https://www.who.int/data/gho/data/themes/topics/gho-ntd-leishmaniasis>
- OMS. (29 de octubre de 2024). *Leishmaniasis, cutaneous, status of endemicity*. Recuperado el 18 de agosto de 2025, de The Global Health Observatory - World Health Organization: <https://www.who.int/data/gho/data/indicators/indicator-details/GHO/status-of-endemicity-of-cutaneous-leishmaniasis>
- Ortega-García, M. V., Salguero, F., García, N., Domínguez, M., Moreno, I., & Berrocal, A. (2021). Equine infection with *Leishmania* spp. in Costa Rica: Study of five cases. *Vet Med Science*, 2234-2239. doi:DOI: 10.1002/vms3.587
- Pala, S., Martínez, L., Llobat, L., & Marín, P. J. (2024). Prevalence and factors associated with *Leishmania* spp. and *Toxoplasma gondii* infections in apparently healthy horses in Eastern Spain. *Veterinary Science* 171. doi:<https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2024.105236>
- Pennisi, M. G., & Persichetti, M. F. (2018). Feline leishmaniosis: Is the cat a small dog? *Veterinary Parasitology*, 251, 131-137. Obtenido de <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2018.01.012>
- Riera, M. M., Cardenas, M., Martínez-Sogues, L., & Ferrer, L. (2023). Unilateral keratitis secondary to *Leishmania* spp. infection in a horse: Clinical signs and successful topical therapy. *Veterinary Ophthalmology* 2024; 27, 86-89. doi:10.1111/vop.13134
- Solano-Gallego, L., Fernández-Bellón, H., Serra, P., Gállego, M., Ramis, A., Fondevila, D., & Ferrer, L. (2003). Cutaneous leishmaniosis in three horses in Spain. *Equine Veterinary Journal* 35, 320-323. Retrieved from <https://doi.org/10.2746/042516403776148336>
- Suárez, B., Isidoro, B., Santos, S., Sierra, M., Molina, R., Astray, J., & Amela, C. (2012). Situación epidemiológica y de los factores de riesgo de transmisión de *Leishmania infantum* en España. *Revista Española de salud pública*, 86, págs. 555-564. Obtenido de [chrome-extension://efaidnbmnnnibpcajpcglclefindmkaj/https://www.scielosp.org/pdf/resp/2012.v86n6/555-564/es](https://efaidnbmnnnibpcajpcglclefindmkaj/https://www.scielosp.org/pdf/resp/2012.v86n6/555-564/es)

Tsakmakidis, I., Lefkaditis, M., Zaralis, K., & Arsenos, G. (2024). Alternative hosts of *Leishmania infantum*: a neglected parasite in Europe. *Trop Anim Health Prod* 56, 128. Obtenido de <https://doi.org/10.1007/s11250-024-03978-0>

Viol, M. A. (2012). Detection of cross infections by *Leishmania* spp. and *Trypanosoma* spp. in dogs using indirect immunoenzyme assay, indirect fluorescent antibody test and polymerase chain reaction. *Parasitology research*, 111 (4), 1607-1613. Obtenido de <https://doi.org/10.1007/s00436-012-2999-2>