



Facultad de Veterinaria
Universidad Zaragoza



Trabajo Fin de Grado en Veterinaria

Estudio seroepidemiológico de leishmaniosis felina utilizando dos pruebas de referencia

Seroepidemiological study of feline leishmaniasis applying two reference tests

Autor

Andrés Yzuel Estévez

Directores

Dr. Sergio Villanueva Saz

Víctor Martín Santander

Facultad de Veterinaria

2019

Índice

Autor	0
1. Resumen.....	2
2. Abstract.....	2
3. Introducción	3
Leishmaniosis como enfermedad	3
Leishmaniosis felina	4
Manifestaciones clínicas.....	6
Diagnóstico	9
Tratamiento	11
4. Objetivos	12
5. Materiales y métodos	12
6. Resultados y discusión	13
Tabla de resultados	14
7. Conclusiones	18
8. Conclusions.....	18
9. Valoración personal.....	19
10. Bibliografía	20

1. Resumen.

Estudio seroepidemiológico de leishmaniosis felina utilizando dos pruebas de referencia

La leishmaniosis felina es una enfermedad zoonótica, vectorial y emergente causada principalmente por *L. infantum*. Al contrario que la leishmaniosis canina, la información que se dispone sobre esta enfermedad resulta escasa, sin embargo, en los últimos años, el aumento del número de casos en todo el mundo resalta la importancia y cuestiona el papel que juega esta especie en el ciclo de la enfermedad, debido a que en los gatos la enfermedad e infección pueden persistir durante periodos de tiempo largos.

El objetivo de este estudio es conocer el nivel de anticuerpos anti-*L. infantum* presentes en muestras de suero (n = 180) obtenidas de gatos ferales naturalmente expuestos mediante dos pruebas serológicas validadas en el gato.

2. Abstract.

Seroepidemiological study of feline leishmaniasis applying two reference tests

Feline leishmaniosis is a vector-borne, zoonotic and emergent disease caused by *L. infantum*. Contrary to canine leishmaniosis, there is a lack of information about the disease, although, in recent years, the increase in the number of new cases worldwide highlights the importance and questions the role of the cat in the disease's cycle. The fact that the disease and infection can last for a long period of time in cats, can provide clues to understanding this disease/ the large amount of time that the disease and the infection persists in the cat is clue to understanding this disease.

The aim of this study is to measure the level of antibodies anti-*L. infantum* in serological samples (n = 180) obtained from naturally exposed cats by analysing the serological samples previously collected and which are available for further serological study via two in-house reference tests.

3. Introducción

Leishmaniosis como enfermedad

La leishmaniosis es una enfermedad parasitaria causada por protozoos intracelulares obligados del género *Leishmania* (*Kinetoplastida, Trypanosomatidae*) (Solano-Gallego et al., 2006) cuya transmisión es vectorial y se produce a través de vectores del género *Phlebotomus* (Diptera, Psychodidae, en Europa) y *Lutzomyia* (en el continente americano) (Marques., 2008).

Las especies del género *Leishmania* pueden dividirse en dos subgéneros: *Leishmania* (donde se encuentran las especies del continente europeo como *L. major*, *L. infantum*, *L. donovani* y *L. tropica* y aquellas especies presentes en el continente americano como *L. chagasi*, *L. mexicana*, *L. amazonensis* y por último *L. venezuelensis*) y *Viannia* (únicamente se encuentran en América Central y Sudamérica, especies como *L. [Vannia] braziliensis*). (Solano-Gallego et al., 2006; Martín-Sánchez et al., 2007; Trainor et al., 2010).

La leishmaniasis representa un gran problema de salud pública ya que está considerada como una de las zoonosis más prevalentes a nivel mundial (Cantos-Barreda et al., 2017). Entre los casos de leishmaniasis se reportan cada año en un total de 98 países (WHO., 2019) afectando a un gran número de individuos con sus diferentes variantes en donde se identifican: leishmaniasis cutánea, (es la forma más frecuente de leishmaniasis, y produce manifestaciones clínicas que se traducen en lesiones cutáneas, incluso de carácter ulceroso, dejando cicatrices de por vida y, muchas veces, son causa de discapacidad grave (WHO., 2019). Aproximadamente un 95% de los casos de leishmaniasis cutánea se producen en los continentes americanos, la cuenca del Mediterráneo, Oriente Medio y Asia Central (WHO., 2019). Se calcula que cada año se producen en el mundo entre 600 000 y 1 millón de casos nuevos) (WHO., 2019).

Otra forma de presentación clínica es la leishmaniasis visceral (en casi el 90% de los casos es mortal si no recibe un tratamiento adecuado. Las manifestaciones clínicas, cuya aparición es inespecífica, se caracterizan por episodios irregulares de fiebre, pérdida de peso, hepatoesplenomegalia y anemia (WHO., 2019). Desde un punto de vista de la epidemiología de la infección en el hombre, cada año se producen a nivel mundial entre 50.000 y 90.000 nuevos casos de leishmaniasis visceral. (WHO., 2019). Finalmente, otra forma clínica de presentación es la forma mucocutánea, que se manifiesta en forma de lesiones en membranas mucosas de la nariz, la boca y la garganta (Alvar et al., 2012; WHO., 2019).

Estudio seroepidemiológico de leishmaniosis felina utilizando dos pruebas de referencia.

Los hospedadores del género *Leishmania* se pueden clasificar en domésticos y salvajes. Dentro de los animales domésticos, es el perro el considerado como el principal hospedador reservorio de leishmaniosis causada por *L. infantum*, sin embargo, en los últimos años se está considerando la influencia del gato en los mecanismos de transmisión dentro del ciclo del parásito junto a la posibilidad de ser realmente hospedador u hospedador accidental (Mancianti., 2004; Maroli et al., 2007; Maia y Campino, 2011). La clasificación de los gatos como hospedador accidental o como hospedador primario o secundario sigue siendo una cuestión de debate (Solano-Gallego et al., 2007; Maroli et al., 2007; Da Silva et al., 2008; Gramiccia., 2011).

Leishmaniosis felina

Las especies del género *Leishmania* que afectan al gato son: *L. mexicana*, *L. venezuelensis*, *L. braziliensis* y *L. amazonensis* en los continentes americanos y *L. infantum* tanto en los continentes americanos como en Europa. (Pennisi et al., 2015). La mayoría de las cepas de *L. infantum* pertenecen al zimodema (grupo de parásitos con las mismas isoenzimas) MON-1, siendo el que se detecta en casos en perros, gatos y otros hospedadores mamíferos (Ozon et al., 1998; Grevot et al., 2005 ; Cardoso et al., 2010 ; Maia et al., 2010; Gramiccia., 2011) (Imagen 1).

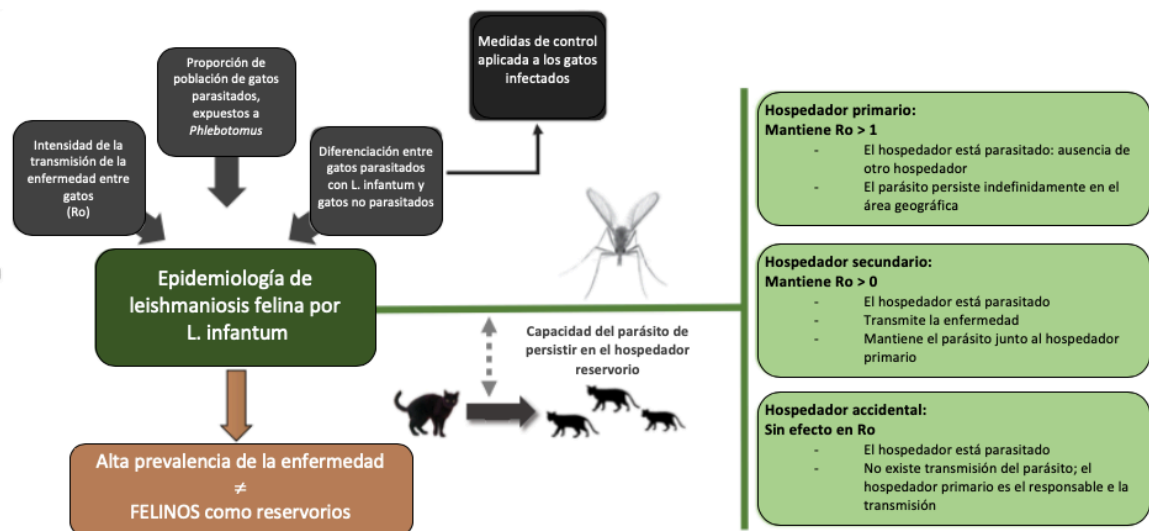


Imagen 1: Representación de la posible relación parásito-hospedador en la infección por *L. infantum* en gatos (Soares, Duarte, & Sousa, 2015).

Estudio seroepidemiológico de leishmaniosis felina utilizando dos pruebas de referencia.

Al igual que el perro, el principal mecanismo de transmisión es a través de la picadura del vector transmisor infectado con el parásito (Pennisi et al., 2015). Esto determina que en áreas donde existe infección de tipo endémico de *L. infantum* en perros, los gatos también podrían estar expuestos y existir el riesgo de contraer la infección (Pennisi et al., 2015). Además, el carácter y comportamiento exploratorio de los gatos han demostrado que pueden contribuir a su exposición frente al parásito, debido a que son predadores nocturnos que operan en un radio de 1.5 kilómetros de su residencia, utilizando los bosques como escenario de caza (Soares, Duarte, y Sousa, 2015). Estos elementos establecerían una relación entre los ciclos silvestres y domésticos de transmisión de la infección, facilitando la diseminación del parásito entre la población (Navarro et al., 2010). Por ello, los gatos podrían estar considerados como amplificadores de la enfermedad (Maia et al., 2009).

Al contrario de lo que ocurre con la leishmaniosis canina, la leishmaniosis felina es una enfermedad que dispone de muy pocos datos para su estudio en la cual cabe destacar un incremento de la información acerca de la enfermedad en los últimos años, por lo que se puede clasificar como una enfermedad emergente (Pennisi et al., 2015). El primer caso de leishmaniosis felina data en Algeria en 1912 en un gato doméstico el cual convivía con un perro infectado de *Leishmania* y, aunque los numerosos casos reportados a partir de este primer caso se distribuyen a lo largo de diversos países, hay evidencias claras de que existe mayor incidencia en países situados cerca de la costa Mediterránea, debido al endemismo del parásito y sus vectores (Solano-Gallego., 2007).

La aparición de nuevas técnicas diagnósticas, la mayor información que se está obteniendo sobre la relación parásito-hospedador unido a una mayor incidencia en visitas veterinarias por parte de propietarios de gatos han contribuido significativamente a considerar esta enfermedad como emergente. En los últimos años, también se ha demostrado que existen muchas más similitudes entre la enfermedad que se da en perros comparándola con la que aparece en gatos (Cantacessi et al., 2015). Sin embargo, pese al avance en el conocimiento de la enfermedad en esta especie, toda la información obtenida en los últimos años sobre casos clínicos sigue siendo de baja o mala calidad en lo que se refiere a la realidad de la situación epidemiológica (Pennisi et al., 2015).

Manifestaciones clínicas

En el perro, las diferentes formas de presentación clínica y el tipo de lesiones presente son por un lado consecuencia de la presencia del parásito juntos a los diversos fenómenos inmunopatológicos desarrollados por la respuesta inmunitaria del hospedador. En el caso de la enfermedad en el gato, las manifestaciones clínicas y alteraciones de laboratorios en animales infectados no son tan evidentes dando lugar a infecciones subclínicas, con un mayor dificultad para su identificación por parte del veterinario (Pennisi et al., 2014).

La clasificación del gato como hospedador accidental es consecuencia de la evidencia que existe de que los gatos, normalmente, no presentan signos clínicos (Solano-Gallego et al., 2007; Nasereddin, Salant y Abdeen., 2008; Maia et al., 2010). Por lo que, referido a la clínica en gatos infectados por *L. infantum*, la forma cutánea es la presentación más frecuente, en el caso de presentar clínica detectando lesiones como dermatitis pustular, costrosa, nodular o escamosa unida a alopecia (Ozon et al., 1998; Hervás et al., 1999; Navarro et al., 2010) (Imagen 2, 3 y 4).

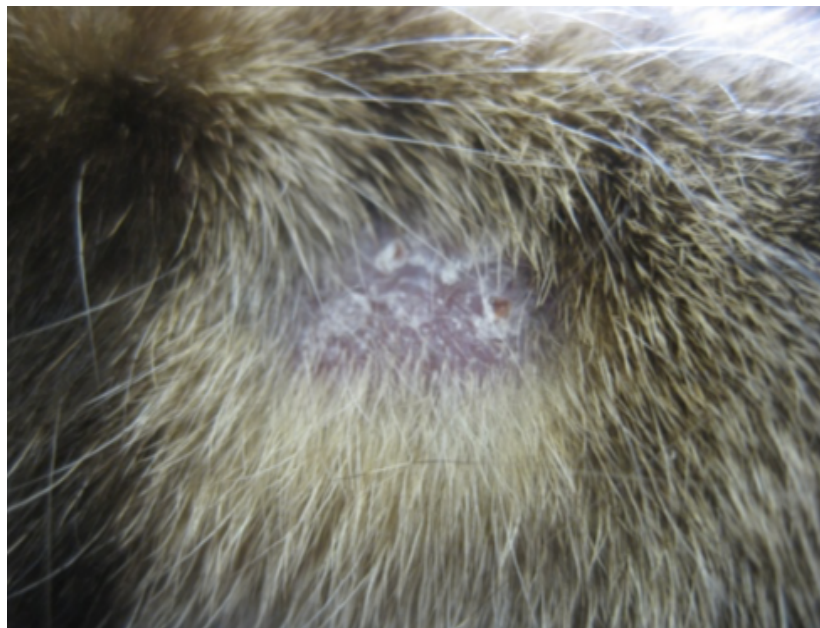


Imagen 2: Alopecia focal con dermatitis costrosa debida a *L. infantum* en un gato. (Pennisi et al., 2015).

Otras lesiones cutáneas asociadas con *L. infantum*, serían nódulos, ulceraciones y de forma menos frecuente destacaría la dermatitis exfoliativa (Ozon et al., 1998; Pennisi et al., 2004; Dalmau et al.,

Estudio seroepidemiológico de leishmaniosis felina utilizando dos pruebas de referencia.

2008; Navarro et al., 2010; Ortuñez et al., 2010; Sanches et al., 2011; Pocholle et al., 2012; Pennisi et al., 2013; Migliazzo et al., 2015).

Algunos gatos pueden sufrir de varias lesiones cutáneas al mismo tiempo o ir desarrollándolas de manera consecuyente; estas lesiones pueden coexistir con lesiones mucocutáneas (Pennisi et al., 2015). Los nódulos cutáneos y mucocutáneos pueden ser de tamaño variable y, están localizados de manera más frecuentes en la zona de la cabeza, incluyendo los párpados, hocico y comisuras labiales, incluso en las partes distales de las extremidades (Pennisi et al., 2015).



Imagen 3: Dermatitis ulcerativa en la parte distal de la extremidad debida a *L. infantum* en un gato.(Pennisi et al., 2015).

Se han observado también nódulos en la mucosa anal (Navarro et al., 2010) que suelen ser de tamaño pequeño (menor de 1 centímetro), sin causar dolor o prurito con una superficie normal, ulcerada o alopecica (Poli et al., 2002; Dalmau et al., 2008; Navarro et al., 2010; Ortuñez et al., 2010; Sanches et al., 2011; Pennisi et al., 2013; Migliazzo et al., 2015).

Comparándolo con la leishmaniosis canina, la dermatitis exfoliativa suele ser un hallazgo bastante infrecuente en la leishmaniosis felina. (Laurette-MagalonyToga., 1996; Hervás et al., 1999 ; Navarro et al., 2010).Otros hallazgos dermatológicos anormales incluyen pápulas y nódulos hemorrágicos donde se pueden encontrar amastigotes de *Leishmania* (Pennisi et al., 2004; Laurette-Magalon y Toga., 1996).

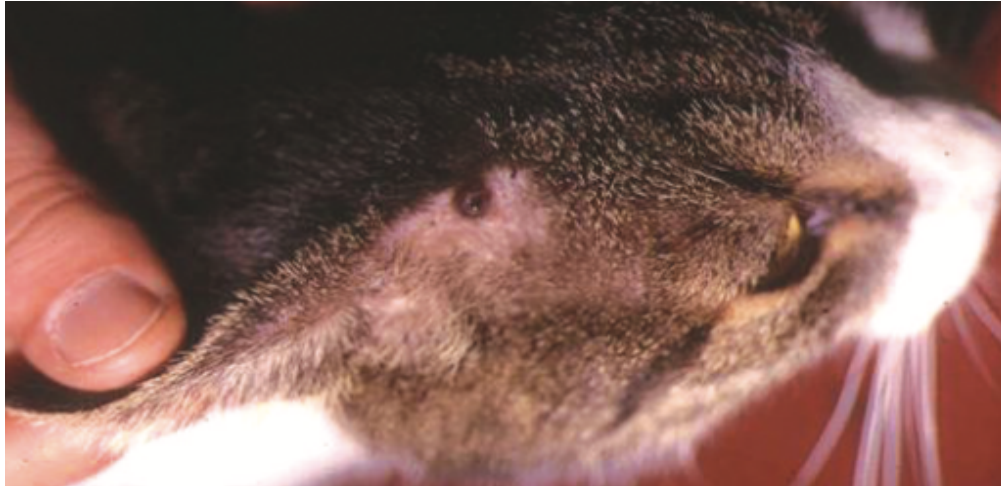


Imagen 4: Nódulo hemorrágico en parte proximal de la oreja debido a *L. infantum* en un gato (Pennisi et al., 2015).

La forma visceral de la enfermedad afecta a órganos y tejidos tales como: hígado, bazo, médula ósea, riñones, linfonodos, boca y ojos (Pennisi et al., 2015) (Imagen 5). Las lesiones oculares más características son: uveítis, panoftalmítis y blefaritis nodular (Leiva et al., 2005; Richter et al., 2014). La gingivoestomatitis crónica es también un signo característico apareciendo en casi en uno de cuatro de gatos infectados con *L. infantum* (Akhtardanesh et al., 2018).



Imagen 5: Estomatitis y glositis debido a *L. infantum* en un gato (Pennisi et al., 2015).

Estudio seroepidemiológico de leishmaniosis felina utilizando dos pruebas de referencia.

La aparición de lesiones y el desarrollo crónico de la infección en el caso de la leishmaniosis canina se debe, principalmente, al desarrollo de una respuesta inmunitaria específica, adaptativa y exacerbada que evoluciona a un desgaste de los mecanismos inmunitarios del animal infectado asociado a una destacada respuesta de los linfocitos T helper 2 unida a una respuesta dañada en el caso de los linfocitos T helper 1. (Solano-Gallego et al., 2009; Esch et al., 2013). Lo mismo se observa en gatos provenientes de zonas endémicas donde la infección por *L. infantum* provoca una respuesta inmunitaria adaptativa humoral y celular similar (Priolo et al., 2017).

Se determinó que gatos que habían desarrollado la enfermedad debido a la infección de *L. infantum* presentaban una elevada cantidad de parásitos en sangre y un título de anticuerpos de bajo a muy alto, aunque la relación existente entre el título de anticuerpos y la severidad de la enfermedad unido a la producción de IFN- γ y específica no fueron estudiados (Pimenta et al., 2014; Brianti et al., 2015; Dedola et al., 2015; Maia et al., 2015; Pennisi et al., 2015a, 2016; Bardagi et al., 2016; Basso et al., 2016). Cabe destacar que un gran porcentaje de los casos presentados derivaban de animales con enfermedades que comprometían su sistema inmune (infecciones de retrovirus, neoplasias) o a los que se les estaba administrando algún tratamiento inmunosupresor (Dalmau et al., 2008).

Diagnóstico

Los métodos de diagnóstico laboratoriales son esenciales para el diagnóstico de infecciones por *L. infantum* (Soares et al., 2015). La mayoría de métodos de diagnóstico para detectar la infección por *Leishmania* disponibles para su detección en perros son los utilizados para la detección de la infección en gatos, sin embargo deben estar validados para ser utilizados en la especie felina (Pennisi et al., 2015). El diagnóstico, en la mayoría de los casos es por métodos serológicos, citológicos, histológicos, cultivo o moleculares (Pennisi et al., 2015).

La histopatología tiene una sensibilidad y especificidad aceptable, queriendo decir que en una histopatología un resultado negativo no excluye la presencia del parásito pero con un resultado positivo sí que se confirma la enfermedad, situación extrapolable para el diagnóstico citológico, especialmente para el diagnóstico de gatos que presentan lesiones cutáneas (Soares et al., 2015).

La identificación de amastigotes de *Leishmania* en muestras aspiradas de médula ósea, linfonodos y bazo está considerado como el método de diagnóstico específico (Asfaram, Fakhar y Teshnizi, 2019). La citología por aspiración puede llevarse a cabo en distintos órganos como el hígado, riñón

Estudio seroepidemiológico de leishmaniosis felina utilizando dos pruebas de referencia.

y bazo. Recientemente, se ha demostrado que la citología por aspiración del linfonodo poplíteo sería más sensible como método de diagnóstico si se compara con la citología de otros órganos anteriormente mencionados (Soares et al., 2015).

La Inmunohistoquímica específica puede usarse como método de confirmación, o incluso como primera opción de diagnóstico (Soares et al., 2015). El cultivo de promastigotes del género *Leishmania* es un método directo y adicional que presenta ciertas desventajas como la baja sensibilidad, el largo tiempo que conlleva para obtener los resultados y la necesidad de personal e instalaciones adecuadas para el aislamiento del parásito (Soares et al., 2015).

El método serológico más común suele ser la inmunofluorescencia indirecta (IFI) y el ensayo por inmunoabsorción ligada a enzimas (ELISA) (Pennisi et al., 2015). La mayoría de estudios epidemiológicos han demostrado la presencia de anticuerpos anti-*Leishmania* en suero de animales infectados mediante diversas técnicas como las dos anteriormente comentadas u otras como es el Western blot (WB).

Otra técnica de confirmación de la infección que se ha utilizado es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para identificar especies de *Leishmania* spp. mediante la amplificación selectiva de secuencias de DNA del parásito (Braga et al., 2014). La detección del DNA puede hacerse en una amplia variedad de tejidos, incluyendo la médula ósea, piel, aspiraciones de los linfonodos, sangre, cortes histológicos embebidos en parafina, incluso en el propio vector (Greene, 2006; Ikeda-García y Marcondes., 2007; Braga, Langoni y Lucheis, 2014).

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) está recomendada sobre otros métodos de diagnóstico, especialmente cuando la carga parasitaria en sangre es baja, o bien se sospecha de una infección reciente donde no hay aún respuesta serológica observable, aunque existen pocos datos de su utilización diagnóstica en gatos con leishmaniosis felina (Asfaram et al., 2019).

Para una mejor precisión en el diagnóstico de la leishmaniosis, es necesario utilizar una combinación de técnicas dado que no existe ningún método que garantice todos los objetivos de un diagnóstico fiable como: una rápida utilización, un coste adecuado, rapidez, sensibilidad y especificidad altas (Braga et al., 2014). Está recomendado que la enfermedad se diagnostique integrando los signos clínicos, las características epidemiológicas de la región y los exámenes laboratoriales,

Estudio seroepidemiológico de leishmaniosis felina utilizando dos pruebas de referencia.

contribuyendo al correcto tratamiento de los animales verdaderamente positivos. (Braga et al., 2014) (Imagen 6)

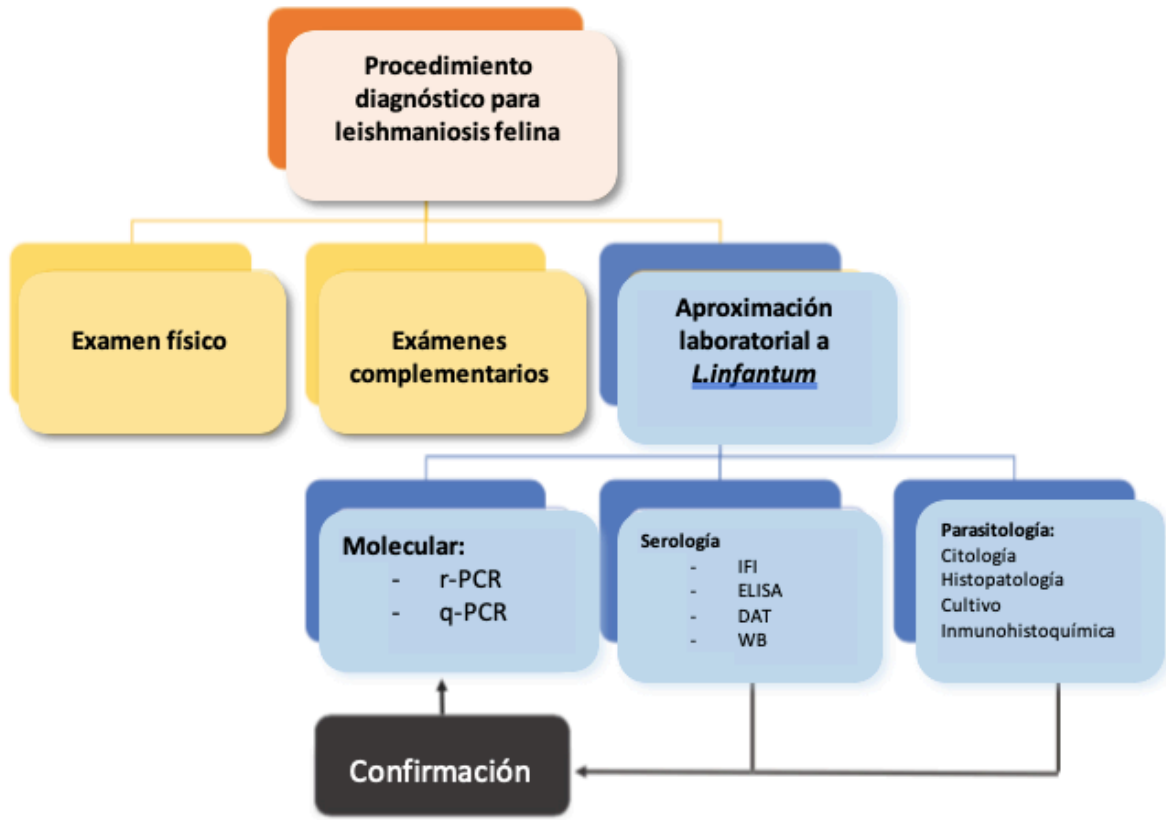


Imagen 6: Metodologías de diagnóstico de leishmaniosis felina. (Soares et al., 2015).

Tratamiento

El tratamiento en gatos con leishmaniosis clínica sigue siendo empírico y está basado fundamentalmente en el uso de fármacos que se prescriben para el tratamiento de la leishmaniosis canina, obteniendo una cura similar a los casos en perros (Solano-Gallego et al., 2011; Brianti et al., 2015; Dedola et al., 2015; Maia et al., 2015; Pimenta et al., 2015; Pennisi et al., 2015a, 2016; Bardagi et al., 2016; Basso et al., 2016). Esto significa que la eficacia y seguridad de los protocolos usados nunca han sido evaluados en estudios controlados y los gatos deberían ser monitorizados por la severidad de los efectos secundarios (los tratamientos para la leishmaniosis suelen cursar con efectos secundarios de carácter, sobretudo, renal) debido a que los gatos son especialmente

Estudio seroepidemiológico de leishmaniosis felina utilizando dos pruebas de referencia.

susceptibles a problemas renales, incluyendo la posibilidad de recaídas clínicas de la enfermedad (Pennisi et al., 2015).

Las evidencias científicas actuales muestran que los gatos infectados naturalmente no tuvieron una recuperación clínica adecuada sin la debida terapia anti-*Leishmania*. (Solano-Gallego et al., 2009). Sin embargo, un estudio en el cual se monitorizó durante 12 meses a un grupo de gatos diagnosticados de leishmaniosis felina mostró que 11 de 27 animales diagnosticados mediante PCR o IFI tuvieron un buen estado clínico sin ningún tipo de tratamiento contra *Leishmania* (Martín-Sánchez et al., 2007).

4. Objetivos

El objetivo de este estudio es conocer el nivel de seroprevalencia frente a *L. infantum* presentes en muestras de suero (n = 180) obtenidas de gatos naturalmente expuestos mediante dos pruebas de referencia in-house, una prueba IFI y una prueba WB.

De los resultados obtenidos, se realizará un análisis estadístico sobre la relación de los niveles de anticuerpos y las características en el gato.

5. Materiales y métodos

Los anticuerpos de Anti-*Leishmania* fueron detectados por WB utilizando antígenos *L. infantum* sonicados (MHOM/FR/78/LEM75 zymodeme MON-1). Se realizó un WB siguiendo las indicaciones descritas por Riera et al. (1999) con algunas modificaciones. Se realizó en 0.1% SDS–13% polyacrylamide gel en un Mini-gel Bio RadSystem. Suero diluido a 1/50 fueron evaluados y un conjugado de proteína A peroxidada (1/1,000 dilution; Pierce) fue utilizada. Consideramos un suero positivo cuando se observó inmunoreactividad contra los 14 y/o 16 kDa de fracción antigénica de *Leishmania*.

El IFI se realizó utilizando la cepa MHOM/MON-1/LEM 75 zymodeme MON-1 como el antígeno completo del parásito fijado en portaobjetos de múltiples puntos (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA). Los sueros de los gatos fueron evaluados en dilución serie doble de

Estudio seroepidemiológico de leishmaniosis felina utilizando dos pruebas de referencia.

1:80 a 1:2560. Acto seguido, 20 µl de cada dilución de suero fue aplicada en cada pocillo del portaobjetos. Los portaobjetos fueron incubados 30 minutos a 37°C en una cámara húmeda. Después se aplicó un lavado. Los portaobjetos fueron lavados 2 veces con PBS 5 minutos y una vez con agua destilada. Después del lavado, 20 µl de un conjugado de isotiocianato de fluoresceína con un IgG anti-gato de conejo (abcam) diluido 1:64 en 0.01% se colocó en cada uno de los pocillos del portaobjetos. Se añadió tinta azul de Evans a cada pocillo. Los portaobjetos fueron incubados en una cámara húmeda a 37°C otros 30 minutos bajo condiciones oscuras. El lavado descrito anteriormente fue repetido. Después del segundo lavado, se añadieron unas gotas de medio de montaje a los portaobjetos. Los portaobjetos fueron examinados bajo un microscopio fluorescente (Leica DM750 RH; Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) a un aumento de 400× y cada pocillo fue comparado con el patrón fluorescente observado en los controles positivos y negativos. Los controles positivos y negativos fueron incluidos en cada portaobjetos. El suero positivo fue obtenido de un gato de España con leishmaniosis confirmada utilizando un medio bifásico de agar sangre Novy, McNeal, and Nicolle para *L. infantum*. El suero de aislamiento y control negativo fue obtenido de un gato domestico sano y no infectado. El punto de corte para un suero positivo fue de 1:80, de acuerdo con los demás autores Penissi y Persichetti, 2018.

La asociación entre las distintas variables (sexo, urbano/periurbano, colonia) analizadas se realizó mediante la prueba de Fisher exacta (IBM SPSS versión 22). Un valor $p > 0.05$ se consideró estadísticamente significativo.

6. Resultados y discusión

Un total de 180 gatos de vida libre del entorno de la ciudad de Zaragoza fueron incluidos en el estudio procedentes de 19 colonias diferentes de origen urbano (n=10) como periurbano (barrios rurales de Zaragoza) (n=9) entre el año 2016 y 2018.

Todos los gatos evaluados no presentaban signos clínicos de enfermedad sistémica o de tipo dermatológico detectados durante el examen físico, por lo que fueron clasificados como gatos aparentemente sanos. En todos los casos, los gatos eran mayores de un año de edad, y no se pudo disponer de más información puesto que eran gatos ferales. La distribución por sexo fue de 97 gatas

Estudio seroepidemiológico de leishmaniosis felina utilizando dos pruebas de referencia.

y 83 gatos. Considerando la localización de la colonia, 82 animales procedían de colonias urbanas, mientras que los restantes 98 animales procedían de colonias periurbanas.

Los niveles de seropositividad para leishmaniosis felina teniendo el tipo de prueba serológica fueron 6,7% en WB, 2,2% en IFI. Se detectaron diferencias significativas entre el hábitat (periurbano) y WB ($p=0,040$).

El grado de concordancia entre WB e IFI ($k=0,400$) fue aceptable.

Tabla de resultados

	WB		IFI (1:80)	
	+	-	+	-
Macho	6	78	3	80
Hembra	6	91	1	96
Urbano	2	80	1	81
Periurbano	10	88	3	95

Los resultados de este estudio demuestran la presencia de la infección en gatos ferales en la ciudad de Zaragoza. Sin embargo, debe existir cierta precaución a la hora de excluir a los gatos negativos diagnosticados con la técnica IFI siendo recomendable la utilización de otros métodos de diagnóstico serológico o, incluso, otros diagnósticos complementarios como la citología, histología o PCR en gatos que presenten clínica pero que sean negativos a esta técnica (Pennisi et al., 2015).

Hay que tener en cuenta reacciones cruzadas en el caso de que las muestras sean cogidas de áreas endémicas de *Trypanosoma spp.* u otras especies de *Leishmania spp.* (Pennisi et al., 2015). En el caso de este estudio, el área geográfica no coincide con la coexistencia de *Trypanosoma* o de otras especies de *Leishmania*.

A pesar de la cantidad de investigaciones serológicas publicadas, pocos son los estudios que validan a las técnicas serológicas para la detección de anticuerpos anti-*Leishmania* en muestras obtenidas de gatos de áreas geográficas no endémicas (Sánchez et al., 2007; Sherry et al., 2011; Pennisi et al., 2012; Solano-Gallego et al., 2014). Por ello, es importante tener la mayor cantidad de datos posibles de los animales procedentes de las zonas no endémicas de la enfermedad con el objetivo de excluir

Estudio seroepidemiológico de leishmaniosis felina utilizando dos pruebas de referencia.

la posibilidad de que ocurran reacciones cruzadas con otros agentes o con proteínas felinas endógenas (Montoya et al., 2018). A pesar de que el perro es el principal reservorio de *L. infantum*, estudios recientes han demostrado que los lagomorfos también pueden ser reservorios competentes que pueden jugar un papel importante en el ciclo selvático de la enfermedad en áreas urbanas poniendo de manifiesto la importancia de los estudios seroepidemiológicos en animales callejeros para detectar potenciales reservorios de la enfermedad (Montoya et al., 2018).

Con respecto a la seroprevalencia, existe una diferencia entre el tipo de prueba realizada ya que se han obtenido valores de seropositividad de 6.7% con WB y de 2.2% en muestras de gatos en la ciudad de Zaragoza y sus alrededores.

Otros estudios realizados con el objetivo de estudiar la seroprevalencia de *L. infantum* en gatos callejeros en la ciudad de Madrid y sus regiones colindantes, establecen una seroprevalencia de un 3.2% utilizando dos pruebas diagnósticas, en este caso IFI y ELISA. (Miró et al., 2014). Estudios posteriores han indicado una seroprevalencia muy similar para la ciudad de Madrid (1.3% - 3.7%) (Ayllón et al., 2012) y otras regiones mediterráneas tales como Grecia, Portugal, el sur de Italia e Israel (Nasereddin et al., 2008; Diakou et al., 2009; Duarte et al., 2010; Maia et al., 2010; Pennisi et al., 2010). En comparación a todos estos datos, la seroprevalencia de Ibiza (13.2%) y el sur de España (28.3%) fueron notablemente más altas (Martín-Sánchez et al., 2007; Sherry et al., 2011). Cabe destacar que estas dos regiones son endémicas para leishmaniosis canina y, por tanto, la seroprevalencia de *L. infantum* en perros es mucho más alta que en otras regiones españolas (Martín-Sánchez et al., 2007; Suárez et al., 2012; Miró et al., 2014), por lo que parece más probable que aquellas regiones de elevada endemicidad para leishmaniosis canina, también se podrán detectar más gatos infectados en comparación a regiones de baja endemicidad para el perro. En el caso de este estudio, la comparación entre técnicas es dificultosa debido a las diferencias entre las dos pruebas diagnósticas utilizadas (IFI, ELISA), los parámetros establecidos, el tamaño y origen de las muestras y la estación del año en el que se realizó el estudio (Miró et al., 2014). Por ello, es de suma importancia estandarizar los protocolos, establecer los parámetros para las diferentes técnicas y definir una prueba estándar o de referencia al igual que para la leishmaniosis canina. (Solano-Gallego et al, 2009, Solano-Gallego et al, 2011).

A pesar de las diferencias entre los estudios de seroprevalencia realizados hasta la fecha, la seroprevalencia de *L. infantum* entre los gatos observados en este estudio comparada con otros

estudios, no ha cambiado desde la realización de los primeros estudios en la materia en la ciudad de Madrid. (Ayllón et al., 2012; Miró et al., 2014). Esta tendencia ha seguido la misma dinámica que la situación de *L. infantum* en perros de Madrid, donde la seroprevalencia se ha mantenido estable en los últimos 15 años (6.4% - 8.1%) (Miró et al. 2007; Miró et al., 2014). Incluyendo el periodo de tiempo correspondiente al brote de leishmaniasis humana en Madrid (Arce et al., 2013).

En otros estudios se detectaron seroprevalencias del 4.8% en gatos callejeros en la ciudad de Madrid y sus alrededores (Montoya et al., 2018). Se destacó que en áreas de alta seroprevalencia de *L. infantum* en perros, la seroprevalencia en gatos era incluso mayor (Martín-Sánchez et al., 2007; Sherry et al., 2011; Otranto et al., 2017b). En este estudio, no se encontró ninguna correlación significativa entre la infección por *L. infantum* y la edad o el estado clínico, como se ha destacado en otros estudios (Martín-Sánchez et al., 2007; Miró et al., 2014). Sin embargo, sí que se señaló una seroprevalencia mayor en los machos, aunque, no se sospecha de que la infección por *L. infantum* se favorezca por el sexo tanto en perros como en gatos (Martín-Sánchez et al., 2007; Miró et al., 2014).

Al contrario de lo que ocurre en los estudios mencionados anteriormente, incluido el estudio realizado para este trabajo, la seroprevalencia de una población felina en un área geográfica reducida y endémica sufre un notable aumento. Un estudio realizado en las Islas Eólicas (suroeste de Italia) detectó una prevalencia a la infección por *L. infantum*, de gatos autóctonos, detectada por la técnica IFI y por una o varias pruebas moleculares de un 25.8% (Otranto et al., 2017). Dentro de los gatos serológicamente positivos a *L. infantum* el 75.3% presentaban un título de anticuerpos del 1:40, mientras que el resto presentaban valores de 1:80 a 1:640. (Otranto et al., 2017). La prevalencia de la infección a *L. infantum* en perros detectada por este estudio (41.8%) fue significativamente mayor que en gatos (25.8%) debido a que la incidencia de *L. infantum* en el momento del estudio unido a una mayor exposición al vector por parte de los perros (27%) que de los gatos (14.7%) (Otranto et al., 2017).

La incidencia en la infección por *L. infantum* en gatos positivos ante un primer periodo de tiempo de exposición al vector (14.7%) representa unos datos únicos en la literatura, indicando además, que este escenario de las Islas Eólicas representa un área altamente endémica siendo necesarias medidas de prevención para los animales (Otranto et al., 2017).

La comparación de los datos obtenidos sobre la prevalencia en la literatura, obtenida a partir de diferentes técnicas diagnósticas (por ejemplo: IFI y ELISA) en diversas poblaciones animales, es problemática debido a la naturaleza de las muestras, debido a que, normalmente, son gatos con propietario, de vida interior y por tanto poco expuestos a la picadura del vector procedentes de distintas partes del mundo unido a que el número de animales utilizados en los estudios no suele ser representativo (Pennisi et al., 2015). Por otro lado, la falta de una prueba *gold standard* hace que las pruebas serológicas utilizadas sean variadas y diversas o incluso para una misma técnica serológica, el punto de corte sea diferente como es el caso de la prueba IFI (Pennisi et al., 1998; Poli et al., 2002; Vita et al., 2005; Martín-Sánchez et al., 2007; Duarte et al., 2010; Spada et al., 2013; Chatzis et al., 2014b).

7. Conclusiones

1. La infección por *Leishmania infantum* ha sido detectada en gatos de vida de libre de la ciudad de Zaragoza.
2. La infección ha sido identificada en gatos aparentemente sanos tanto en zonas urbanas como en barrios rurales (zona periurbana).
3. La utilización del diagnóstico serológico a través de las pruebas de Western Blot (WB) e inmunofluorescencia indirecta (IFI) para el diagnóstico de la leishmaniosis felina resulta de gran utilidad. La técnica del WB demuestra una mayor sensibilidad que la técnica IFI, respaldada por los datos obtenidos en la realización de este estudio.
4. Se necesita realizar más estudios epidemiológicos para conocer la epidemiología de la infección en nuestro entorno dado su potencial zoonótico para el ser humano.

8. Conclusions

1. Infection caused by *Leishmania infantum* has been detected in stray cats in the city of Zaragoza.
2. The infection has been identified in presumably healthy cats in urban areas as well as in rural neighbourhoods (periurban areas).
3. The use of serological diagnosis via the Western Blot (WB) and the indirect immunofluorescent tests to diagnose feline leishmaniosis is extremely useful. The WB technique shows greater sensitivity than that of the IFI technique, supported by data obtained in the completion of this study.
4. More epidemiological research must be conducted in order to recognise the epidemiology of the infection in our environment taking into account its zoonotic potential for human beings.

9. Valoración personal

En primer lugar, agradecer a todas las personas que han hecho posible la realización de este trabajo, en especial a mis tutores Sergio Villanueva Saz y Víctor Martín Santander por prestarme toda la ayuda posible.

La realización del trabajo de fin de grado me ha ayudado a ampliar mis conocimientos sobre el tema que decidí trabajar. Como futuro profesional en el mundo de la clínica de pequeños animales y debido a la ciudad en donde me encuentro, la leishmaniosis como enfermedad en los animales siempre ha estado presente a mi alrededor. La oportunidad que me ha brindado este trabajo a la hora de poder trabajar e investigar sobre una enfermedad por la que siempre he tenido ganas de indagar más allá de la información obtenida en las sesiones teóricas a lo largo de la carrera, ha sido uno de los principales motivos que me llevó a la elección del trabajo.

Por otra parte, la dedicación, el esfuerzo y el tiempo que le he dedicado al propio trabajo me ha servido para crecer profesionalmente en el ámbito de la búsqueda y contrastación de la información, aspecto que me ayudará en mi carrera.

Como conclusión, el trabajo de fin de grado proporciona una oportunidad de trabajar de una manera más profesional y ayuda al estudiante a utilizar los recursos obtenidos a lo largo del periodo formativo para conseguir la información necesaria para concluir su investigación.

10. Bibliografía

1. Aisa MJ, Castillejo S, Gallego M, Fisa R, Riera MC, de Colmenares M, et al. (1998). Diagnostic potential of Western blot analysis of sera from dogs with leishmaniasis in endemic areas and significance of the pattern. *Am J Trop Med Hyg.* 58:154–9.
2. Akhtardanesh, B., Mahmoodi, T., Ebrahimi, M., Kheirandish, R., Sharifi, I., Mohammadi, A., & Mostafavi, A. (2018). Low susceptibility of domestic cats to experimental *Leishmania infantum* infection. *Journal of Vector Borne Diseases*, 55(3), 230–234.
3. Alvar J, Vélez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, et al. (2012). Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PloS One.* 7(5):e35671.
4. Arce A, Estirado A, Ordobas M, Sevilla S, García N, Moratilla L, de la Fuente S, Martínez AM, Pérez AM, Aránguez E, Iriso A, Sevillano O, Bernal J, Vilas F. (2013). Re-emergence of leishmaniasis in Spain: community outbreak in Madrid, Spain, 2009 to 2012. *Euro Surveill.*, 18(30):20546.
5. Asfaram, S., Fakhar, M., & Teshnizi, S. H. (2019). Is the cat an important reservoir host for visceral leishmaniasis? A systematic review with meta-analysis. *Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases*, 25(0), 1–10.
6. Ayllon T, Diniz PP, Breitschwerdt EB, Villaescusa A, Rodriguez-Franco F, Sainz A. (2012). Vector-borne diseases in client-owned and stray cats from Madrid, Spain. *Vector Borne Zoonotic Dis* 12:143–50.
7. Bardagi, M., Lloret, A., Dalmau, A., Esteban, D., Font, A., Leiva, M., Ortunez, A., Pena, T., Real, L., Salò, F., Tabar, M.D. (2016). Feline leishmaniosis: 15 cases. *Vet. Dermatol.* 27, 112–113.
8. Basso, M.A., Marques, C., Santos, M., Duarte, A., Pissarra, H., Carreira, L.M., Gomes, L., Valério-Bolas, A., Tavares, L., Santos-Gomes, G., Pereira da Fonseca, I. (2016). Successful treatment of feline leishmaniosis using a combination of allopurinol and N-methylglucamine antimoniate. *J. Feline Med. Surg. Open Rep.*
9. Braga AR, Corrêa AP, Camossi LG, Silva RC, Langoni H, Lucheis SB. (2014). Coinfection by *Toxoplasma gondii* and *Leishmania* spp. in domestic cats (*Felis catus*) in State of Mato Grosso do Sul. *Rev Soc Bras Med Trop.* 47(6):796-7.
10. Brianti, E., Gaglio, G., Napoli, E., Falsone, L., Prudente, C., Solari Basano, F., Latrofa, M.S., Tarallo, V.D., Dantas-Torres, F., Capelli, G., Stanneck, D., Giannetto, S., Otranto, D. (2014).

- Efficacy of a slow-release imidacloprid (10%)/flumethrin (4.5%) collar for the prevention of canine leishmaniosis. *Parasites Vectors* 7, 327.
11. Cantacessi, C., Dantas-Torres, F., Nolan, M.J., Otranto, D., (2015). The past, present, and future of *Leishmania* genomics and transcriptomics. *Trends Parasitology* 31, 100–108.
 12. Cantos-Barreda, A., Escribano, D., Bernal, L. J., Pardo-Marín, L., Cerón, J. J., & Martínez-Subiela, S. (2017). New wide dynamic range assays for quantification of anti-*Leishmania* IgG2 and IgA antibodies in canine serum. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 189(May), 11–16.
 13. Cardoso L, Lopes AP, Sherry K, et al. (2010) Low seroprevalence of *Leishmania infantum* infection in cats from northern Portugal based on DAT and ELISA. *Vet Parasitol.* 174; 37–42.
 14. Chatzis, M.K., Leontides, L., Athanasiou, L.V., Papadopoulos, E., Kasabalis, D., Mylonakis, M., Rallis, T., Koutinas, A.F., Andreadou, M., Ikonopoulou, J., Saridomichelakis, M.N. (2014b). Evaluation of indirect immunofluorescence antibody test and enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of infection by *Leishmania infantum* in clinically normal and sick cats. *Exp. Parasitol.* 147, 54–59.
 15. da Silva AV, de Souza Cândido CD, de Pita Pereira D, et al. (2008). The first record of American visceral leishmaniosis in domestic cats from Rio de Janeiro, Brazil. *Acta Tropica.* 105; 92–94.
 16. Dalmau A, Ossò M, Oliva A, Anglada L, Sarobé X, Vives E. (2010). Leishmaniosis felina a propósito de un caso clínico. ¿Nos olvidamos de que existe? *Clin Vet Peq Anim.* 28:233–7.
 17. Dedola, C., Ibba, F., Manca, T., Garia, C., Abramo, F. (2015). Dermatite esfoliativa asociada a leishmaniosis in un gatto. In: *Proceedings 2° Congresso Nazionale SIDEV. Presented at the 2° Congresso Nazionale SIDEV • Dermatologia Felina. Aci Castello (Catania, Italia), 17–19 July 2015, Poster.*
 18. Diakou A, Papadopoulos E, Lazarides K. (2009). Specific anti-*Leishmania* spp. Antibodies in stray cats in Greece. *J Feline Med Surg.*11(8):728-30.
 19. Duarte, A., Castro, I., Pereira da Fonseca, I.M., Almeida, V., Madeira de Carvalho, L.M., Meireles, J., Fazendeiro, M.I., Tavares, L., Vaz, Y. (2010). Survey of infectious and parasitic diseases in stray cats at the Lisbon Metropolitan Area, Portugal. *J. Feline Med. Surg.* 12, 441–446.

20. Esch, K.J., Juelsgaard, R., Martinez, P.A., Jones, D.E., Petersen, C.A. (2013). Programmed death 1-mediated T cell exhaustion during visceral leishmaniasis impairs phagocyte function. *J. Immunol.* 191, 5542–5550.
21. Gramiccia M. (2011). Recent advances in leishmaniosis in pet animals: epidemiology, diagnostics and anti-vectorial prophylaxis. *Vet Parasitol.* 181: 23–30.
22. Greene CE. (2006). In *Infectious diseases of the dog and cat*. 3rd edition. Edited by Greene CE. Canadá: Saunders/Elsevier. 1387.
23. Grevot A, Jaussaud H, Marty P, et al. (2005). Leishmaniosis due to *Leishmania infantum* in a FIV and FeLV positive cat with squamous cell carcinoma diagnosed with histological, serological and isoenzymatic methods. *Parasite J.* 12: 271–275.
24. Hervás J, Chacón-M De Lara F, Sánchez-Isarria MA, Pellicer S, Carrasco L, Castillo JA, et al. (1999). Two cases of feline visceral and cutaneous leishmaniosis in Spain. *J Feline Med Surg.* 1:101–5.
25. Ikeda-Garcia FA, Marcondes M. (2007). Métodos de diagnóstico da leishmaniose visceral canina. *Rev Clín Vet.* 71:34–42.
26. Iniesta L, Gállego M, Portús M. (2007). Idiotype expression of IgG1 and IgG2 in dogs naturally infected with *Leishmania infantum*. *Vet Immunol Immunopathol.* 119:189–97.
27. Laurelle-Magalon C, Toga I. (1996). Un cas de leishmaniose féline. *Prat Med Chir Anim Comp.* 31:255–61.
28. Leiva M, Lloret A, Pena T, Roura X. (2005). Therapy of ocular and visceral leishmaniasis in a cat. *Vet Ophthalmol.* 8:71–5.
29. Maia C, Campino L. (2011). Can domestic cats be considered reservoir hosts of zoonotic leishmaniasis? *Trends Parasitol.* 27(8):341-4.
30. Maia C, Gomes J, Cristovão J, et al. (2010). Feline leishmania infection in a canine leishmaniosis endemic region, Portugal. *Vet Parasitol.* 174: 336–340.
31. Mancianti, F. (2004). Feline leishmaniasis: what's the epidemiological role of the cat? *Parassitologia* 46, 203–206.
32. Maroli M, Pennisi MG, Di Muccio T, Khoury C, Gradoni L, Gramiccia M. (2007). Infection of sandflies by a cat naturally infected with *Leishmania infantum*. *Vet Parasitol.* 145(3-4):357-60.
33. MARQUES, M. I. L. D. M. (2008). *Leishmaniose*. 150.

34. Martín-Sánchez J, Acedo C, Muñoz-Pérez M, Pesson B, Marchal O, Morillas- Márquez F. (2007). Infection by *Leishmania infantum* in cats: epidemiological study in Spain. *Vet Parasitol.* 145(3-4):267-73.
35. Martín-Sánchez, J., Acedo, C., Muñoz-Pérez, M., Pesson, B., Marchal, O., Morillas- Márquez, F., (2007). Infection by *Leishmania infantum* in cats: epidemiological study in Spain. *Vet. Parasitology* 145, 267–273.
36. Migliazzo A, Vitale F, Calderone S, Puleio R, Binanti D, Abramo F. (2015). Feline leishmaniosis: a case with a high parasitic burden. *Vet Dermatol.* 26:69–70.
37. Miró G, Montoya A, Mateo M, Alonso A, García S, García A, Caballero MJ, Molina R. (2007)/ A leishmaniosis surveillance system among stray dogs in the region of Madrid: ten years of serodiagnosis (1996–2006). *Parasitol Res.* 101(2):253–257.
38. Miró G, Rupérez C, Checa R, Gálvez R, Hernández L, García M, et al. (2014). Current status of *L. infantum* infection in stray cats in the Madrid region (Spain): implications for the recent outbreak of human leishmaniosis? *Parasit Vectors.* 7:112.
39. Miró G, Rupérez C, Checa R, Gálvez R, Hernández L, García M, et al. (2014). Current status of *L. infantum* infection in stray cats in the Madrid region (Spain): implications for the recent outbreak of human leishmaniosis? *Parasit Vectors.* 7:112.
40. Miró, G., Rupérez, C., Checa, R., Gálvez, R., Hernández, L., García, M., Canorea, I., Marino, V., Montoya, A. (2014). Current status of *L. infantum* infection in stray cats in the Madrid region (Spain): implications for the recent outbreak of human leishmaniosis? *Parasites Vectors* 7, 112.
41. Montoya, A., García, M., Gálvez, R., Checa, R., Marino, V., Sarquis, J., Miró, G. (2018). Implications of zoonotic and vector-borne parasites to free-roaming cats in central Spain. *Veterinary Parasitology*, 251(January), 125–130.
42. Nasereddin A, Salant H, Abdeen Z. (2008) Feline leishmaniasis in Jerusalem: serological investigation. *Vet Parasitol.* 158:364–9.
43. Navarro JA, Sánchez J, Peñafiel-Verdú C, Buendía AJ, Altimira J, Vilafranca M. (2010). Histopathological lesions in 15 cats with leishmaniosis. *J Comp Pathol.* 143:297–302.
44. Ortuñez A, Gomez P, Verde MT, Mayans L, Villa D, Navarro L. (2010). Lesiones granulomatosas en la mucosa oral y lengua y multiples nodulos cutaneos en un gato causado por *Leishmania infantum*. In: *Proceedings of the Southern European Veterinary Conference.* Barcelona.

45. Otranto, D., Dantas-Torres, F. (2013). The prevention of canine leishmaniasis and its impact on public health. *Trends Parasitol.* 29, 339–345.
46. Otranto, D., Napoli, E., Latrofa, M. S., Annoscia, G., Tarallo, V. D., Greco, G., ... Brianti, E. (2017). Feline and canine leishmaniosis and other vector-borne diseases in the Aeolian Islands: Pathogen and vector circulation in a confined environment. *Veterinary Parasitology*, 236, 144–151.
47. Ozon C, Marty P and Pratlong F. (1998). Disseminated feline leishmaniosis due to *Leishmania infantum* in Southern France. *Vet Parasitol.* 75: 273–277.
48. Pennisi MG, Persichetti MF. (2018). Feline leishmaniosis: Is the cat a small dog? *Vet Parasitol.* 251:131-7.
49. Pennisi, M.G., Masucci, M., Catarsini, O. (1998). Presenza di anticorpi anti *Leishmania* in gatti FIV+ che vivono in zona endemica. *Atti Congresso Nazionale Società Italiana Scienze Veterinarie* 52, 265–266.
50. Pennisi, M. G., Cardoso, L., Baneth, G., Bourdeau, P., Koutinas, A., Miró, G., ... Solano-Gallego, L. (2015). LeishVet update and recommendations on feline leishmaniosis. *Parasites and Vectors*, 8(1), 1–18.
51. Persichetti, M. F., Solano-Gallego, L., Vullo, A., Masucci, M., Marty, P., Delaunay, P., ... Pennisi, M. G. (2017). Diagnostic performance of ELISA, IFAT and Western blot for the detection of anti-*Leishmania infantum* antibodies in cats using a Bayesian analysis without a gold standard. *Parasites and Vectors*, 10(1), 1–8.
52. Pimenta, P., Alves-Pimenta, S., Barros, J., Barbosa, P., Rodrigues, A., Pereira, M.J., Maltez, L., Gama, A., Cristóvão, J.M., Campino, L., Maia, C., Cardoso, L. (2015). Feline leishmaniosis in Portugal: 3 cases (year 2014). *Vet. Parasitology Reg. Stud. Rep.* 1–2, 65–69. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vprsr.2016.02.003>.
53. Pocholle E, Reyes-Gomez E, Giacomo A, Delaunay P, Housseine L, Marty P. (2012). Un cas de leishmaniose féline disséminée dans le sud de la France. *Parasite.* 19:77–80.
54. Poli, A., Abramo, F., Barsotti, P., Leva, S., Gramiccia, M., Ludovisi, A., Mancianti, F. (2002). Feline leishmaniosis due to *Leishmania infantum* in Italy. *Vet. Parasitol.* 106, 181–191.
55. Priolo, V., Martínez Orellana, P., Pennisi, M.G., Masucci, M., Foti, M., Solano-Gallego, L. (2017). *Leishmania infantum* specific production of IFN γ in stimulated blood from outdoor cats in endemic areas. In: *Proceedings World Leish 6*. Presented at the World Leish 6, Spain Toledo. pp. C1038.

56. Richter M, Schaarschmidt-Kiener D, Krudewig C. (2014). Ocular signs, diagnosis and long-term treatment with allopurinol in a cat with leishmaniasis. *Schweiz Arch Tierheilkd.* 156:289–94.
57. Sanches A, Pereira AG, Carvalho JP. (2011). Um caso de leishmaniose felina. *Vet Med.* 63:29–30.
58. Soares, C. S. A., Duarte, S. C., & Sousa, S. R. (2015). What do we know about feline leishmaniosis? *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 18(6), 435–442.
59. Solano-Gallego L, Koutinas A, Miró G, Cardoso L, Pennisi MG, Ferrer L, et al. (2019). Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniosis. *Vet Parasitol.* 165:1–18.
60. Solano-Gallego L, Miró G, Koutinas A, Cardoso L, Pennisi MG, Ferrer L, et al. (2011). LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniosis. *Parasit Vectors.* 4:86.
61. Solano-Gallego L, Rodríguez-Cortés A, Iniesta L, et al. (2007). Cross-sectional serosurvey of feline leishmaniosis in ecoregions around the Northwestern Mediterranean. *Am J Trop Med Hyg.* 76: 676–680.
62. Spada, E., Proverbio, D., Migliazzo, A., Della Pepa, A., Perego, R., Bagnagatti De Giorgi, G. (2013). Serological and molecular evaluation of *Leishmania infantum* infection in stray cats in a non-endemic area in northern Italy. *ISRN Parasitol.* 2013, 1–6.
63. Suárez Rodríguez B, Isidoro Fernández B, Santos Sanz S, Sierra Moros MJ, Molina Moreno R, Astray Mochales J, Amela Heras C. (2012). Review of the current situation and the risk factors of *Leishmania infantum* in Spain. *Rev Esp Salud Publica.* 86(6):555–564.
64. Trainor KE, Porter BF, Logan KS, Hoffman RJ, Snowden KF. (2008). Eight cases of feline cutaneous leishmaniasis in Texas. *Vet Pathol.* 47(6):1076–1081.
65. Vita, S., Santori, D., Aguzzi, I., Petrotta, E., Luciani, A. (2005). Feline leishmaniasis and ehrlichiosis: serological investigation in Abruzzo region. *Vet. Res. Commun.* 29, 319–321.
66. Organización Mundial de la Salud (OMS). <https://www.who.int>. (2019). <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>.